



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

***Brucella abortus* S-19 KONJUKTİVAL AŞILI SIĞIRLARDA  
HÜCRESEL VE HUMORAL İMMUN YANIT TAKİBİNE  
YÖNELİK PROTOTİPLER GELİŞTİRİLMESİ VE  
GELİŞTİRİLECEK BU PROTOTİPLER İLE İMMUN YANIT  
TAKİBİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Gülnur SERDAR**

**Samsun  
Ocak-2017**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

***Brucella abortus* S-19 KONJUKTİVAL AŞILI SIĞIRLARDA  
HÜCRESEL VE HUMORAL İMMUN YANIT TAKİBİNE  
YÖNELİK PROTOTİPLER GELİŞTİRİLMESİ VE  
GELİŞTİRİLECEK BU PROTOTİPLER İLE İMMUN YANIT  
TAKİBİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Gülnur SERDAR**

**Prof.Dr. Oktay GENÇ**

**Samsun  
Ocak-2017**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince her zaman bilgi ve desteğiyle yanımda olan, çalışmalarım konusunda beni yönlendirip, motive eden ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bana çok değerli katkıları olan danışman hocam Prof. Dr. Oktay GENÇ'e, ekonomik katkıları nedeniyle Ondokuz Mayıs Üniversitesi ve Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne, materyal temininde DİMES Tarım İşletmelerine ve başta Genel Müdür Koray SÜNER'e, Hayvancılık Bölüm Şefi Halit ALYEŞİL'e ve Veteriner Hekimler Mustafa POLAT ile Yavuz Selim AYDIN'a, ayrıca emeği geçen diğer tüm yardımcı personele teşekkürü borç bilirim.

Saha çalışmalarımın belli bir döneminde bana yardımcı olan arkadaşlarım Veteriner Hekim A. Anıl ÇAĞIRGAN ve Veteriner Sağlık Teknisyeni Yunus Emre CEYLAN'a, laboratuvar çalışmalarımda önemli katkısı olan Biyolog Sare SOLMAZ'a, çalışmalarımın ilk gününden itibaren büyük özveri ile yanımda olan sevgili eşim Ali SERDAR'a ve ailemize bu süreçte dahil olan biricik oğlum Mehmet Kağan SERDAR'a minnettarlığımı bildiririm.

Tüm eğitimim boyunca maddi, manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım annem Nuriye ATALAR'a ve canım babam B.Ali ATALAR'a yürekten sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, PYO.VET.1904.14.004 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

## ÖZET

### ***Brucella abortus* S-19 Konjunktival Aşılı Sığırlarda Hücresel ve Humoral İmmun Yanıt Takibine Yönelik Prototipler Geliştirilmesi ve Geliştirilecek Bu Prototipler ile İmmun Yanıt Takibi**

**Amaç:** Bu araştırmada *B.abortus* S-19 ile konjunktival yolla aşılanmış genç ve ergin 2 grupta humoral ve hücresel immün yanıtın izlenmesi amaçlandı.

**Materyal ve Metot:** Araştırmada her bir gruba 30 buzağı dahil edildi ve bir defa aşılana buzağılar (grup-1) aşılama sonrası 3 dönem, rapel uygulanan 1 yaş ve üzeri dişi sığırlar (grup-2) ise 4 dönem bağışıklık yönünden incelendi. Hücresel immün yanıt tespiti için brusellerjene yönelik IFNg yanıtı, humoral yanıt için ise LPS'e karşı IgG ve IgA immunglobulin izotipleri araştırıldı.

**Bulgular:** Bağışıklık yanıtının izlenmesinde IgG ve IgA sonuçlarında 85. günde gruplar arasında istatistikî yönden önemli bir farklılık ( $P<0.05$ ) belirlenirken, 46 ve 169. günde IgG ve IgA için önemli bir farklılık belirlenmedi. IFNg açısından değerlendirildiğinde, 46. günde istatistikî yönden önemli bir farklılık ( $p<0.05$ ) belirlenirken 85. ve 169. günde bu farklılığın olmadığı belirlendi. Diğer dönemlerde önemli farklılık gözlenmemesi ise gruplar arasında düzenli ancak düşük düzeyde bir immün yanıtı ifade etmektedir.

**Sonuç:** IFNg ile ilgili sonuçlar, antijenlere dayalı hücresel immün yanıtın bağışıklığın takibi için yeterli olmadığına, Immunglobulin G ile ilgili sonuçlar ise ilk 46 günlük döneminin bağışıklığın takibi açısından önemli olabileceğine işaret etmektedir. Elde edilen sonuçlar bu durumun aydınlığa kavuşturulması için bu araştırma ile aynı dönemleri içerecek şekilde Ig izotip ve hücresel immün yanıt gelişiminin birlikte izleneceği çalışmaların yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *B. abortus* S19 aşısı, konjunktival yol, immünite, humoral, hücresel

Gülnur SERDAR, Yüksek Lisans Tezi  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Ocak-2017

## ABSTRACT

### **Investigations on the development of prototypes based on the detection of humoral and cellular immunity on *B. abortus* S19 vaccinated cows with conjunctival route and monitoring of the immune response**

**Aim:** In this study, it was aimed to monitor the humoral and the cellular immune response to S19 conjunctival vaccine in 2 groups known as calfhood and adulthood.

**Material and Method:** In the study, 30 calves were included for each group and 3 postvaccination times for calves (group-1) and 4 postvaccination times for adult calves (group-2) were considered.

**Results:** Significant difference ( $P < 0.05$ ) was found between IgG and IgA results on the 85th day between groups in the monitoring of the immune response. These differences were not detected on the 46th and 169th pvd associated with IgG and IgA. When it was evaluated in terms of IFN $\gamma$ , a significant difference ( $p < 0.05$ ) was found on the 46th pvd and it was determined that this difference was not observed on the 85th and 169th days. The absence of significant differences in other periods indicates a regular but low level of immunological response among the groups.

**Conclusion:** As regarding with the IgG antibody, evaluation of the immunity for the first 46 pvd demonstrated that measuring IgG response in calves and adults is significant at 46 pvd, but IFN $\gamma$  results showed that detection of cellular immunity for the period was not sufficient for vaccine monitoring. The study points out that monitoring of the immunity until pvd 46 against S19 vaccine and with determination of diagnostic proteins that would have roles in the humoral and cell based immunity would be more helpful.

**Keywords:** *B. abortus* S19 vaccine, conjunctival route, immunity, humoral, cellular

Gülnur SERDAR, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, January-2017

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ADCC</b>	: Antibody Dependent Cell Cytotoxicity
<b>AP</b>	: Alkaline Phosphatase
<b>BCSP</b>	: Brucella Cell Surface Protein
<b>BFR</b>	: Bakterioferritin
<b>BP26</b>	: Brucella Protein 26
<b>CD</b>	: Cluster of Differentiation
<b>CFT</b>	: Complement Fixation Test
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>ConA</b>	: Concanavalin A
<b>DC</b>	: Dendritic Cell
<b>DNA</b>	: Deoksiribonukleic Acid
<b>DTH</b>	: Delayed Type Hipersensitivity
<b>ELISA</b>	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>Fc</b>	: Fragment Crystallizable
<b>FG</b>	: Fish Gelatine
<b>FPA</b>	: Flourescence Polarization Assay
<b>H<sub>2</sub>S</b>	: Hidrojen Sülfid
<b>IFN</b>	: İnterferon
<b>Ig</b>	: Immunoglobulin
<b>IL</b>	: İnterleukin
<b>invB</b>	: İnvation Protein B
<b>IRAK</b>	: Interleukin -1 Receptor Associated Kinase
<b>IRF</b>	: Interferon Regulatory Factor
<b>IS</b>	: Insertion Sequence
<b>IU</b>	: İnternational Unit

<b>LAMP</b>	: Loop-Mediated Isothermal Amplification
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarid
<b>MHC</b>	: Major Histocompatibility Complex
<b>MLVA</b>	: Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis
<b>MyD88</b>	: Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88
<b>NFκB</b>	: Nuclear Factor Kappa B
<b>NK</b>	: Natural Killer
<b>NOD</b>	: Nucleotide Binding Oligomerization Domain-Like Receptors
<b>OD</b>	: Optical Density
<b>OPS</b>	: Oligopolisakkarid
<b>OMP</b>	: Outer membrane protein
<b>PAMP</b>	: Pathogen Associated Membrane Protein
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffered Saline
<b>PBST</b>	: Phosphate Buffered Saline Tween
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction
<b>PGF2α</b>	: Prostaglandin F2α
<b>pNNP</b>	: Para Nitro-Phenyl-Phosphate
<b>pNPP</b>	: 4-Nitrophenyl Phosphate Disodium
<b>PrPc</b>	: Prion Protein
<b>pRRs</b>	: Pattern Recognition Receptors
<b>R</b>	: Rough
<b>RER</b>	: Rough Endoplasmic Reticulum
<b>ROC</b>	: Receiver Operating Characteristic
<b>rRNA</b>	: Ribosomal Ribonucleic Acid
<b>S</b>	: Smooth
<b>SAT</b>	: Serum Agglutination Test

<b>SI</b>	: Stimulation Index
<b>SOD</b>	: Superoxide Dismutase
<b>TCR</b>	: T Cell Receptor
<b>TGF</b>	: Transforming Growth Factor
<b>Th</b>	: T helper
<b>TIR</b>	: Toll Interleukin Receptor
<b>TIRAP</b>	: Toll-interleukin 1 Receptor (TIR) Domain Containing Adaptor Protein
<b>TLR</b>	: Toll Like Receptor
<b>TNF</b>	: Tumor Necrosis Factor
<b>TRAM</b>	: TRIF Related Adapter Molecule
<b>TRIF</b>	: TIR-Domain-Containing Adapter-Inducing Interferon- $\beta$



## TABLÖLAR

<b>Tablo 1.</b> Brusella cinsinin karakteristik özellikleri.....	8
<b>Tablo 2.</b> Brusella tür ve biovarlarının ayırımı.....	9
<b>Tablo 3.</b> Sığırlarda brusellozis teşhisi amacıyla kullanılan serolojik testlere ait ortalama performans indeks (PI), standart sapma (SD) ve değişim katsayıları (%CV).....	23
<b>Tablo 4.</b> İlk kez ve 1 yıl sonra konjunktival olarak <i>B. abortus</i> S19 ile aşılannmış buzağı ve sığırlarda IgG ve IgA sonuçları.....	41
<b>Tablo 5.</b> Aşılı buzağı ve sığırlarda stimulasyon indekse göre IFNg sonuçları.....	42

## ŞEKİLLER

Şekil 1. MÖ 5 milyon yıl ile 1950’li yıllara kadar bildirilen Brusella zaman çizelgesi....5	5
Şekil 2. Brusella Smooth (S) koloni ve mikroskopik görünüm.....7	7
Şekil 3. <i>B. abortus</i> ’un konak hücre siklusu.....11	11
Şekil 4. Zoonotik ve zoonotik olmayan Brusella türleri.....12	12
Şekil 5. Brusella invazyonu ve konak memeli hücresinde hücre içi trafiği.....14	14
Şekil 6. Brusella’nın doğal ve kazanılmış immün yanıtta kaçış stratejileri.....15	15
Şekil 7. Brusella’nın gizlenme stratejileri.....16	16
Şekil 8. <i>B. abortus</i> infeksiyonu süresince doğal immünite sinyalleri.....18	18
Şekil 9. Brusella infeksiyonu süresince antijen sunum modeli.....21	21
Şekil 10. S-LPS, kor- OPS ve nativ hapten yapıları.....25	25
Şekil 11. Brusella LPS yapısı.....28	28
Şekil 12. Sürü bağışıklık teorisi ve Brusella sürü infesksiyonlarında temel reproduktif oran.....32	32
Şekil 13. İki farklı grupta aşılama sonrası zamana bağlı olarak IgG, IgA ve IFN $\gamma$ pozitiflik yüzdeleri .....43	43

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	xi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	4
2.1. Tarihçe.....	4
2.2. Etiyoloji.....	5
2.2.1. Kültür Özellikleri.....	6
2.3. Epidemiyoloji .....	10
2.3.1. Bulaşma .....	10
2.4. Patogenez .....	12
2.4.1 İmmunopatogenez.....	17
2.5. Seroloji .....	21
2.5.1. Antijenik Yapı .....	24
2.6. Moleküler Özellikler .....	28
2.7. Klinik .....	30
2.8. Teşhis ve Tedavi .....	30
2.9. Korunma .....	31
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	34
3.1. Materyal .....	34
3.1.1. Pozitif ve Negatif Serumlar .....	34
3.1.2. Antijenler .....	34
3.1.3. Konjugatlar .....	35
3.1.4. Substratlar.....	35
3.1.5. ELISA Pleytleri .....	35
3.1.6. Kan Örnekleri .....	35
3.2. Metot .....	36
3.2.1. Lipopolisakkarid (LPS) Antijeninin Hazırlanması.....	36
3.2.2. Brusellerjen Hazırlanması .....	36
3.2.3. Konsantrasyon Tespiti .....	37

3.2.4. Örneklerden Hücresel İmmun Yanıt Belirlenmesi .....	37
3.2.5. Humoral İmmun Yanıt Uygulamaları .....	38
<b>4. BULGULAR</b> .....	40
4.1. İndirekt IgG ve IgA ELISA.....	40
4.1.1. IgG ve IgA ELISA Sonuçları .....	41
4.2. Kompetitif ELISA .....	42
4.3. Hücresel İmmun Yanıt .....	42
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	43
<b>KAYNAKLAR</b> .....	48
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	56



## 1.GİRİŞ

Brusellozis; sığır, koyun, keçi, koç, domuz ve köpek gibi hayvanlarda özellikle testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek yavru atımlarına ve infertiliteye neden olan bulaşıcı, kronik seyirli, nekrotik ve yangısal infeksiyonlarla ortaya çıkan zoonotik bir hastalıktır (Aras ve ark., 2009). Brusellozis günümüzde hala en önemli zoonotik hastalıklardan biridir. Birçok ülkede eradikasyonu başarılabilmiş ise de yabancı ve evcil hayvanlarda tüm kıtalarda özellikle Akdeniz bölgesinde, Ortadoğu, Batı Asya, Afrika ve Güney Amerika'da endemik olarak seyretmektedir (Corbell, 1997). Brusellozis'in arzulanan düşük prevalans seviyelerine indirilebilmesi amacıyla 01.01.2012 tarihinden itibaren Türkiye'de "Brusellozis'in Konjuktival Aşı İle Kontrol ve Eradikasyonu" projesi'nin başlatılmasına karar verilmiştir. Ülkemizde %10 'un üzerinde endemik seyreden infeksiyonun arzulanan düzeye indirilmesi amacıyla 2012 yılından itibaren yeniden aşı uygulamaları başlatılmıştır. Sığırlarda aşı projesi 10 yıl sürdürülecek ve her hayvan 2 defa aşılanacaktır. On yıl sonunda seropozitif bulunan hayvanlar sürüden uzaklaştırılacaktır (Anon, 2012). Böylece infeksiyondan arı sürüler oluşturulacak ve bağışık bir sürü oluşumu sağlanmış olacaktır.

Bilindiği üzere Brusella etkenleri hücre içi olup immun yanıt gelişimi hem humoral hem de hücre sel yönde olmaktadır. Bu yanıtın hangi yönde olacağı T lenfositlere sunulan antijenlerin ekzojen ve/veya endojen yapılı olmasına göre değişmektedir. Humoral immün yanıt ile korunma ya antikora bağlı olarak direkt, ya da antikorla birlikte komplement ve sitotoksik hücre yardımı ile sağlanmaktadır. Hücre sel immün yanıtta ise korunma; doğal öldürücü (NK) hücreleri, makrofajlar ve sitotoksik T hücreleri ile sağlanmaktadır. Hücre sel immün yanıt uyarımına neden olan temel sitokin interferon gamma (IFN gama)'dır. IFN gamanın artan ekspresyonları spesifik ve non-spesifik hücrelerin aktivasyonuna yol açarak infekte hücrelerin apoptoz ile yıkımlanmasını sağlamaktadır. Bu sayede korunma sağlanmaktadır (Hay ve Westwood, 2002; Lesley, 2003; Tizard, 2010; Skendros ve Boura, 2013).

Brusella gibi hücre içi infeksiyon etkenlerine karşı korunmada en etkili yol hücre sel immün yanıt uyarımıdır (Skendros ve Boura, 2013). Hücre sel immünyanıt gelişimi ya spesifik antijen uyarımına bağlı olarak oluşan gama interferon tespiti ile in vitro olarak ya da spesifik antijenlerin intradermal uygulamaları ile in vivo olarak tespit edilebilmektedir. In vivo testlerde gecikmiş tip aşırı duyarlılık (delayed type

hipersensitivite, DTH) reaksiyon sonuçlarının değerlendirilmesi için 2-3 güne ihtiyaç duyulması, hayvanlarda 2 kez manipülasyonların yapılması, deri reaksiyon yoğunluğunun çok sınırlı olması (tüberkülinde oluşan reaksiyonun 1/3-1/4'ü) sonuçların değerlendirilmesinde güçlükler yaratmaktadır. Hücresel immun yanıtı değerlendirmede in vitro teknikler bu tip sakıncalar taşımamaktadır. İn vivo yöntemler sensitivitesi düşük olduğundan ve sonuçları değerlendirmede güçlükler yaşandığından ancak aşı yapılmamış alanlarda teşhise yönelik olarak *Y. enterocolitica* serotip O: 9 ve *E. coli* O157 den kaynaklanan kros-reaksiyonları açığa çıkarmak amacıyla kullanılmaktadır (Weynants ve ark, 1995; Poester ve ark, 2010; Tizard 2010). İn vitro bir test olan T hücre proliferasyon testi, *Y. enterocolitica* gibi kros-reaktif ajanların neden olduğu infeksiyonların ayırımında rol oynar. Bu teknik, DTH ve sitokin tespit testlerinden çok hızlı ve daha duyarlıdır. Ancak bu testte radyoaktif madde kullanımı gerekli olduğundan pek tercih edilmemektedir. Fensterbank ve ark. (1982), ile Weynants ve ark. (1995), sığırlarda brusellozisin teşhisinde in vivo yöntemlerin ancak aşı uygulanmamış alanlarda infeksiyon ayırımında kullanılabileceğini belirtmektedirler. IFNg oluşumunun brusellozis fare modelinde hücresel immun yanıtta önemli bir mediatör olduğu Zhan ve Cheers (1993) ile Zhan ve ark. (1993) tarafından açıklanmış ve diyagnostik amaçla kullanılabileceği belirtilmiştir. IFNg testi, sandviç Ezyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) olarak bilinen yöntemin uygulamalarıdır (Rothel ve ark., 1990). IFNg'nın spesifitesinin %100'e yakın olduğu gerek non-infekte gerekse kros-reaktif ajanlarla infekte hayvanlarda belirlenmiştir. Test in vitro yapılır ve deri testleri gibi ölçümler gerektirmediği için sonuçlar daha az görecelidir (Çelik ve Kocabaş, 2007). Sığırlarda gama-interferonun tespiti amacıyla sınırlı sayıda ticari ürün mevcuttur. Bu test ilk kez 1980 li yılların sonlarına doğru tüberkülozun teşhisi amacıyla geliştirilmiştir (Wood ve Jones, 2001).

Gama interferon testinde, total kan kültür sisteminde salgılanan gama-interferon lenfokinin konsantrasyonu belirlenir. Bu test öncesinde anti-koagulantlı kan spesifik antijen ile 18-24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda spesifik antijenle uyarılan kan düşük devirde santrifüje edilerek plazması ayrılır ve bu test ile plazmada bulunan sensitize lenfositlerden salgılanan IFNg konsantrasyonu tespit edilir (Rothel ve ark, 1990; Palmer ve ark, 2006; Gormley ve ark, 2006; Coad ve ark, 2007). Hücresel immun yanıtta; duyarlı lenfositler brusellerjen ile uyarıldıktan 18-24 saat sonra

(CO<sub>2</sub> li etüvlerde) sensitize lenfositler IFN $\gamma$  salgılar. Salgılanan IFN $\gamma$  düzeyi, sandviç ELISA yöntemi ile belirlenir (Rothel ve ark., 1990; Ryan ve ark., 2000; Coad ve ark., 2007).

Humoral immün yanıtın takibi amacıyla çok sayıda serolojik testten yararlanılmaktadır (Alonso-Urmeneta ve ark., 1988; Blasco ve ark., 1994; OIE, 2000; Genç ve ark., 2010). Serolojik testlerde tanı antijeni olarak lipopolisakkarid (LPS) ve oligopolisakkarid (OPS) dominant olmakla birlikte, hücre proteinleri ve rekombinant proteinler immunolojik test antijenleri olarak kullanılmaktadır (Cloeckert ve ark., 1992; Goldbaum ve ark., 1993; Diaz-Aparicio ve ark., 1993; Stevens ve ark., 1994; Hemmen ve ark., 1995; Baldi ve ark., 1996). S-LPS antijen karışımlarının bazı durumlar için kullanımı sınırlıdır. Özellikle *Y. enterocolitica* O:9, *Salmonella urbana* grup N (O:30), *V. cholera* (O1), *F. tularensis*, *E. coli* O:157 gibi Gram negatif bakterilerin S-LPS leri ile kros verdiğinden bu antijenlerin kullanımı uygun değildir (Cloeckert ve ark., 1998; Nielsen K, 2002; Cassataro ve ark., 2004). *B.abortus* S19 aşısı ve epruvasyon suşuna (*B.abortus* 544) karşı oluşan antikor yanıtının incelenmesinde, LPS ve stoplazmik proteinlere dayalı teşhis yönteminin duyarlı ve özgül olduğu ve bazı periplazmik ve sitoplazmik proteinlerin insan ve hayvanlarda tanı antijenleri olarak kullanılabilceği gösterilmiştir (Goldbaum ve ark., 1993; Hemmen ve ark., 1995; Baldi ve ark., 1996; Cloeckert ve ark., 1996). Son yıllarda kros-reaksiyonlardan ayırım ve aşılı-infekte ayırımını sağlayabilecek antijenlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Alternatif antijenlerden brucella protein (BP26), (Rossetti ve ark., 1996; Al Dahouk ve ark., 2006; Connoley ve ark., 2006; Grillo ve ark., 2009), superoxide dismutase (Tabatabai ve Hennager, 1994), Brucella lumazine synthase, 18-kDa sitoplazmik protein (Goldbaum ve ark., 1993), ribosome recycling factor, CP24 (Cloeckert ve ark., 1996), ve lektin benzeri etkiye sahip 14-kDa protein (Chirhart-Gilleland ve ark., 1998; Vemulapalli ve ark., 1999), önemli olanlardır. Brusellerjen OCB (Rhone-Merieux, batch 26N151), bp39 ve bakterioferritin (BFR) en çok T lenfosit uyaran immunojen olarak belirlenmiştir (Brooks-Worrel ve Splitter, 1992; Denoel ve ark., 1997; Fays ve ark., 1999). Ancak *Brucella melitensis* Rev-1 ile yapılan konjunktival aşılmalarda aşığı takiben ve *B. abortus* 2308 suşu ile infekte edilen koyun ve keçilerde major antijenlere (LPS, OPS) dayalı serolojik testlerle antikor yanıtının 2 hafta kadar belirlendiği daha sonra tespit edilemediği, ancak subkutan uygulamalarda bu yanıtın

uzun süre tespit edildiği belirlenmiştir (Xin ve ark., 2013). Bu durum bu aşya karşı hücrenel yönde immun yanıtın geliştiğini göstermiştir.

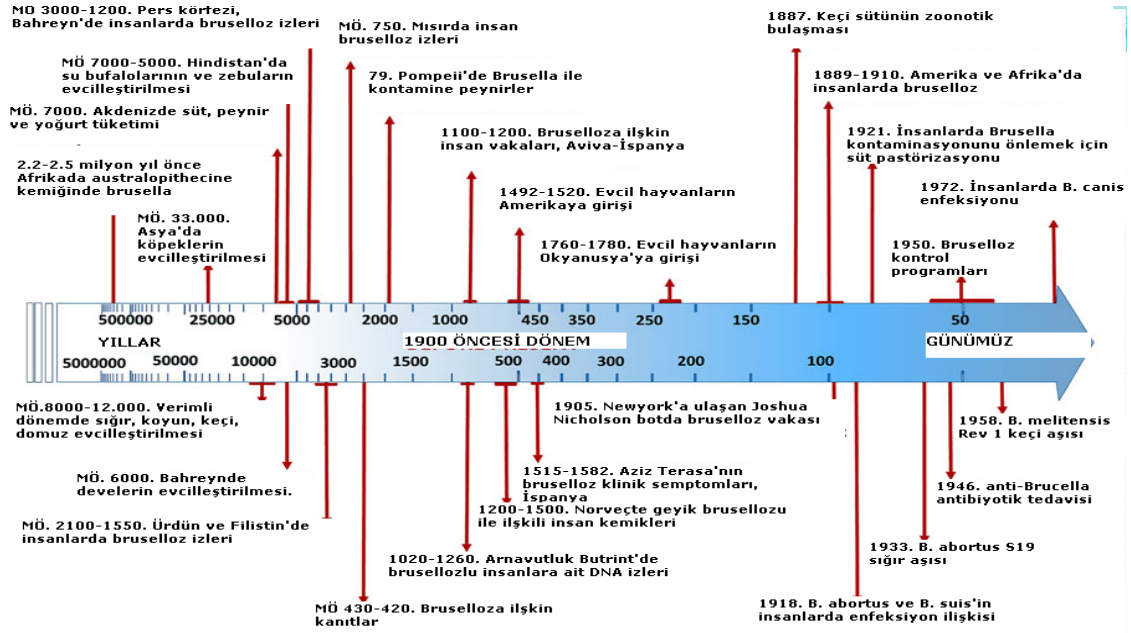
Ülkemizde yaygın olarak görülen ve ekonomik kayıplara neden olan brusellozis, hem hayvan sağlığını hem de halk sağlığını tehdit eden önemli zoonotik bir hastalıktır (Alton ve ark., 1988; İyisan ve ark., 2003; Yumuk ve O'Callaghan, 2012). Ülkelerin uluslararası piyasalara canlı hayvan ve hayvansal ürün ihracatı yapabilmesi için zoonotik ve bulaşıcı infeksiyonlardan arî olması gerekmektedir. Bu amaçla dünyada yaygın olarak seyreden infeksiyonlardan (brusellozis, tüberküloz) arî sürüler oluşturulmasına çalışılmaktadır. Tezin konusu olan brusellozis, dünyada ada ülkeler ve bazı Avrupa ülkeleri hariç hemen her yerde gözlenen bir infeksiyondur. Bu infeksiyondan korunma amacıyla farklı stratejiler izlenmektedir. Ancak genel olarak izlenen prosedür öncelikle hastalık prevalansının %1'in altına indirilmesine yöneliktir. Daha sonra sürünün her 6 ayda bir tarama (screening) testleri ile takip edilmesi ve infekte hayvanların sürüden uzaklaştırılmasını gerekli kılar.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Tarihçe**

Brusellozisin tarihçesi hayvanların ilk kez evcilleştirilmeye başladığı milattan önceki dönemlere kadar gitmekte, hayvan hareketliliği, insanların doğaya müdahaleleri sonucu hayvanlarla temasın artması, hayvansal ürün hazırlama ve tüketim alışkanlıkları günümüze kadar ulaşmasını sağlamıştır. İngiliz Cerrah Sir David Bruce ve Maltalı mikrobiyolog doktor Giuseppe Caruana-Scicluna seminal örneklerden *Micrococcus melitensis*'i tanımlamışlar ve aynı araştırmacılar 1887 yılında Malta adasında 'Malta Ateşi'nden ölen İngiliz askerlerin dalaklarından etkeni izole etmiş ve daha sonra bu bakteriyi *Brucella melitensis* olarak isimlendirmişlerdir. 1897 yılında sığırlarda aborte fötusdan *B.abortus*, 1914 yılında *B. suis* izolasyonu yapılmış ve 1920 yılında bu bakteri *Brucella* olarak tanımlanmıştır (Moreno E, 2014). Ülkemizde ilk insan brusellozis olgusu 1915 yılında Dr. Hüsamettin Kural ve Mahmut Sabit Akalın tarafından Kuleli Askeri Hastanesi'nde tedavi edilen bir askerde tespit edilmiştir. Ülkemizde sığırlarda ilk izolasyon 1931-32 yıllarında Berke tarafından bildirilmiştir (Yumuk ve O'Callaghan, 2012). Brusella hastalığının tarihi Şekil 1'de sunulmaktadır.





Şekil 1. MÖ 5 milyon yıl ile 1950'li yıllara kadar bildirilen Brusella zaman çizelgesi (Moreno E, 2014)

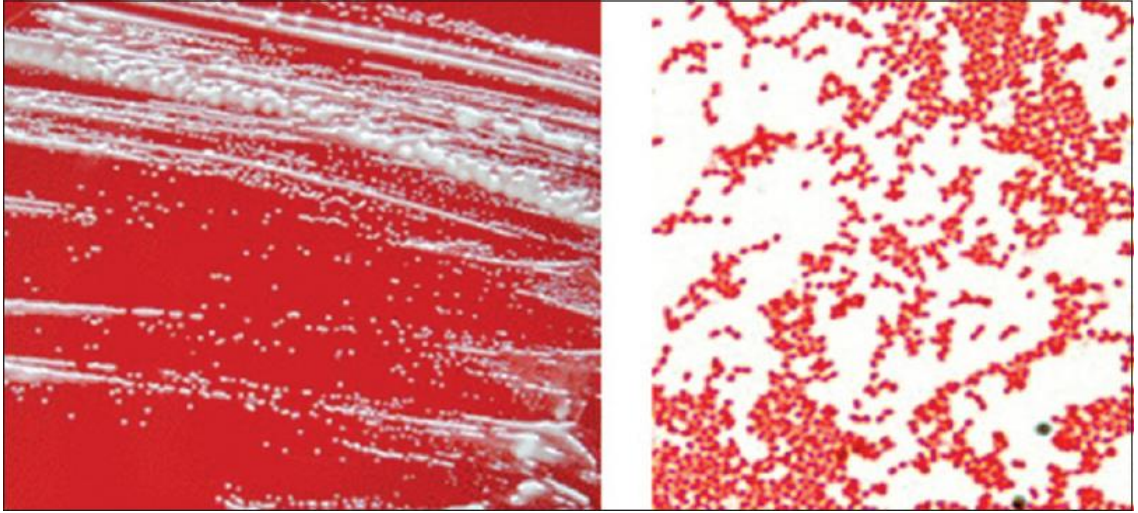
## 2.2. Etiyoloji

Küçük, hareketsiz, spor oluşturmeyen, Gram negatif, kokobasil veya küçük çomaklardır (0.5-0.7µm X 0.5-1.5 µm boyutlarında). Genellikle aerobik ortamda ürer ve %5-10 CO<sub>2</sub> üremeyi artırır. Makrofaj içerisinde çoğalan hücre içi bakterilerdir (He Y, 2000). Brusella cinsi mikroorganizmalar, 16S ribozomal ribonükleic acid (rRNA) sekans analizine göre *Proteobacteria* sınıfının α-2 alt grubunda yer almaktadırlar. Bu alt grup içerisinde *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Bartonella*, *Phyllobacterium* ve *Ochrobactrum* türü bakteriler bulunmaktadır. Brusella cinsi genotipik olarak %97'nin üzerinde benzerliğe sahiptir. Brusella türleri nükleotid polimorfizmi, konak tercihi, virülens farklılıkları ve fenotipik özelliklere göre ayırt edilmektedir (Moreno ve Moriyon, 2002; Aras ve ark., 2009). Konak tercihinin göre 10 Brusella türü belirlenmiştir (Whatmore ve ark., 2007). Gram negatif hücre duvar yapısına sahip olan bakteri, yapısında peptidoglikan, dış membran proteinleri ve LPS içerir. İnsan ve hayvan sağlığını etkileyen en önemli türler *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis*'dir. Brusella türleri içerisinde insanlarda en şiddetli enfeksiyona neden olan tür *B. melitensis* olup bunu *B. suis* ve *B. abortus* izler. Ender olarak da *B. canis* ile enfeksiyonlar bildirilmektedir. Bazı zoonotik Brusella türlerinde bazı biyovarlar (*B. suis* biovar 2 ve 5) ile insanlarda enfeksiyonlar gözlenmemiştir (Moreno E, 2014). Ancak klinik olarak

brusellozis belirlenen bir kadının göğüs implantından zoonoz olduğu henüz netlik kazanmayan *B. innopinata* izole edilmiştir (Scholz ve ark., 2010).

### 2.2.1. Kültür özellikleri

Brusella, biyogüvenlik seviyesi 3'de yer alan ajanlar arasında bulunmaktadır. Araştırma laboratuvarlarında en sık rastlanılan laboratuvar infeksiyonlarından biridir. Bu nedenle Brusella manipülasyonları biyogüvenlik seviyesi 3 olan laboratuvarlarda yapılmaktadır (Geresu ve Kassa, 2016). Brusella izolasyonu amacıyla fetal membranlar özellikle plasental kotiledonlar, akciğer, bronşiyal lenf nodülleri, dalak, karaciğer gibi fetal organlar ile fetal mide içeriği, vaginal sekresyonlar ve semen tercih edilir. Az sayıda bakteri içeren örneklerde izolasyon güç olmakta ve yanıltıcı negatiflikler alınabilmektedir. Bu durumda zenginleştirilmiş besiyerleri sensitiviteyi artırmak amacıyla selektif suplementlerle birlikte kullanılmaktadır (Poester ve ark., 2010). Kontamine materyallerden Brusella izolasyonu için besiyerine çeşitli suplementler ilave edilmektedir. Bu amaçla polimiksin B 5 IU/ml, basitrasin 25 IU/ml, sikloheksamid 100 µg/ml, nalidiksik asit 5 µg/ml, nistatin 100 IU/ml ve vankomisin 20 µg/ml en çok tercih edilenlerdir (De Miguel ve ark., 2011). Katı besiyerine ekildiğinde, *Brucella* 'lar smooth ya da rough koloni morfolojisi gösterirler, ancak bazı suşlar da mukoid özellik taşır. Smooth (S) kolonilerin rough (R) forma dönüşümü zaman zaman mümkündür ve bazı R suşları da S forma dönüşebilmektedir. S-R değişimi genellikle oksijen yetersizliği ve suboptimal üreme şartlarından kaynaklanmaktadır. S suşların aksine R suşların yüzeyinde hidrofobik ve elektriksel yüklü alanlar bulunduğundan R suşlar otoaglutinasyon özelliği taşırlar ve stabil bir süspansiyon oluşturamazlar (Gonzalez ve ark., 2008; OIE, 2009). Brusellanın ilk izolasyonu amacıyla suplementli Brusella agar, dekstroz agar, triptoz agar ve triptikaz soy agar önerilmekle birlikte, *B. ovis* ve *B. canis* gibi bazı Brusella türleri ile *B. abortus* biovar 2, %5-10 oranında sığır veya at serumuna ihtiyaç duyar (Geresu ve Kassa, 2016).



**Şekil 2.** Brusella S koloni ve mikroskopik görünüm

10 Brusella türü içerisinde 3 türün biyotipleri olduğu belirlenmiş ve biyotip sayıları *B.melitensis* için 3, *B.abortus* için 7 ve *B.suis* için 5 olarak bildirilmiştir. (Aras ve ark, 2009; OIE 2009). Günümüzde Brusella biyotiplerinin tamamını moleküler yöntemlerle ayırmak mümkün olamamakta ancak bu ayırım, thionin ve bazik fuksin varlığında üreme, monospesifik serumlarla aglütinasyon, CO<sub>2</sub> gereksinimi ve H<sub>2</sub>S oluşumu özelliklerine göre yapılmaktadır (OIE, 2009). Al Dahouk ve ark (2010), metabolik özelliklerin belirlendiği yarı-otomatik bir sistem (Micronaut™ system ) ile tür düzeyinde ayırımın mümkün olduğunu ancak *B. canis* ile *B. suis biovar-3* ayırımının mümkün olmadığını, *B. abortus* biovar 4,5 ve 7 ile *B. suis*'in tüm biyovarlarının ayırımının mümkün olduğunu göstermişlerdir. Moleküler yöntemler ile biyovar ayırımı sadece AMOS polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'da *B. abortus* için seçilen primer ile *B. abortus* 1,2 ve 4 bir grup diğerleri diğer grup olarak belirlenmektedir (Bricker ve Halling, 1995; Orzil ve ark., 2016). Brusella türlerinin ayırımı amacıyla faj lizis en çok kullanılan klasik tür ayırım yöntemidir. Buna göre Tbilisi, Weybridge, Izatnagar ve R/C fajlarının litik özelliğinden yararlanılmaktadır. Fajlar ve tür ayırımını sağlayan diğer bazı özellikler Tablo 1 ve 2 de belirtilmiştir (OIE, 2009).

**Tablo 1.** Brusella cinsinin karakteristik özellikleri (OIE, 2009)

			Fajlar tarafından lizis <sup>a</sup>								
			Tb		Wb	Iz <sub>1</sub>	R/C				
Türler	Kolon 1 Morfolojisi <sup>b</sup>	Serum gereksinimi	RTD <sup>c</sup>	10 <sup>4</sup> RTD	RTD	RTD	RTD	Oksidaz	Üreaz aktivitesi	Ana Konak	
<i>B. abortus</i>	S	- <sup>d</sup>	+	+	+	+	-	+ <sup>e</sup>	+ <sup>f</sup>	Sığır ve diğer Sığır türleri	
<i>B. suis</i>	S	-	-	+	+ <sup>g</sup>	+ <sup>g</sup>	-	+	+ <sup>h</sup>	Biovar 1: domuz	
										Biovar 2: domuz, tavşan	
										Biovar 3: domuz	
										Biovar 4: ren geyiği	
										Biovar 5: yabancı kemirgenler	
<i>B. melitensis</i>	S	-	-	-	- <sup>i</sup>	+	-	+	+ <sup>j</sup>	Koyun ve keçiler	
<i>B. neotomae</i>	S	-	- <sup>k</sup>	+	+	+	-	-	+ <sup>h</sup>	Çöl faresi	
<i>B. ovis</i>	R	+	-	-	-	-	+	-	-	Koçlar	
<i>B. canis</i>	R	-	-	-	-	-	+	+	+ <sup>h</sup>	Köpekler	
<i>B. ceti</i>	S		+ <sup>m</sup>		+ <sup>n</sup>	+ <sup>o</sup>	-	+	+	Su memelisi	
<i>B. pinnipedialis</i>	S		+ <sup>m</sup>		+ <sup>n</sup>	+ <sup>o</sup>	-	+	+	Yüzgeç ayaklılar	
<i>B. microti</i>	S	-	-	+	+	+	-	+	+	Tarla faresi	

**a** Tb:Tbilisi, Wb: Weybridge, Iz<sub>1</sub>: Izatnagar1 ve R/C: Rough / Canis

**b** S: smooth, R:rough **c** RTD: rutin test dilüsyonu

**d** *B. abortus* biovar 2 genellikle ilk izolasyonda seruma ihtiyaç duyar

**e** *B. abortus* biovar 3'ün bazı Afrika izolatları negatiftir

**f** 544 suşu ve bazı saha suşları dışında genellikle negatiftir

**g** *B. suis* biovar 2'nin bazı izolatları Wb veya Iz<sub>1</sub> fajlarıyla kısmen lize olur veya hiç lize olmazlar

**h** Hızlı **i** Bazı izolatlar Wb fajıyla lize olurlar **j** Yavaş, bazı suşlar dışında hızlı

**k** Küçük plaklar **l** *Neotoma lepida* **m** Bazı izolatlar Tb fajıyla lize olurlar

**n** Birçok izolatu Wb fajıyla lize olur **o** Birçok izolatu Iz fajıyla lize olur

**Tablo 2.** Brusella tür ve biovarlarının ayırımı (OIE, 2009)

Türler	Biovar	CO <sub>2</sub> gereksinimi	H <sub>2</sub> S üretimi	Boyalarla üreme <sup>a</sup>		Monospesifik serumla aglütinasyon		
				Tiyonin	Bazik fuksin	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	1	-	+	+	-	+	-	-
	2	-	+	+	+	-	-	-
	3	-	+	+	+	+	-	-
<i>B. abortus</i>	1	+ <sup>b</sup>	+	-	+	+	-	-
	2	+ <sup>b</sup>	+	-	-	+	-	-
	3	+ <sup>b</sup>	+	+	+	+	-	-
	4	+ <sup>b</sup>	+	-	+ <sup>c</sup>	-	+	-
	5	-	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
	9	+/-	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	- <sup>d</sup>	+	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	- <sup>e</sup>	+	+	-
	5	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. neotomae</i>	-	-	+	- <sup>f</sup>	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>	-	+	-	+	- <sup>e</sup>	-	-	+
<i>B. canis</i>	-	-	-	+	- <sup>e</sup>	-	-	+
<i>B. ceti</i>	-	-	-	+	+	+	- <sup>e</sup>	-
<i>B. pinnipedialis</i>	-	+	-	+	+	+	- <sup>e</sup>	-
<i>B. microti</i>	-	-	-	+	+	-	+	-

**a** Serum dekstroz agarda boya konsantrasyonu: 20 µg/ml

**b** İlk izolasyonda genellikle pozitif **c** Bazik fuksine duyarlı suşlar

**d** Bazik fuksine dirençli suşlar **e** Bütün suşlar için negatif

**f** 10 µg/ml tiyonin konsantrasyonunda üreme

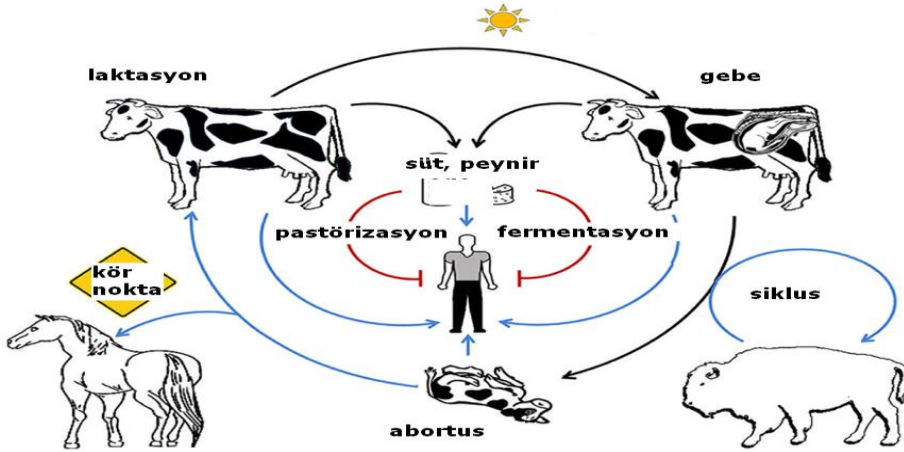
### 2.3. Epidemiyoloji

Brusellozis, Latin Amerika, Orta doğu, Afrika ve Asya'da endemik seyreden zoonotik bir infeksiyondur (Dorneles ve ark., 2015). Sığır brusellozisinin etkeni *B. abortus* olmakla birlikte bazı ülkelerde özellikle Güney Avrupa ve Batı Asya'da koyun ve keçilerle yakın temasta bulunan sığırlarda *B. melitensis*'in de infeksiyona neden olduğu belirtilmektedir (OIE, 2009). Türkiye'de insanlarda en yaygın infeksiyonlar *B. melitensis*, daha az olarak da *B. abortus* ile meydana gelmekte *B. suis*'den kaynaklanan infeksiyonlar bildirilmemiştir. Serolojik olarak köpeklerde *B. canis*'e karşı pozitiflik tespit edilse de etken izolasyonu mevcut değildir (Yumuk ve O'Callaghan, 2012). İnsanlarda her yıl 500.000 brusellozis vakası bildirilmektedir (Ahmed ve ark., 2016). Etken çeşitli ortamlarda uzun süre canlı kalmaktadır. Isıya bağlı olarak çeşme suyunda birkaç ay, donmuş doku ve materyallerde yıllarca, nemli toprakta 60-140 gün, idrarda 30 gün, aborte fötüsde 75 gün ve uterus içeriğinde 200 günden fazla canlı kalır. İnfekte dışkı ile kontamine alanlarda 56-61°C'de 4,5 saatte inaktive olur. Sıvı dışkıda 12°C'de 8 ay canlı kaldığı belirtilmiştir. Brusella dışkıda, yarı-katı ve sıvı gübrede 30-210 gün canlı kalabilmektedir (Berchovich, 2000).

#### 2.3.1. Bulaşma

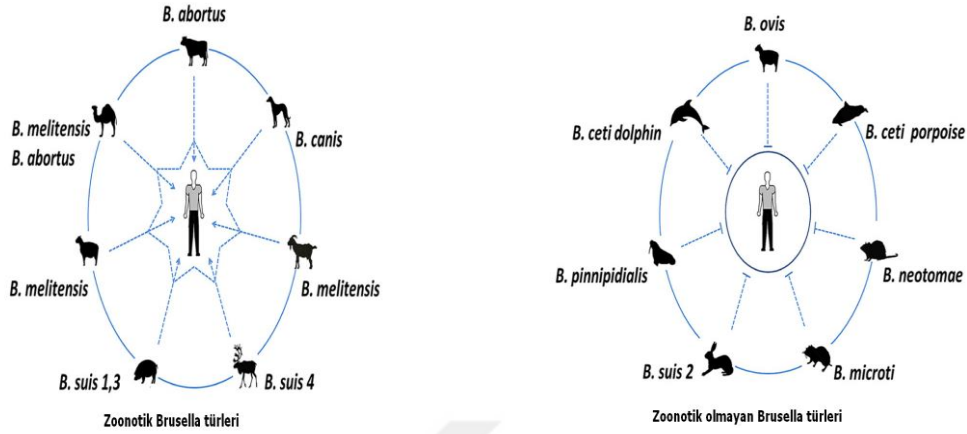
Brusella hem vertikal hem de bireyler arasında horizontal olarak bulaşmaktadır (McDermott ve Arimi, 2002). Hastalık etkeni en çok infekte gebe hayvanların uterus içeriği, fötüs ve fötal membranlarında gebe olmayan sığırların lenf yumrularında özellikle de supramammar lenf yumrularında bulunur. Doğal bulaşma aborte fötüs, fötal membranlar ve uterus akıntılarında fazla miktarda bulunan etkenlerin sindirim yolu ile alınması sayesinde olmaktadır (Carter ve Wise, 2004; Moreno E, 2014). Aborte fötüs ve plasental doku ya da sıvı 10<sup>10</sup>/g bakteri içerir. İnfekte hayvanlar sadece bir kez abort yapmalarına rağmen bazen yaşamları boyunca taşıyıcı olarak kalırlar (Yumuk ve O'Callaghan, 2012). Sığırlar kontamine yem ve sularla ya da diğer hayvanların kontamine genital bölgeleri ile temas sonucu infekte olurlar. İnfekte boğalardan veneral bulaşma ender de olsa gözlenebilmektedir. Ayrıca kontamine spermaların kullanıldığı durumda suni tohumlama yoluyla da bulaşma meydana gelmektedir. Brusella hem insanlarda hem de hayvanlarda vücuda müköz membranlar, konjunktiva, yaralar veya deri teması ile girebilmektedir (Carter ve Wise, 2004). Bulaşma insanlarda başlıca

sindirim sistemi, sağlam veya portantreli deri, konjunktiva ve sağıım sırasında sütün kontaminasyonu ile meydana gelmektedir. Brusella ile infekte ineklerin çoğu yavru attıktan sonra haftalarca ve hatta aylarca sütleri ile etkeni çıkarırlar (Foster ve ark., 2007; Munoz ve ark., 2010). Kongenital olarak infekte doğan buzağılarda ilk gebeliğe kadar antikör yanıtı oluşmaz, ergenliğe ulaştıklarında sütleriyle Brusella saçmaya başlarlar. Bu hayvanlar latent, belirti göstermeyen ya da kronik taşıyıcılar olarak ifade edilirler (Sutherland ve Searson, 1990). Hastalığın yayılmasında sinek, sivrisinek, tahtakurusu, kene, pire gibi artropodalarla yabani tavşan, sıçan, fare gibi kemiriciler de rol oynar (Godfroid ve ark., 2010). Hayvanlardan insanlara geçen en önemli zoonozlardan biri olan brusellozis, özellikle çiğ sütle yapılmış tereyağı, kaymak, taze peynir ve ekşitilmiş sütü yiyenlere hastalık kolayca geçer. Yavru atımı sırasında, güç doğumlarda yardımcı olan Veteriner Hekimler infekte olabildikleri için brusellozis bir meslek hastalığı olarak da ayrı bir önem taşır. Pastörizasyon ve fermentasyonların yeterli sürelerde bekletilerek yapılmaması infeksiyon etkeninin canlı kalmasını sağlar (Şekil 3). Vaginal olarak *B. abortus* saçılımı etkene maruz kaldıktan en erken 39 gün sonra meydana gelmektedir. İnfeksiyöz materyal aborttan 2-3 ay sonra temizlenir ancak yıllarca saçılmaya devam eder (Berchovic, 2000).



Şekil 3. *B. abortus*'un konak hücre siklusunu (Moreno E, 2014)

Brusella türlerinin, tamamı zoonotik olmayıp bazı tür ve biovarlar ile insanlarda infeksiyon bildirilmemiştir ( Şekil 4).



Şekil 4. Zoonotik ve zoonotik olmayan Brusella türleri (Moreno E, 2014)

## 2.4. Patogenez

Brusellanın tercih ettiği konaklarda çoğalma ve infeksiyon oluşturma yeteneği; invazyon yeteneğine, ilk savunma faktörlerini önleme gücüne, çoğalma yeterliliğine, bulaşma kapasitesine, konak hücre içerisinde sürdürülebilir dayanıklılığına bağlıdır. Patojenlerin ne zaman, nasıl, nerede doğal konakları ile insan popülasyonunu ayıran sınırı aştıkları epidemik infeksiyona yol açtıkları tam olarak bilinmemektedir. Diğer mikroorganizmalarda mevcut toksinler, fimbria, plazmid, kapsül, antijenik varyasyonlar, dirençli formlar gibi virülens faktörleri olmadığından tüm Brusellalarda virülent faktörler iç içe geçmiştir (Moreno ve ark., 2014).

Brusellalar konak immün yanıtından gizlenmeyi sağlayan ve kronik infeksiyon oluşumunu kolaylaştıran olağanüstü stratejilere sahiptir. Konak hücreler konak direnci ve Brusella arasında dengeyi sağlar ve patojenleri aşmak ve savaşmak için bir immün mekanizma geliştirir. Brusella, hücre içi üreme esnasında konağın doğal ve kazanılmış immün yanıt mekanizmalarından sakınmak için lenforetiküler ve reproduktif sistem dokularına tropizm gösterir (Ahmed ve ark., 2016). *B. abortus* 'un en önemli giriş yolları burun ve ağız mukozasıdır. Etken buradan lenf yumrusuna geçer bu odaktan da bakteriyemi oluşturur ve etkenler granüloamatöz reaksiyonların oluşacağı mezenterik, dalak, iliak ve supramammar lenf nodüllerine yerleşirler. İkinci bir bakteriyemi gebe uterus, meme ve ilgili lenf yumrularının dahil olduğu generalize infeksiyona neden olur.



Uterus lezyonları esas olarak plasentomlardır. Gebeliğin ilerleyen dönemlerinde konağın enfeksiyona duyarlı olmasının sebebi kesin olarak bilinmemekle birlikte plasental trofoblastların gebeliğin orta ve ileri dönemdeki duyarlılığından kaynaklandığı görüşü ön plandadır. Uterusa affinite önemli faktörlerden biri de plasentanın eritritol salgısıdır. Brusellozide abortun nedeni olarak plasentitis gösterilmekte ve buna bağlı olarak fötüs beslenememekte, fötal stres ve ölüm meydana gelmektedir. Plasentite bağlı olarak progesterondan östrojene geçiş prostaglandin (PGF2 $\alpha$ ) sekresyonunu uyarmakta erken ve/veya normal doğumu başlatmaktadır (Poester ve ark., 2013).

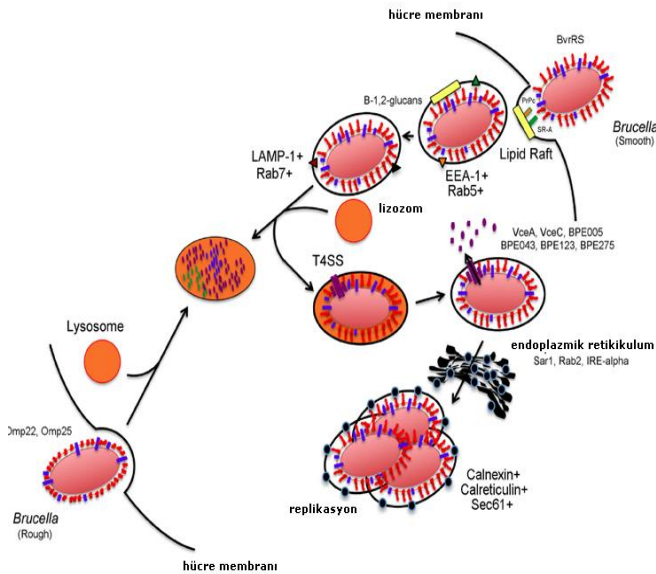
Brusellanın hastalık oluşturma yeteneği birçok faktöre bağlıdır. Hastalık etkenleri konak hücre epiteline yerleşerek mukozal yolla enfeksiyon oluştururlar. Barsakta M hücreleri Brusella giriş yeri olarak belirlenmiştir. Sindirim veya solunum yolu ile girdiğinde fagositik ve fagositik olmayan hücrelerde yaşama yetenekleri vardır. Hücre içi trafikte Brusella, hücre vakuölü (BCV)'nün lizozom ile birleşmesini önler ve vakuölün rough endoplazmik retikulum (RER)'a yönelimini sağlar ve böylece brusellanın hücre içi çoğalması için uygun ortam oluşur.

İlk savunma polimorf lökositlerce olur, daha sonra olaya mononükleer hücreler dahil olurlar. Brusellalar nötrofillerde myeloperoksidaz ve hidrojen peroksit sistemini baskılayan adenin ve 5- guanosin monofosfat üretirler. Makrofajlarda fagozom-lizozom füzyonunu inhibe ederler. Süperoksid dismutaz gibi oksidatif sistemi inhibe eden enzimleri üretirler. Brusellanın hücre içinde çoğalmasını sağlayan çok sayıda virülens faktörü vardır. Bu faktörler, Brusellanın Toll IL-1 reseptör (TIR)'ünün ve TLR2'nin MyD88 ile ilişkisini bloke etmekte ve dendritik hücre (DC) maturasyonunu, sitokin sekresyonunu ve antijen sunumunu engellemektedir. İnfeksiyonun erken döneminde *B. abortus* trofoblast hücrelerinin pro-inflamatuvar sitokin salınımı önlenmektedir. Brusellanın patogenezinde önemli virülens faktörlerinden biri olan LPS, komplement aracılı bakteri yıkımını önler, defensin ve laktoferrin gibi antimikrobiyal peptidlere karşı direnç sağlar. Brusellada diğer bir virülens mekanizması BvrR/BvrS adlı iki komponentli düzenleyici bir sistemdir. Bu sistem konak hücre iskelet yapısının oluşumundan ve dış membran ekspresyonunun düzenlenmesinden sorumludur. Diğer bir virülens faktörü dış membranın da bir parçası olan siklik beta-1,2 glukanlar Brusellanın hücre içi yaşamı için gereklidirler. Brusellalar in vivo hücre içi yaşam için gerekli olan virB operon tarafından kodlanan tip 4SS eksprese ederler. T4SS'nin,

farelerde hücre içi yaşam ve konak hücrenin immün sistem uyarımında, mikrogranülom oluşumu için gerekli olduğu bildirilmektedir. T4SS'nin konak hücrede replikasyon bölgesine ulaşım için de gerekliliği bildirilmekte ve ekspresyonunun BvrR/BvrS sistemi tarafından sağlandığı belirtilmektedir. T4SS ile Brusella, efektör proteinlerini konak hücre sitozolüne aktarmaktadır ve bu moleküllerin tanımlanması ve fonksiyonları üzerindeki çalışmalar bunların belirlenmesi ile aydınlığa kavuşturulacaktır (Ahmed ve ark., 2016).

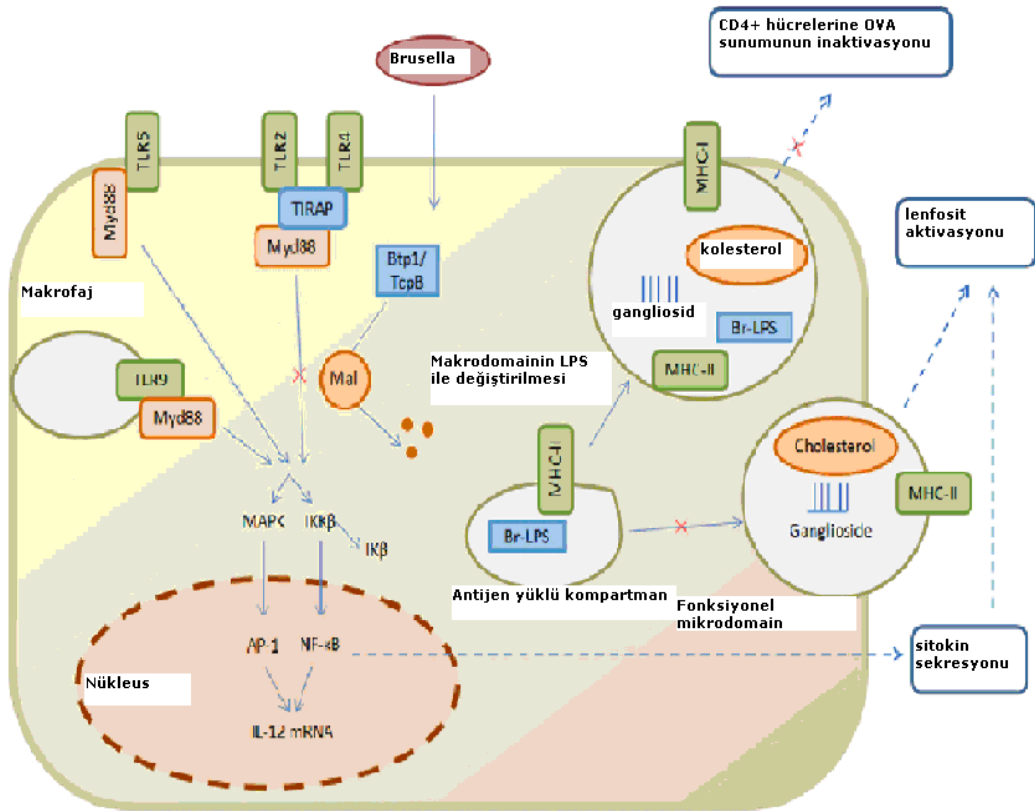
Şekil 5'te izah edildiği üzere brusellozisin patogenezi patojenin S veya R karakterine göre değişiklik göstermektedir. R karakterindeki suşlar (*B. ovis* ve *B. canis*) omp'ler vasıtası ile endozom içerisine alınmakta ve müteakiben lizozom ile birleşerek yıkılmaktadır. Ancak S karakterindeki suşlar erken ve geç endozomlarda internalize olarak lizozom ile birleşmeleri önlenmekte ve tip 4 sekresyon sistemine sokulmaktadır. Bu sisteme giren bakteriler virB sekresyon sistemini kullanarak endoplazmik retikulum ve müteakiben golgi'de internalize olarak otofagozom içerisinde yaşamını sürdürmektedir (Gomez ve ark., 2013).

Ayrıca otofajik yolun değişimi, kaspaz aktivasyonu ile apoptozisin inhibisyonu, küçük kodlanmayan RNA'nın fagositozu önlemesi ve hücre içi yaşamı inhibe etmesi, nonspesifik ve spesifik mekanizmalarda inhibisyonlar Brusellanın hücre içinde yaşamına yardımcı olan diğer faktörlerdir (Ahmed ve ark., 2016).



**Şekil 5.** Brusella invazyonu ve konak memeli hücresinde hücreiçi trafiği (Gomez ve ark., 2013)

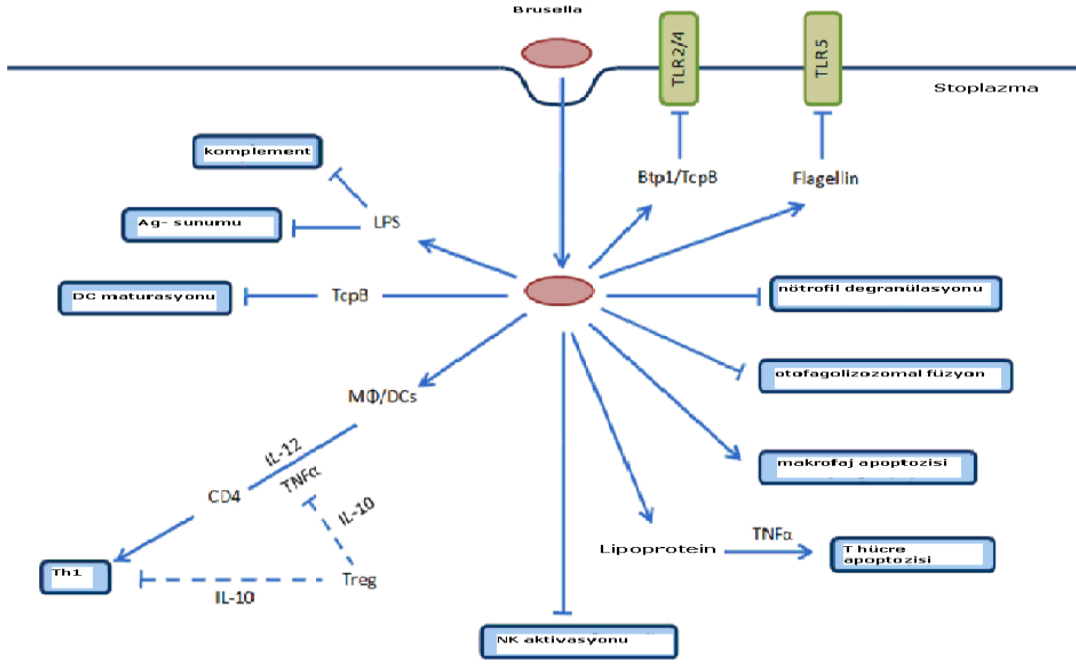
Smooth Brusella konak hücre lipidleri, prion protein (PrPc) ve SR-A ile teması takiben vakuol içerisinde işlenir. Brusella orijinli  $\beta$ -1,2-glukanlar lipidden zengin vakuoler yüzey yapıyı yeniden şekillendirir. Sonra vakuol geçici olarak konak hücre lizozomları ile birleşir. Bu ilişki asit-bağımlı genlerin aktivasyonunu sağlar, tip 4 sekresyon sistemini uyarır. Tip-4 SS'de rol oynayan substrat proteinler konak hücrenin sitozolüne aktarılır ve replikatif vakuole ulaşmak için burada trafiğin düzenlenmesi ve endoplazmik retikulum ilişkilerinin düzenlenmesinde rol oynar. Buna karşın Brusella R suşlarının internalizasyonu ve hücre içi trafiği tam olarak tanımlanmamıştır ancak Brusella Omp22 ve Omp25'in rolleri gösterilmiştir. İnternalizasyon sonrası olaylar açık olmamakla birlikte nihayetinde lizozomal degradasyona uğramaktadır.



Şekil 6. Brusellanın doğal ve kazanılmış immün yanıtın kaçış stratejileri ( Ahmed ve ark, 2016)

Burada, brusellanın makrofaj içerisinde CD4+ T hücrelerine sunumunun önlenmesi ve transkripsiyon faktörlerinin inaktivasyonu Şekil 6'da gösterilmektedir. Brusella Btp1/TcpB proteini Brusellanın sitozolde TLR ile ilişkisinde rol oynar, ubikinasyonu kolaylaştırır ve Mal'ın degradasyonunu sağlar. TLR2 ve TLR4 inhibisyonu meydana

gelir. Sonuçta NF- $\kappa$ B inhibisyonu ile lenfosit aktivasyonu önlenir. Diğer taraftan antijen yüklü kompartman Br-LPS ve büyük doku uyuşum kompleksi (MHC-II) molekülleri fonksiyonel mikrodoman ile reaktif yeteneğinde olan lenfosit aktivasyonunu sağlar, OVA'nın CD4+ T lenfositlere sunumunun önlenmesi ile sonuçlanır. Düz çizgiler doğal immüneyi, kesik çizgiler ise edinsel immüneye ile ilgili alanları göstermektedir.



Şekil 7. Brusellanın gizlenme stratejileri ( Ahmed ve ark, 2016)

Brusellanın genel savunma stratejileri Şekil 7'de özetlenmiştir. Burada, TLR sinyal yolu enfeksiyonun başlangıcında Brusellanın tanınmasında rol oynar ve makrofaj ile dendritik hücre tarafından TNF $\alpha$  ve IL-12 sekresyonuna aracılık eder ve hücre içi yaşamı ve çoğalmayı sağlar. Flagellin TLR5 uyarımını, Btp1/TcpB proteini ise TLR2/4 fonksiyonunu inhibe eder. Brusella LPS O antijeni C3 ile bağlanarak komplement aktivasyonunu önler. Brusella NK aktivasyonunu inhibe eder ve nötrofil degranülasyonunu inhibe eder. Btp1/TcpB proteini dendritik hücre maturasyonunu önler, LPS antijen sunumunu önler. Brusella lipoproteinini direkt olarak T hücre yanıtını inhibe eden TNF $\alpha$  sekresyonuna bağlı apoptozisi uyarır. Bunların dışında nötrofil degranülasyonunu, otofagolizozomal füzyonu inhibe ederek patojenin gizlenme

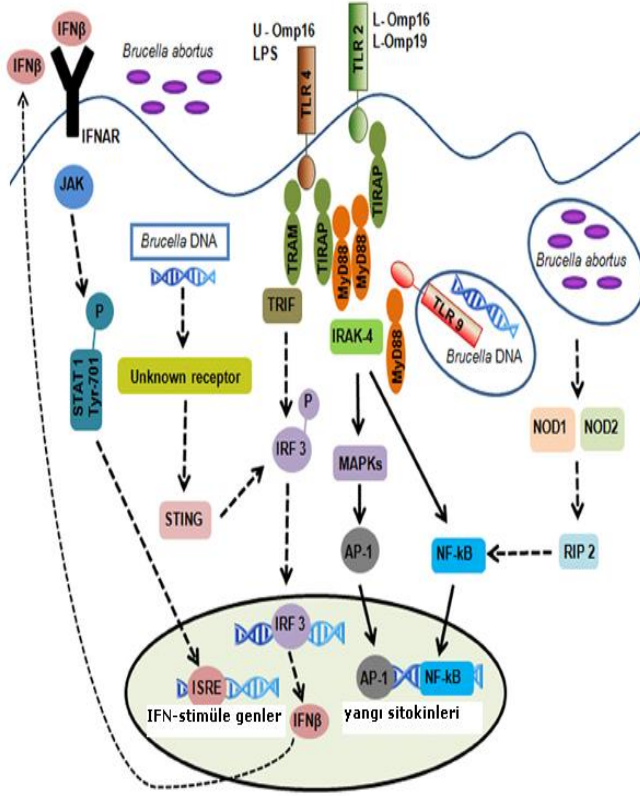
stratejileri arasında yer alır. Şekilde ok işaretleri aktivasyonu, düz çizgiler ise baskılanmayı ifade etmektedir.

### 2.4.1. İmmunopatogenez

Brusellalar gerek non-spesifik gerekse spesifik immün yanıt basamaklarında farklı immünolojik aşamalar sergilerler.

Fakültatif intraselüler *Brusella* etkenleri non-spesifik olarak nötrofiller tarafından yıkımlanmaya direnç gösterirler, makrofaj ve non-profesyonel fagositlerde çoğalarak konak hücreyle uzun süren bir ilişkiyi devam ettirirler. Bu nedenle enfeksiyonun kontrolünde *Brusella*'ya karşı kompleks bir yanıt uyaran çok sayıda hücre ve faktörün etkisi vardır. *B. abortus* enfeksiyonuna karşı korunmada cluster of differentiation (CD8+) T hücreleri dominant bir rol oynamaktadır. Bu korunma temel olarak *Brusella* ile enfekte makrofajların öldürülmesi ve başlıca IFN $\gamma$  gibi tip 1 sitokin ile sağlanmaktadır. IFN $\gamma$  tarafından aktive edilen makrofajlar anti *Brusella* mekanizmasını güçlendirirler ve patojeni yıkımlayarak yayılmasını engellerler. CD8+ T hücrelerinin salgıladığı tip-1 sitokinler T helper 2 (Th2) sitokinlerin ve interleukin (IL)-10'un regülasyonunu baskırlar (Oliveria ve ark., 2010). *Brusella* etkenleri, makrofajlar ve dentritik hücreler gibi profesyonel fagositlerin fagolizozomal birleşmelerini engelleyebilen, fagositlerin içinde yaşamlarını sürdürebilen, hücre içi yaşama adapte olmuş ve asidik çevreye uyum sağlayabilen etkenlerdir. Bu nedenle, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major* vb. hücre içi bakterilerle fonksiyonel olarak ilişkilidirler. Bu organizmalar hücre içinde çoğalabildikleri için bunlara karşı gelişecek olan immün yanıtın hücresel olması gereklidir (Baldwin ve Roop, 2002). Toll like reseptörlerden TLR2, TLR4 ve TLR9'un *Brusella* enfeksiyonunun immünopatogenezinde önemli olduğu belirtilmektedir. *Brusella*ya ait LPS, lipoproteinler (Omp16, Omp19) ve nükleik asit gibi Pathogen Associated Membran Protein (PAMP)'ler ile transmembran reseptör olan Toll Like Reseptör (TLR) uyarılarak Toll Interleukin-1 Reseptör (TIR) adaptörlerinin (Myeloid Differentiation Primary Response Gene (MyD88), toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptör protein (TIRAP), TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  (TRIF), TRIF related adaptör molecule (TRAM) aktivasyonu sağlanır. Bu aktivasyon sonucu çeşitli transkripsiyon faktörleri (nuklear factor, NF $\kappa$ B), interferon regulatory factor (IRF-3,...) aktive olarak IL-12, tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), tip-1 IFN ( $\beta$ ), IFN $\gamma$  gibi

hücrel immün yanıtı uyaran sitokinler salgılanır. Bu sitokinlerin etkileri ile hücre içinde lokalize olan Brusellalar konak hücre tarafından korunduğu için uzun süre yaşamlarını sürdürürler (Oliveria ve ark., 2010).



Şekil 8. *B. abortus* infeksiyonu süresince doğal immünte sinyalleri (Gomes ve ark., 2012).

*B. abortus*'a ait çeşitli yapılar, patojeni tanıyan reseptörler (pPRs) tarafından tanınır. Şekil 8'de TLR2 ve TLR4'ün farklı reseptörlerce tanındığı görülmektedir. TLR aktivasyonu intraselüler sinyal molekülleri olan MyD88 ve interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK-4) aktivasyonuna neden olur. Bunlar da NF-Kb ve MAPKs'yi uyararak yangı sitokinleri oluşumunu başlatırlar.

Kesiksiz oklar Brusella infeksiyonunun kontrolü için gerekli MyD88/IRAK-4 uyarımını sağlayan TLR ve diğer reseptörleri, kesikli oklar TLR, nucleotide binding oligomerization domain-like receptors (NOD)<sub>1</sub>, NOD<sub>2</sub> ve tip 1 IFN reseptör sinyallerini göstermektedir.

*Brucella melitensis*, *B. suis* ve *B. abortus* gibi Brusella türleri makrofaj içerisinde çoğalmakta ve kronik enfeksiyona neden olmaktadır (Bessoles ve ark., 2011).

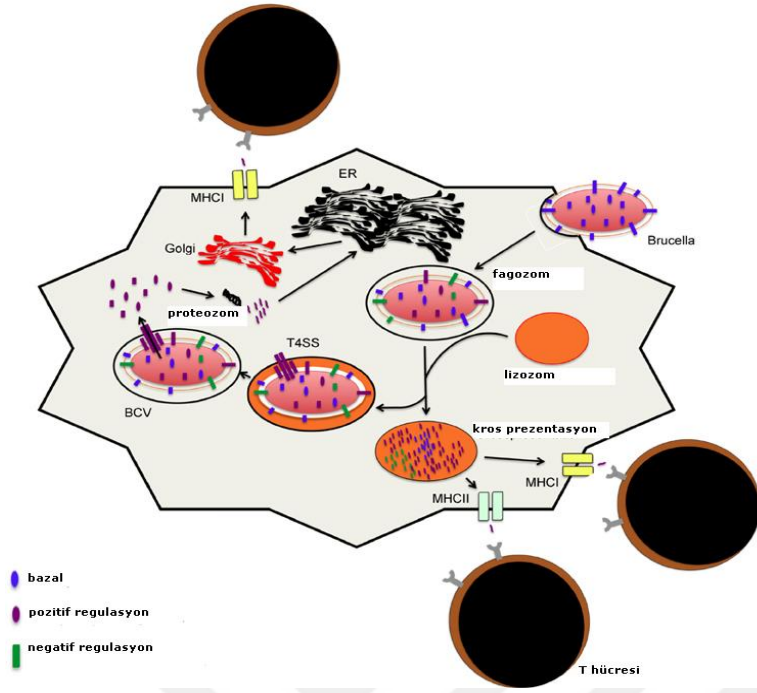
Brusellaların makrofaj içerisinde çoğalmasının CD4+ ve iNKT hücreleri tarafından engellendiği belirtilmiştir. Bu önlenim mekanizması bu hücrelerin makrofaj yüzeyinde CD1d reseptörü ile ilişkisine dayandırılmıştır. Yazarlar bu hücrelerin konak hücre kontrolünü indirekt olarak sitokin salınımına bağlı olarak kazanılmış immün yanıt uyarısına, direkt olarak ise ya infekte hücrelerin eliminasyonu ile ya da bakterilerin öldürülmesiyle sağlanacağını belirtmişlerdir. Brusellanın üremesini engelleyen diğer bir hücre grubu ise  $\gamma\delta$  T hücreleridir. Bu hücreler Brusella inhibisyonunu sitokin ve kemokin sekresyonunu sağlayarak, sitotoksikite ve antibakteriyel etkileri ile meydana getirirler. Bununla birlikte makrofaj ölümünü uyarırlar ve Fas-FasL ilişkisi ile hücre içi bakteri sayısını azaltırlar ve ayrıca  $\gamma\delta$  T hücre alt tipi olan V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T hücreleri ile bakterisidal aktiviteli moleküller salgılayarak Brusellanın hücre içi invazyonunu sınırlandırırırlar (Dudal ve ark., 2006).

Genel olarak antijen sunumu Şekil 9'da gösterilmiştir. Burada, hücre aracılı immün yanıtı, sitotoksik T cell receptor (TCR)  $\alpha\beta$  CD8+ T hücreleri, B hücreleri tarafından oluşturulan IgG2 antikoru, CD4+ ve CD8+ T hücrelerini içeren T hücre reseptörlerinin oluşturduğu IFN $\gamma$ 'yı uyaran Tip 1 veya Th1 sitokinleri oluşturmaktadır. Etkili bir sitokin olan IFN $\gamma$  immün sistem hücrelerinin aktivasyonu sonucu gerçekleşmektedir. Örneğin makrofajlar gibi profesyonel fagositler, hücre içi mikrobiyal patojenlerin üremesini inhibe etme ve öldürme konusunda oldukça etkilidirler. IgG2 antikoru, bağlanma bölgesiyle (fragment crystallizable, Fc) fagositin Fc reseptörüne bağlanarak mikrobiyal fagositozu artırırırlar. Sitotoksik T hücreleri ise infekte hücreleri ya perforin aracılı sitotoksik aktiviteyle veya Fas-Fas ligand etkileşimi ile öldürürler. Geleneksel olarak bu yanıtlar, hücre aracılı veya hücreli immün yanıt şeklinde adlandırılrsa da, IFN $\gamma$  üreten Th1 CD4+ T hücrelerinden orjin alan Tip 1 immünite olarak da isimlendirilebilmektedir (Baldwin ve Roop, 2002). IL-12 Th1 tip, IL-4 ise Th2 tip hücre gelişimine neden olur. Sonuç olarak ısı ile inaktive edilen *B. abortus*, CD4+ T hücrelerini indükleyerek IFN $\gamma$  salgılatır ve Th1 hücrelerini hafıza hücrelerine dönüştürür. CD8+ Tc hücreler ise IFN $\gamma$  salgılatarak Tc1 hafıza

hücrelerine dönüşür ve MHC-peptid bağlantısını oluşturarak hedef hücreyi öldürür (Golding ve ark., 2001).

B lenfositler, antijene spesifik antikolar üreterek, spesifik immun yanıtın humoral kolunu oluştururlar. B lenfositler nötralizasyon etkisini, antijen sunan hücreler tarafından bakterilerin fagositozunu hızlandırarak, makrofajlar, nötrofiller ve NK hücreleri tarafından antikora bağımlı hücrel sitotoksiteyi (ADCC) ve komplementi aktive ederek gösterirler. B lenfositler ayrıca hücrel immüneyi aktive eden antijen sunumunu da gerçekleştirir. Hücre içi bakterilere karşı humoral immun yanıtın etkisi sınırlıdır ve koruyucu değildir. IgM, IgG1, IgG2a ve IgG3 tarafından meydana getirilen antikor aracılı opsonizasyon, bakterilerin fagositik alımını artırarak brusellozis ile enfeksiyonun başlangıç dönemini sınırlar. Enfeksiyonun erken döneminde B lenfositler IL-10 ve transforming growth faktor (TGF) $\beta$  üretir ve bu sitokinler IFN $\gamma$  aracılı Th1 immun yanıtını zayıflatır ve persiste enfeksiyon gelişimine neden olur. B lenfositlerin yokluğu brusellaya karşı antikor bağımsız direnç oluşturur (Skendros ve Boura, 2013 ). Yeni doğan farelere yapılan pasif serum transfer çalışmalarının brusellozise karşı korunmada oldukça önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Örneğin, anti LPS antikoları içeren serumla, farelere yapılan pasif transfer sonucunda, virulent Brusella enfeksiyonuna karşı koruma sağlandığı gösterilmiştir. Hatta, *B. abortus* O polisakkarit-spesifik monoklonal antikor (IgG2a) ile yapılan pasif transferin enfeksiyonu azalttığı ve fareleri enfeksiyona karşı koruduğu tespit edilmiştir. İnfekte farelerden elde edilen, IgG2a ve IgG3 antikor izotiplerinin belirlenmesi brusella enfeksiyonlarında Th1 immun yanıtın rolünü ortaya koymuştur. İnfeksiyon sırasında meydana gelen yüksek konsantrasyonlardaki IgG'ler, komplement ve fagositozla ilişkili olarak ekstrasellüler bakteri lizisini artırmakta, bakterinin intraselüler lokasyonunu sağlayarak enfeksiyonun kalıcı olmasına neden olmaktadır ( Ko ve Splitter, 2003 ).





Şekil 9. Brusella infeksiyonu süresince antijen sunum modeli (Gomez ve ark., 2013)

## 2.5. Seroloji

Hayvan populasyonunda brusellozisin takibi ve eradikasyonu için temel yöntem serolojidir. Hayvanlarda brusellozisin serodiyagnozu için geçerli klasik ve güncel metodlar OIE (2009); Nielsen ve Yu (2010); Geresu ve Kassa (2016) tarafından tanımlanmış, farklılıklara rağmen tüm testler OPS'den zengin antijenlerin kullanımı ile yapılmıştır. Brusella OPS yapısındaki temel element 4,6-dideoksi-4 formamido-D-mannozopyranozil (D-Rha4NFo) olup bu molekülün  $\alpha$  (1→2) ve  $\alpha$  (1→3) ile değişik şekillerde bağlanmasından oluşmuştur (Perry ve Bundle, 1990). Her bir bağlantının farklı Brusella suşlarında oranı  $\alpha$  (1→3) için %0-20 oranında, geri kalan ise  $\alpha$  (1→2) tiptir. Sadece *B. suis* biovar 2 tip suşunun  $\alpha$  (1→3) bağlantısından yoksun olduğu belirlenmiştir (Zaccheus ve ark., 2013). Tüm epidemiyolojik durumlar için tek bir serolojik test mevcut değildir, tek tek hayvanların izlenmesi durumunda sınırlandırmalar mevcuttur. Test metodunun uygunluğu ve test sonuçlarının yorumlanabilirliği ve uygulanabilirliği oldukça önemlidir. S karakterli suşlarla aşılama yapılan alanlardaki yanlış pozitif reaksiyonlar, yabancı suşlardan ve kros-reaktif ajanlardan ileri gelmektedir. Bu nedenle performans özellikleri standardize ve valide metodlarla belirlenmiş önerilen ve alternatif testlere ihtiyaç vardır. Bu amaçla sensitivitesi ve spesifitesi değişken çok

sayıda serolojik test mevcuttur. Bu testlerin sensitivite ve spesifitesinin toplamı performans indeks olarak ifade edilmektedir. Sığırlarda performans indeksi en yüksek testler olarak FPA, ELISA, Buffered Pleyt Aglütinasyon Test ön sırada yer almaktadır (Gall ve Nielsen, 2004). Eradikasyon programlarına göre değişmekle birlikte bu testlerden MRT, ELISA ve RBT tarama testi; CFT, ELISA, CELISA ve SAT doğrulama amaçlı olarak tercih edilen testler arasındadır (Berchovich, 2000; Munoz ve ark., 2005; Nielsen ve ark., 2006).

Tanı antijeni olarak S karakterli bakteriyel antijen kullanıldığında S-LPS'in topolojik düzenlemesi OPS epitoplara antikor ile temasını sağlamaktadır. Bu nedenle S Brusella antijenleri anti-OPS antikorlarını belirler. S Brusella yüzeyi herhangi bir elektriksel yük taşımadığı için aglütinasyon test için uygun bir süspansiyon oluşturur (Gonzalez ve ark., 2008). Gram negatif bakterilerin çoğunluğu antikor bağımsız olarak komplemanı aktive ederken S Brusellalar önemli oranda aktive etmezler ve bu özelliği nedeni ile de CFT'de antijen olarak kullanılırlar (Barquero ve ark., 2007). Ancak R suşlarında OPS olmaması ve yüzey yapısında yüklü ve hidrofobik bölgelerin yer alması bu suşları otoaglütinasyona eğilimli kılar ve komplemanı lektin yolu ile aktive ederler. Bu durum R Brusella antijenlerinin CFT'de test antijeni olarak kullanılması sakıncasını ortaya çıkarır (Fernandez-Prada ve ark., 2001). S-LPS molekülü amfipatik yapısı nedeniyle sıvı ortamlarda agregat olan miselyal yapılar oluşturmaktadır. Bu sayede OPS ile temas gerçekleşirken kor oligosakkarid ve lipid A epitopları ile temas gerçekleşmemektedir (Philips ve ark., 1989). Ancak bunu önlemek amacıyla kor-lipid A bağlantısını hidroliz eden asit uygulamaları, hidrofobik yüzeylere adsorpsiyon uygulamaları lipid A ve kor polisakkaridlerin tanınır olmasını sağlamıştır (Philips ve ark., 1989; Ducrotoy ve ark., 2016). Kor-OPS molekülleri bazen O polisakkaridler olarak adlandırılmakta ve bu antijenler FPA, immünopresipitasyon test, iELISA ve CELISA gibi testlerde kullanılmaktadır (Ducrotoy ve ark., 2016).

R suşlarının Brusella süspansiyonu stabil olmadığından ve RLPS çözülmediğinden dolayı, kor ve lipid A epitoplarına yönelik antikorlar belirlenmemektedir. RLPS ekstraktlarında omp'ler bulunduğundan bu proteinler kor-lipid A tanınmasını önlemektedir. Ancak saflaştırılmış R-LPS ile yapılan uygulamalarda bu mümkündür (Moreno ve ark., 1984). Sığırlarda brusellozisin teşhisi amacıyla kullanılan testlerin karşılaştırması Tablo 3'te görülmektedir.

**Tablo 3.** Sığırlarda brusellozis teşhisi amacıyla kullanılan serolojik testlere ait ortalama performans indeks (PI), standart sapma (SD) ve değişim katsayıları (%CV) (Gall ve Nielsen, 2004)

Test	Test edilen örnek sayısı	Ortalama sensitivite	Ortalama spesifite	Ortalama performans indeks	Standart sapma (Sd)	% değişim katsayısı (CV)
Partikül konsantrasyon floresan test(n = 6)	2,436	91.8	46.7	138.5	21.6	15.6
Kültür (n = 1)	102	46.1	100.0	146.1	MD	MD
Card (n = 11)	6,434	91.0	55.2	146.2	31.3	21.4
Rivanol test (RIV) (n = 12)	4,845	89.6	63.1	152.7	25.3	16.6
Milk ring test (n = 6)	7,328	89.5	74.5	164.0	22.2	13.6
Rose Bengal test (n = 11)	12,146	81.2	86.3	167.6	24.8	14.8
Tüp aglütinasyon test (n = 14)	9,534	75.9	95.7	171.6	20.1	11.7
Komplement fikzasyon (n = 38) test	28,537	89.0	83.5	172.5	24.3	14.1
Pleyt aglütinasyon test (n = 4)	2,754	77.1	96.0	173.1	8.5	4.9
Süt komplement fikzasyon test (n = 1)	2,147	89.0	86.0	175.0	MD	MD
Allerjik deri testi (n = 3)	3,811	78.3	99.7	178.0	14.8	8.3
2-merkapt ethanol test (n = 4)	7,693	88.4	91.5	179.9	21.3	11.8
Polireaz zincir reaksiyonu (n = 5)	539	82.0	98.6	180.6	21.4	11.9
Radial immunodifüzyon (RID) (n = 2)	1,525	90.6	90.0	180.6	18.2	10.1
Floresan test (n = 3)	690	88.1	94.6	182.7	16.9	9.3
Agar jel immunodifüzyon test (n = 1)	156	87.5	100.0	187.5	N/A	MD
Süt floresan polarizasyon test (n = 3)	5,580	88.8	99.2	188.0	11.2	6.0
Kompetitiv ELISA (n = 14)	15,865	97.7	90.5	188.2	16.6	8.8
İndirekt ELISA (n = 37)	60,985	96.0	93.8	189.8	18.1	9.5
Buffered antijen pleyt aglütinasyon test (n = 15)	60,634	95.4	97.7	193.1	6.3	3.3
Süt indirekt ELISA (n = 7)	16,921	97.9	96.1	194.0	5.6	2.9
Kan floresan polarizasyon test (n = 2)	1,385	97.2	98.4	195.6	4.3	2.2
Bulk milk tank floresan polarizasyon test (n = 1)	258	100.0	95.9	195.9	MD	MD
Floresan polarizasyon test (n = 7)	39,934	97.5	98.9	196.4	4.4	2.2

MD: mevcut değil, n: verilerin alındığı kaynak sayısı

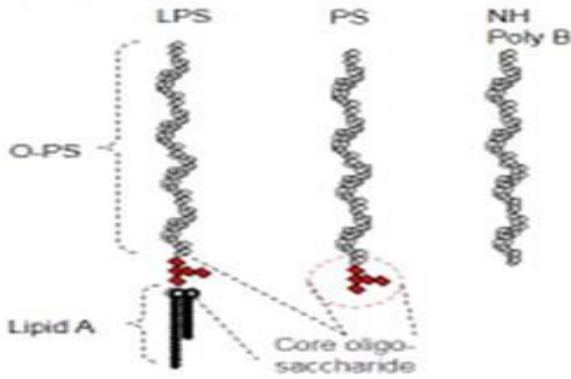
Brucella S19 ve *B. melitensis* Rev1 aşılı hayvanlarda LPS'e karşı T bağımlı yanıt sonucu IgM, IgG1, IgG2 ve düşük miktarlarda IgA yanıtının belirlendiği ve 4-7 gün gibi çok kısa sürede IgM/IgG dönüşümünün olduğu bildirilmiştir. Derialtı aşıya göre göz içi yapılan aşılama sonrası antikor seviyesinin 2-3 ay sonrasında azaldığı belirlenmiştir (Nicoletti, 1977). İmmun yanıtı etkileyen diğer faktörler antijenik uyarımın devamlılığı ve şiddetine bağlı olarak antikor titresi ve süresi üzerinde etkilidirler. S19 aşılı sığırlarda anti S-LPS antikorların affinitesi infekte hayvanlardan daha düşük bulunmuştur. Monoklonal antikorlar ile yapılan çalışmalar IgG'nin eşik değerinin immunopresipitasyon>aglutinasyon>ELISA sıralaması şeklinde olduğudur. İmmun yanıt süresince titre ve aviditedeki değişiklikler konjuktival aşıda neden antikor yanıtının düştüğünün göstergesidir (Blasco, 1997; Plommet ve Fensterbank, 1984). Konjuktival aşı ile aşımın lenfatik sistem ile dağılımı azalır. İmmün sistem uyarım süresi ve şiddeti oluşan antikor yanıtını belirlediğinden infekte hayvanlarda protein antijenlere karşı oluşan immün yanıt daha güçlüdür.

RB51 aşısı yapılan hayvanlarda O antijenine karşı immün yanıtın IgG3 ve IgG2a izotipde olduğu belirlenmiştir. Yüksek IgG2a ile düşük IgG1 veya IgG1 olmaması immün yanıtın bazı dönemlerde Th1 tipte olacağını göstermiştir. *B. abortus* infeksiyonu sığırların serum ve sütlerinde IgM, IgG1, IgG2a ve IgA izotipte antikorların üretilmesini sağlamaktadır. IgM kısa sürede üretilmekte ancak IgG oluşumundan kısa süre sonra azalmaktadır. IgM birçok serolojik testte belirlenmekte ve yanlış pozitifliklere neden olmaktadır. IgG1 ise Brusella'ya maruz kalan sığırlarda devamlı yüksek oranda üretilmektedir. RB51 aşı suşu O antijenine karşı daha çok IgG2a ve IgG3 izotipte antikor oluşturmamaktadır, IgG1 izotipde antikor oluşturmamaktadır (Nielsen ve Yu, 2010; Jenner ve ark., 2011).

### **2.5.1. Antijenik yapı**

Gram negatif hücre duvarına sahip Brusella türlerinin hücre duvarının dış kısmında LPS bulunur (Şekil 11). LPS yapıda koloni şeklini belirleyen OPS, suşların smooth veya S suşları olarak tanımlanmasını sağlar (McGiven ve ark, 2015). Brusella dış membranındaki LPS'in yapısı R ve S morfolojisi şeklinde farklılık arz etmektedir. S yapıdaki LPS molekülünün O zinciri N formyl perozamin (N-formyl-4-amino-4,6-dideoxy mannose) homopolimerinden ibaret iken, R karakterindeki koloniler O zincir içermeyen LPS molekülüne sahiptir. Brusellozisin serolojik teşhisinde O-zinciri, S

Brusella suşlarına maruz kalan hayvanlarda immunodominant antijen olarak merkezi bir rol oynar. Yaygın olarak kullanılan tüm serolojik testler O-zincirine spesifik antikorları tespit edebilmektedir (Moriyon ve Lopez-Goni, 1998; Cardoso ve ark., 2006; Moreno, 2014).



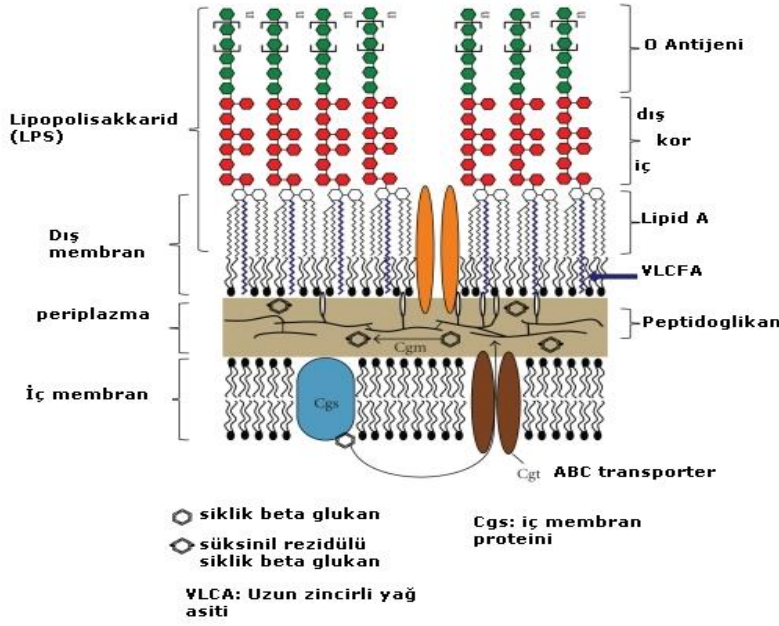
Şekil 10. S-LPS, kor- OPS ve natif haptene yapıları ( Ducrotoy ve ark., 2016)

Nativ haptene veya polisakkarid B olarak adlandırılan OPS Şekil 10'da görüldüğü üzere serbest polisakkaridler olup merkez polisakkarid'e ait yapıları bulundurmazlar. Bu yapılar hücre duvarı oluşumunda rol oynayan O polisakkarid prekürzörlerini ve hidrojen bağları ile ilişkili S-LPS molekülleri arasında dış membranda bulunan bağımsız komponentleri içerir (Gonzalez ve ark., 2008). Polisakkarid B, *B. melitensis* 115 R mutant suşundan elde edilmiş (Lord ve ark., 1989), Brusella'nın immunojenik olmayan periplazmik  $\beta$ -glukanları olarak, jel immunofiltrasyonda total olarak tanınan Bundle ve ark. (1988), *B. melitensis* 115'in O polisakkaridinin ABC transporter (wzm) gen mutasyonu ile oluşan hücre içi membranında prekürzör olarak öneme sahip bir molekül olarak belirtmektedirler (Cloeckert, 1992; Adone ve ark., 2011). İmmunopresipitasyon test için uygun olan NH'ler sıcak-su ekstraktlarından kolaylıkla elde edilebilmektedir(Ducrotoy ve ark., 2016).

Ruminant brusellozisi için en uygun antijenler S-LPS, haptene polisakkaridler (OPS, kor polisakkaridi, natif haptene ve polisakkarid B) ve protein antijenlerdir ( Şekil 10). LPS'in OPS'sine karşı immunoglobulin M (IgM) ve IgG yapıda antikorlar oluşurken, haptene polisakkarid ve proteinlere karşı hem hücresel immünite hem de humoral immünite gelişmektedir (Ducrotoy ve ark., 2016). Monoklonal antikor

çalışmaları OPS'ye karşı A, M ve C olarak adlandırılan 3 reaktif yapının belirlendiğini orta koymuş Douglas ve Palmer (1988), A yapının 5 ya da daha çok devamlı şeker ünitesi içeren alfa ( $\alpha$ ) (1→2) yapıda olduğu ve bu yapının da *B. abortus* biovar 1,2,3 ve 6 ile *B. suis* 1,2 ve 3'de bulunduğu; M yapının hem  $\alpha$  (1→2) hem de  $\alpha$  (1→3) varlığı ile ilişkili olup *B. melitensis* biovar 1 için spesifik olduğu belirlenmiştir. C olarak ifade edilen yapı *Brucella-Yersinia enterocolitica* O:9'da ortak olarak yer alan ve common (yaygın) ifadesindeki C'yi ifade eden bir sembol olarak belirtilmiş ve Yersinia ile benzerliği sebebiyle C/Y olarak ifade edilmiştir. Burada 4 veya daha fazla  $\alpha$  (1→2) bağlı şeker ünitesi bulunmaktadır. Birçok farklı özellikte overlapping epitopların (A>M, A=M veya A<M) mevcudiyeti nedeniyle infekte hayvan serumlarında farklı spesifitede antikorlar mevcuttur (Weynants ve ark., 1997). Bu özelliklere göre S Brusella tür ve biovarlarının A, M spesifik anti-serumlarla tanımlamaları yapılmakta ancak serolojik teşhis amacıyla yararlanılmamaktadır. S Brusella infeksiyonunda antikorların büyük bir çoğunluğu OPS'ye karşı olup, bu antikorlar ayrıca C epitopuna karşı da reaktiftir. Bu durum A ve M biovarları tarafından oluşturulan infeksiyonların ayırımını engellemektedir (Alonso-Urmeneta ve ark., 1998; Tittarelli ve ark., 2005). Kros reaksiyonların  $\alpha$  (1→2) yapıdaki ünite sayılarındaki azalmaya bağlı olarak azaldığı artışa bağlı olarak ise arttığı krosreaktif sığır serumları ile yapılan iELISA çalışmalarında gösterilmiştir. *Yersinia enterocolitica* O:9'un O polisakaridinde  $\alpha$  (1→3) bağlı üniteler bulunmamaktadır (McGiven ve ark., 2015). Kros reaksiyonlar ya NH antijen kullanımına bağlı testlerle veya yarışmalı testler olan kompetitif ELISA ile ya da in vivo deri test uygulamaları ile belirlenebilmektedir. Bu testler gerçek negatiflikleri tespit ettiğinden spesifik testler olarak da bilinirler (Munoz ve ark., 2005; Nielsen ve ark., 2006). Kor ve lipid A epitopları ile ilişkili olarak Brusella R-LPS'i ile *Ochrobactrum* spp. gibi bazı diğer  $\alpha$ -2 proteobakteriler arasında da kros-reaksiyon gözlenebilmektedir (Velasco ve ark., 1997). Dış membran proteinleri 1980'lerin başlarında ekstrakte edilerek moleküler ağırlıklarına göre gruplara ayrılmıştır. Grup-1 (88-94kDa), grup-2 (36-38kDa) ve grup-3 (25-27kDa, 31-34kDa) outer membran protein (Omp)'ler olarak klasifiye edilmiştir (Cloeckert ve ark., 2002; Vizcaino ve Cloeckert, 2012). Daha sonra bu proteinler monoklonal antikor ile tanımlanmış ve rekombinant olarak bazıları üretilmiştir. Bunlardan bazıları Omp2a, Omp2b, Omp25 ve Omp31 ile küçük molekül ağırlıklı ve lipoprotein olarak da Omp10, Omp16 ve Omp19

proteinleri olarak tanımlanmıştır (Tibor ve ark., 1999). Brusella türleri arasında Omp proteinleri yönünden Omp21 ve Omp31'de sınırlı bir varyasyon mevcuttur. Bu varyasyon *B. abortus*'da omp31 geninin olmaması, diğerleri ise küçük epitopik farklılıklar şeklinde ortaya çıkmaktadır (Vizcaino ve Cloeckert, 2012). Şimdiye kadar S Brusella türlerinde protein antijenlerinde belirgin farklılıkların olmaması total protein ekstraktların tanı-teşhis amacıyla kullanılabilceğini göstermektedir (Ducrotoy ve ark., 2016). Bu proteinler doğal konaklarında zayıf immunojen olmakla birlikte farelerde daha immunojendir ve bazıları hücresel immün yanıtta rol oynamaktadır. Özellikle Cu/Zn, süperoksit dizmutaz (SOD), brusella hücre yüzey proteini (BCSP31) ve BP26 periplazmik proteinlerinin oldukça iyi immunojen olduğu belirtilmektedir (Vizcaino ve ark., 1996; Ko ve Splitter, 2003). İlave olarak ribozomal L7/L12 proteininin de antijenik olduğu hatta gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olduğu belirlenmiştir (Oliveira ve ark., 1994). GroS ve GroL stres proteinlerinin de immunojenik olduğu belirlenmiş ancak koruyucu olup olmadığı konusunda netlik sağlanamamıştır. Stoplazmik proteinlerden SsB, UvrA, bakterioferritin, p15, p17, p39 stoplazmik proteinlerinin immunolojik rolleri tam olarak belirlenememiştir (Vizcaino ve Cloeckert, 2012; Gomez ve ark., 2013). Çeşitli ekstraksiyon yöntemleri denenerak elde edilen antijenlerle yapılan western blot çalışmaları sonucunda ayırım özelliği olan 3 protein invazyon protein B (InvB), DNA starvation-faz koruyucu protein ve Cu/Zn süperoksit dismutaz belirlenmiştir. Tanı çalışmaları için Cu/Zn süperoksit dismutaz üzerine yoğunlaşmış ancak diyagnostik açıdan yeterli olmayan değişken sonuçlar elde edilmiştir (Ducrotoy ve ark., 2016).



Şekil 11. Brucella LPS yapısı(Haag ve ark, 2010)

## 2.6. Moleküler özellikler

Brucella genomu 2 kromozoma sahip olup, genetik bilginin bir bölgeden başka bir gen bölgesine taşınmasında sorumlu olan insersiyon sekans (IS) elementleri taşır. IS elementleri Brusellanın her iki kromozomunda bulunur. Tüm Brucella türleri pozisyonu ve sayısı 8-35 arasında türlere göre değişen ve IS711 (IS6511) olarak adlandırılan genetik elementi taşırlar. Örneğin *B. abortus* RB51'de wboA geni IS711 ile bölünmüştür ve bu gendeki dizilime bakılarak ayırım yapılmaktadır. Gen farklılıkları baz alınarak çok sayıda PZR ile Brucella ayırımları yapılmıştır. Gen bankasında çeşitli fonksiyonları bilinen 50 den fazla gen mevcuttur. Bunların bazıları groES, groEL, dnaK gibi şaperonlar, 16SRNA, 23SRNA deoksiribonükleik asit (DNA) sekanslarıdır (He Y, 2000). Brusellanın moleküler özellikleri, daha iyi tanımlanmaları, virülens özelliklerin belirlenmesi, tür ve biyovar farklılıklarının ortaya konulması, aşı ve infeksiyon suş ayırımı gibi amaçlarla yapılmaktadır. Bu amaçla en yaygın uygulamalar AMOS PCR, Bruce-ladder PCR, BaSS PCR, aşı suşları *B. abortus* S19, *B. melitensis* Rev-1 ve RB51 ayırımını yapan multipleks PCR ile çeşitli virülens ve IS711 elementlerini belirleyen PZR işlemleridir (Bricker ve ark., 2003; Gupta ve ark., 2014). Brusellalar tür ve biyotip ayırımlarına rağmen klasik yöntemler ile suşlar düzeyinde izlenememektedir.



Brusellanın tür ve biyovar düzeyinde tanımlanması fenotipik özelliklerine göre yapılabilmekte ancak tiplendirme amacıyla kullanılan reaktiflerin standardizasyonunun olmayışı nedeniyle sonuçların değerlendirilmesinde güçlüklerle karşılaşmaktadır. Biyotiplendirme sonuçlarının orta düzeyde olması ve canlı etkene ihtiyaç duyulması sebebiyle moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Brusellanın moleküler tiplendirilmesi amacıyla çok sayıda yöntem kullanılmaktadır. Az sayıda polimorfizm nedeniyle çoğu genetik teknikler ile türler içerisindeki suşların ayırımı oldukça güçtür. Bu alanda en iyi yaklaşımlardan biri multi lokus variable number tandem repeat analysis (MLVA)'dır (Whatmore, 2009). MLVA, lokal epidemiyolojilerin ve infeksiyon çıktığında retrospektif olarak sonuçların değerlendirilmesinde hala ilk tercih olarak önem taşımaktadır. MLVA harici diğer moleküler yöntemler alttür düzeyinde sınırlı bilgi vermesi itibarı ile tercih edilmemektedir. Brusella tür ve biyovarlara günümüzde MLVA tiplendirme yöntemi ile 16 genetik bölge temel alınarak detaylı olarak tiplendirilmektedir. Onlarca MLVA Brusellada bildirilmekte ise de pratik, ekonomik ve kullanım kolaylığı açısından MLVA lokus sayısı minimumda tutularak değerlendirme yapılmalıdır. Şu ana kadar 8, 10, 11, 15, 16 ve son olarak da 21 lokus araştırmalarda kullanılmıştır. MLVA sayıları içerisinde, 16 değişken tandem tekrar bölgelerinin belirlenmesi ile Brusella izolatlarının izlenmesinin mümkün olduğu belirtilmektedir (Bricker ve ark., 2003; Le Fleche ve ark., 2006). Brusella MLVA veritabanı 2006 yılında Fransa'nın Orsay şehrinde Paris Sud Üniversitesinde geliştirilmiştir. O zamandan beri düzenli olarak literatür verileri eklenmektedir (Scholz ve Vergnaud, 2013). Bakterilerde sıralı olarak (tandemly) tekrar sekansları minisatellit (9 bp ve üzeri) ve mikrosatellit (8 bp'e kadar tekrar ünitesi) bulunmaktadır (Vergnaud ve Pourcel, 2006). Mini ve mikrosatellit tekrarların kombinasyonları Brusella gibi monomorfik bakteri türlerinin alttiplendirilmesi açısından oldukça ayırıcıdır (Bricker ve ark., 2003; Whatmore ve ark., 2006; Le Fleche ve ark., 2006). MLVA-16<sub>Orsay</sub> olarak adlandırılan bu MLVA genotiplendirme sistemi, 8 adet minisatellit ve 8 adet de mikrosatellit marker içermektedir. Minisatellit markerlardan türlerin belirlenmesi, mikrosatellitlerden ise alttürlerin ayırımı amacıyla yararlanılmaktadır. Satelitleri oluşturan DNA dizileri 2 panele ayrılarak lokus numarasına göre adlandırılmaktadır. Panel-1'i oluşturan minisatellit markerlar Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45 ve Bruce55 iken, Panel 2'yi

oluşturan mikrosatellitler 2A (Bruce18, Bruce19 ve Bruce21) ve 2B (Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16 ve Bruce30) olarak iki grupta değerlendirilmiştir. Dünyada insan ve hayvan orijinli Brusella izolatlarının bulunduğu ve karşılaştırmaların yapılabildiği bir web sitesi mevcuttur (<http://mlva.u-psud.fr>). MLVA16 panelleri ile 4000'ün üzerinde Brusella izolatı ile ilgili bilgilere internet veri tabanından ulaşmak mümkündür (Garofolo ve ark., 2013; Scholz ve Vergnaud, 2013).

## 2.7. Klinik

Sığırlarda *B. abortus* gebeliğin 2'nci döneminde abortlara, erken doğuma, plasentanın içeride kalmasına, steriliteye, lenfoplazmositik mastitis ve lenfogranüloma oluşumuna neden olur. Brusellozis de patognomonik bir belirti yoktur. Brusella infeksiyonu klinik açıdan 3 basamakta değerlendirilir. İlki patojenin konak hücreye girişinden 2 güne kadar süreyi içeren işgal dönemidir. Bu dönemi, patojenin retiküloendotelial ve üreme sisteminde çoğaldığı 2 günden 3 haftaya kadar süren akut faz izler. Kronik faz olarak adlandırılan son dönemde patojen çeşitli dokularda 6 aya kadar hatta 1 yıl ve üzeri sürelerde farklı patolojik değişiklikler meydana getirir (Grillo ve ark, 2012). Kronik dönemde bakteri sayısı 7-12 hafta içinde maksimum seviyesine ulaşır. Sonra bakteri sayısı azalır ve Brusella elimine edilir (Martirosyan ve Gorvel, 2013).

## 2.8. Teşhis ve tedavi

Brusellozisin kesin ve güvenilir teşhisi için hem direkt hem de indirekt metodların kullanımı gereklidir (Wankee, 2004). Direkt yöntemler olarak etkenin kültürü, dokulardan histokimyasal veya immunohistokimyasal ve moleküler yöntemler ile tespiti yapılmaktadır. Bu yöntemlerden kültürün sensitivitesi düşük olmakla birlikte gold standart olarak kabul edilmektedir. Moleküler yöntemler olarak cins spesifik, tür spesifik basit veya multipleks özellikli çok sayıda PZR metodları, hibridizasyon, mikroarray, biosensör ve loop mediated isothermal amplification (LAMP) testleri geliştirilmiştir (Gupta ve ark., 2014; Geresu ve Kassa, 2016). İndirekt serolojik testler olarak konvansiyonel ve primer bağlanma testleri geliştirilmiştir. Konvansiyonel testler, çeşitli modifikasyonları mevcut olan çabuk ve yavaş aglütinasyon testleri, presipitasyon ve komplement fikzasyon testleridir. Sensitivitesi daha yüksek olan primer bağlanma testleri ise enzim, floresan ve radyoaktif işaretli test yöntemleri olup enzimatik olanların

ELISA modifikasyonları günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (Nielsen ve Yu, 2010). O'Grady ve ark (2014), %16.5 oranında kültür pozitif olguları S-LPS antijenine dayalı serum aglutinasyon test (SAT), komplement fiksasyon test (CFT), iELISA, cELISA ve flouresan polarizasyon testleri (FPA) ile negatif bulduklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu durumun latent taşıyıcı hayvanlardan kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bu nedenle duyarlılığı artırmak amacıyla her iki yöntemin birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Brusella çoğu antibiyotiğe duyarlı olmasına rağmen tedavinin pratik olmaması ve pahalı olması sebepleri ile sığırlarda tercih edilmemektedir. Bu nedenle aşılama ve kontrol önlemleri koruma amacıyla birlikte değerlendirilmektedir (He Y, 2000).

## 2.9. Korunma

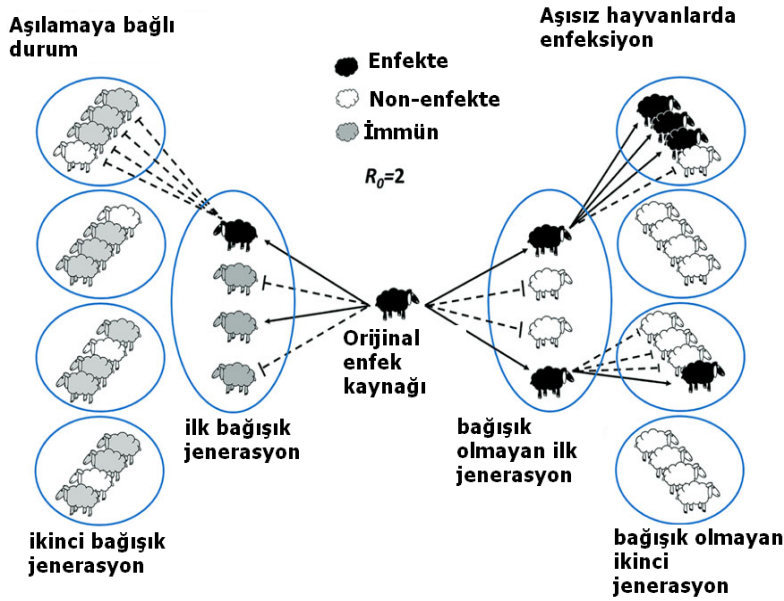
Brusella etkenlerinin ve bulaşma şekillerinin belirlenmesinden dolayı, brusellozisin kontrol ve eradikasyonu için primer önlemler alınmıştır. Bunlardan ilki sütün pastörizasyonu ile bulaşmaların önlenmesidir. İkincisi infekte hayvanları tespit edebilen tanı tekniklerinin belirlenmesidir (Alton ve ark., 1988). Üçüncüsü sığır, koyun ve keçileri koruyan aşılarda geliştirilmesidir. Bunların dışında bakteri yoğunluğunu azaltma amacıyla hayvanların kesimi ve imha edilmesi en uygun yol olmakla birlikte prevalansın yüksek olduğu alanlarda pahalıdır ve pratik değildir (OIE, 2009). Brusellozisin kontrol edildiği ülkelerde aşağıda belirtilen işlemler uygulanmıştır.

1. Canlı aşılarda (*B. abortus* S19, *B. melitensis* Rev 1) ile yeterli immünizasyonlar (tek doz ve azaltılmış doz ile aşılama)
2. Yaygın korunma oranının oluşturulması
3. Uygun tanı testlerinin kullanımı
4. İnfekte hayvanların uzaklaştırılması
5. İnfekte sürülerden sağlıklı sürülere nakillerin kontrolü (Moreno ve Moriyon, 2006; Ebel ve ark., 2008).

Bu ölçütlere uyarak virulent Brusellaların genetik havuzu daraltılmış ve birçok ülkede brusellozis eradike edilmiştir.

Günümüzde brusellozisin önlenmesine yönelik olarak S19, Rev1 ve RB51 aşılarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu aşılarda istenilen sonuçları elde etmede hala yetersiz kalmaktadır. *Brucella abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev1 S suşları ile etkili koruma sağlanabilmekle birlikte, hala bazı problemler bulunmaktadır. Bu aşılarda suşları

gebe hayvanlarda aborta neden olabilmekte ve aşılanmış hayvanların sütleri ile saçılabilir. Ayrıca benzer antijenik yapılar içerdiklerinden teşhiste aşılanmış hayvanlar ile enfekte hayvanların ayırımı yapılamamaktadır. *B. abortus*'un R mutantından hazırlanan RB51 aşısı, yapısında O polisakkarid içermemesi nedeniyle infeksiyondan ayırımının mümkün olması, stabil ve S suşlarından hazırlanan aşılar daha az virulent olması avantajlarına rağmen rifamisin dirençli olması ve farklı hayvan türlerinde immünizasyon etkinliğinin tartışmalı olması nedeniyle yeni aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Rekombinant DNA aşıları, subünit protein aşılar, mutant ve kimerik aşılar yoğun olarak hazırlanan aşıları oluşturmaktadır. Ancak bazıları ile immün yanıt uyarımı yönünden iyi sonuçlar alınmasına rağmen korunmada muadillerinden daha iyi sonuçlar elde edilememektedir (Oliveria ve ark., 2010).



**Şekil 12.** Sürü bağışıklık teorisi ve Brusella sürü infeksiyonlarında temel reproduktif oran ( $R_0$ ) (Moreno E, 2014)

$R_0$ , enfekte bir bireyden tamamen duyarlı bir popülasyona aktarılan sekonder infeksiyonların ortalama sayısı. Bulaşmanın olabilmesi için  $R_0$  değerinin 1 ve üzerinde olması gerekir. Şekil 12'de  $R_0$  değeri 2 olduğunda aşı yapılmamış popülasyon ile aşılanmış popülasyon arasındaki bulaşma durumu gösterilmektedir.

O antijeninin koruyucu etkinliği, pasif olarak farelerde anti-O monoklonal antikor deneysel uygulamalarında ve aktif olarak O antijen veya smooth LPS taşıyıcı protein konjugat uygulamalarıyla belirlenmiştir. Koruyucu etkinliğin antikor aracılığı ile de

mümkün olduğu belirlenmiştir. S Brusella suşlarında dış membran proteinlerin tanınırlığı OPS ile engellense de Omp yüzey proteinleri bakteri hücre yüzeyinde bulunur.

Genel olarak buzağı aşılmasından sonra, S19 olgun düvelerin üreme sisteminde kalıcı olmaması ve aborta yol açmaması nedeniyle tercih edilmektedir. Bununla birlikte nadiren de olsa bazı sığırlar, kronik olarak infekte olabilmekte ve bu da abortla sonuçlanabilmektedir. Aşı suşu bu hayvanların sütleriyle de saçılabilir. MacDiarmid (1987), sığırların üreme döneminden evvel aşılması sonucu süt örneklerinin %10'undan ve abortların %1,5'inden S-19 izole etmiştir. Erkeklerde, genç dönemde S-19 aşısı kalıcı antikor titresine, testis infeksiyonuna ve infertiliye sebep olmuştur. Saha şartlarında aşıları sığırların virulent suşlarla infeksiyona karşı %82-95 oranında koruma sağladığı ancak, aşı etkinliğinin bakterinin artan miktarlarına bağlı olarak oransal oranda düştüğü şeklinde görüş hakimdir (Ducrotoy ve ark., 2016).

1996 yılından beri kullanılan RB51 aşısının wboA geninde IS elementi bulunduğundan glikoziltransferaz sentezi gerçekleştirememekte ve O antijeni oluşmamaktadır. RB51'in S19'a üstünlüğü anti-O antikorlarının oluşmamasıdır. Bu üstünlük S suşları ile infeksiyonun serolojik olarak ayırımını sağlamaktadır. Ayrıca OPS içermemesi kros-reaksiyonların oluşmaması yönünde teşhis açısından önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Sığırlarda brusellozisten korunma amacıyla *B. abortus* S19 suşundan hazırlanan canlı aşının farklı uygulama yolları mevcuttur. Aşı uygulamalarında amaçlardan biri yüksek düzeyde koruyuculuğun sağlanması, diğeri de aşıya bağlı immün yanıt ile infeksiyona bağlı immün yanıtın ayırımıdır. Ülkemizde de *B. abortus* S19 aşısının 2012 yılından evvel deri altı uygulamaları yapılmaktaydı. Deri altı uygulama yolu ile bu aşıya karşı oluşan immün yanıt ile infeksiyona karşı gelişen immün yanıtı ayırmak mümkün olamamaktadır. 2012 yılından itibaren infeksiyonun eradikasyonu amacıyla bu aşının konjunktival uygulamalarına başlanılmıştır. Bu uygulama yolu ile bakteri yüzey molekülü olan major antijen lipopolisakkaride karşı uzun süreli humoral yanıt tespit edilememektedir. Bu durumda hücresel immün yanıt gelişimi olmakta ancak in vivo yöntemin yeterli hassasiyette olmaması nedeniyle in vivo yöntemden yani deri içi uygulamalardan başarılı sonuçlar alınamamaktadır (Ducrotoy ve ark., 2016). Bu nedenle in vitro olarak hücresel immün yanıt takibini

yapabilecek yöntem ve antijenlere ihtiyaç bulunmaktadır. Araştırmalar bu amaçla in vitro spesifik IFNg yanıtının önemine işaret etmektedir.

Bu çalışmada eradikasyon programı kapsamında *B. abortus* S19 ile konjunktival olarak aşılı buzağı ve 1 yıl sonra rapel yapılmış düvelerde immün yanıtın hem humoral hem de hücresele yönden takibi amaçlandı. Humoral immünyanıt tespiti amacıyla materyal ve yöntem bölümünde açıklandığı üzere LPS antijenine yönelik IgG ve IgA izotip antikor yanıtı araştırıldı. Hücresele immünyanıt takibi amacıyla brusellerjene karşı IFNg sitokinindeki değişiklikler izlendi. Aşığı takiben 46, 85 ve 169. günlerde alınan sonuçlar immünyanıtın bu süre zarfında izlenmesinin nasıl bir sonuç verdiğini gösterdi.

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Pozitif ve Negatif Serumlar**

Test optimizasyonlarında ve test içi kontrol amacıyla anti-Brucella antikorları yönünden pozitif (Brucella izolasyonu yapılmış hayvanlardan), negatif (Brusellozis ari sürü olup, Brucella kültürü negatif olan) ve aşı durumu bilinen (*B. abortus* S19 ile subkutan aşılanmış ve aşı sonrası 2-3-4-5 ve 6. aylara ait kan serum örnekleri ) sığır kan serumları OMÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD koleksiyonlarından kullanılmıştır.

##### **3.1.2. Antijenler**

In vitro spesifik stimülasyon antijeni olarak brusellerjen ve nonpesifik poliklonal immunstimülant olarak concanavalin A (ConA) kullanıldı. Araştırmada anti-Brucella antikorların belirlenmesi için *B. abortus* S19 aşığı suşundan hazırlanan LPS antijeni kullanıldı.

### 3.1.3. Konjugatlar

Serumlarda bulunan antikorların tespiti için alkaline phosphatase (AP) enzimi ile konjuge edilmiş tür spesifik antiserumlar(anti-bovine IgG, IgA) ile sandviç ELISA da streptavidin alkalenfosfataz kullanıldı. Serumda kros reaktif ajanlardan *Y. enterocolitica* O:9 ve *E. coli* O157:H7 ile çapraz reaksiyonları belirlemek amacıyla kompetitif ELISA testinde primer antikorları tanıyan alkalenfosfataz ile işaretli anti tavşan IgG ve anti-fare IgG ticari konjugatları sekonder antikorlar olarak kullanıldı.

### 3.1.4. Substratlar

ELISA testlerinde oluşan antijen-antikor kompleksinin belirlenmesi için spesifik enzim konjugatlarından (örneğin alkaline fosfataz enzimi bağlanmış antiserumlar) yararlanıldı. Testin son aşamasında ELISA için sıvı faz substratı para nitro-phenyl-phosphat (pNPP) kullanıldı.

### 3.1.5. ELISA Pleytleri

İndirekt ve kompetitif ELISA testleri için (Nunc, polysorp) mikropleytleri, sandviç ELISA için bağlanma kapasitesi yüksek (high binding özellikli) ELISA pleytleri kullanıldı.

### 3.1.6. Kan örnekleri

Araştırmada kullanılmak üzere, *B. abortus* S-19 ile konjuktival olarak aşılanan 60 sığırdan aşağıda belirtilen program dahilinde kan alındı. Materyal olarak değerlendirilen kan örnekleri Tokat Dimes Süt Sığır İşletmesinden temin edildi. Buna göre;

Grup 1: İlk kez aşılanan (3-5 aylık) 30 buzağıdan aşılama öncesi, aşılamayı takiben 46, 85 ve 169. günlerde serum ve plazma eldesi için kan alındı.

Grup 2: Bir yıl önce aşılansın 15-17 aylık 30 sığırdan 2. aşılama öncesi, 2. aşı uygulamasını takiben 46, 85 ve 169. günlerde toplam 4 kez kan alınarak hem serum eldesi hem de plazma eldesi için kan alındı.

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Lipopolisakkarid (LPS) Antijeninin Hazırlanması

ELISA'da immunglobulin izotiplerinin belirlenmesi ve izlenmesi amacıyla kullanılan LPS antijeni sıcak su/ fenol metoduna göre aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

*B. abortus* S19 suşundan hazırlanan sıvı kültürün inaktivasyonunu takiben Brusella kültürü 10 g olacak şekilde ayrıldı. 10 g yaş hücre 66 °C'de 34 ml distile suda çözüldü ve %90'lık fenol solüsyonundan 38 ml ilave edilerek 20 dakika karıştırıldı. Karışım 4 °C'ye soğutuldu ve takiben 13 000 x g de 15 dakika santrifüje edilerek fenol faz (alt tabaka) enjektör ile alındı ve Whatman no 3 filtre kağıdı ile filtre edildi. Elde edilen filtrata 3 hacim sodyum asetat ile doyurulmuş %1 lik metanol ilave edildi. Karışım bir saat boyunca 4°C'de bekletilerek 6 000 x g de 15 dakika santrifüje edilerek çökelti elde edildi. Çökeltiye 16 ml distile su ilave edilerek ve 4°C'de 1 gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Takiben 10 000 x g de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant ayrıştırıldı. Çökelti üzerine yeniden 16 ml distile su ilave edilerek 1 saat karıştırıldı ve tekrar 10 000 x g de 15 dakika santrifüje edilerek süpernatant alındı. Ribonükleaz, DNaz ve proteinaz K'nın her birinden 10-20 µg ilave edilerek 20 C'de 18 saat inkübe edildi. Metanol presipitasyonu ile elde edilen çökelti yeniden çözdürüldü. Distile suya karşı diyalize edilerek lyofilize edildi. Liyofilize LPS tartılarak 1 mg miktarında stoklar hazırlanarak -20 °C'de kullanılıncaya kadar muhafazası sağlandı.

### 3.2.2. Brusellerjen Hazırlanması

Brusellerjen, *B. melitensis* B115 suşundan hazırlanan ve yapısında LPS içermeyen bir protein karışımıdır. Araştırmada in vitro stimülasyon amacıyla kullanıldı. Brusellerjen OCB olarak adlandırılan bu protein ticari olarak Fransa (Rhone-Merieux, batch 26N151)'dan temin edildi. Hücresel immün yanıtta duyarlı kan hücrelerinin uyarılması amacıyla kullanılan antijenlerin hazırlanması ve konsantrasyon tespiti aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.



### **3.2.3.Konsantrasyon tespiti**

Brusellerjenin konsantrasyonu spektrofotometrik olarak 2mg/ml olarak belirlendi. In vitro stimülasyon amacıyla pozitif kontrol olarak mitojen ConA, negatif kontrol olarak ise PBS kullanıldı. ConA'nın 2ug/ml konsantrasyonda kullanılması durumunda IFNg sekresyonunun optimal olduğu yapılan ön çalışmalarda belirlendi. Brusellerjen, ConA ve phosphate buffer saline (PBS) her bir kan örneği için kullanıldı. Humoral immün yanıt tespiti amacıyla kullanılan LPS'in optimal konsantrasyonu 5ug/ml olarak belirlendi.

### **3.2.4. Örneklerden Hücresel İmmun Yanıt Belirlenmesi**

#### **IFNg İçeren Plazma Örneklerinin Eldesi**

Laboratuvara getirilen antikoagülanlı sığır kanları her bir stimülant için 1.0 ml miktarında hücre kültür kaplarına aktararak karbondioksitli etüvde hücrelerin uyarımı sağlandı. Antikoagülanlı kan örnekleri kontrol olarak ConA lektini ile aşya karşı immün yanıt ise brusellerjen ile uyarıldı. Uyarı dozu Akhvlediani ve ark. (2012), tarafından uygulandığı şekilde brusellerjen için 10 ug/ml, ConA için ise 2 ug/ml olarak belirlendi. Bu immunojenlerle 18-24 saatlik inkübasyon sonunda her bir kan örneği santrifüj edilerek plazma elde edildi. Bu plazma örneklerinde bulunan IFNg miktarı sandviç ELISA ile değerlendirildi.

#### **IFNg Kantitatif ELISA (Quantitative Enzyme Linked İmmuno Sorbent Assay) Uygulamaları**

Genç ve ark (2015), tarafından geliştirilen ve 6 ay için geçerliliği gösterilen IFNg sandviç ELISA prototipi plazma örneklerindeki IFNg konsantrasyonunu belirlemek amacıyla kullanıldı. Bu amaçla monoklonal anti-IFNg antikorlarının ELISA pleytlerine 0.05M karbonat/bikarbonat tamponu (coating buffer) ile dilüsyonları yapıldı. Üstleri örtülen pleytler 4°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra, phosphate buffer saline tween (PBST) (%0.05 Tween-20 içeren PBS) tamponu ile yıkandı. Mikropleyitin tüm kuyularına bloking solusyonundan (Albumin fraction V) 200 ul ilave edilerek 37 C de 1 saat inkübe edildi. Süre bitiminde yıkama solusyonu ile yıkanarak testin belirleyebileceği uygun konsantrasyon aralığının tespiti için rekombinant bovine IFNg'nın 10pg-10ng/ml dilüsyonlarından pleyte ilave yapıldı. Bu işlem sonunda, pleytler 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Kuyular tekrar PBST ile yıkandıktan sonra,

biotin ile konjuge monoklonal anti-IFN $\gamma$  antikorların uygun konsantrasyonundan ilave yapıldı. 37 °C’de 30 dakika inkübe edilen kuyular PBST ile yıkanarak ve kuyulara 100 $\mu$ l streptavidin alkale fosfataz solüsyonu ilave edilerek 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Kuyular tekrar PBST ile yıkandıktan sonra, substrat 4-nitrofenil fosfat disodium (pNPP) ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası pleytlerin ELISA okuyucu ile 405 nm’de absorbans değerleri tayin edildi. Plazma örnekleri yukarıda anlatılan basamaklardan rekombinant IFN $\gamma$  ilavesi esnasında eş zamanlı olarak diğer kuyucuklara ilave edilerek sonuçlar aynı pleytte karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Sandviç ELISA testinde cut-off belirlenmesi amacıyla negatif kontrol olarak kan örnekleri PBS ile, pozitif kontrol olarak ise ConA ile uyarılmış örneklerden elde edilen optical density (OD) değeri baz alınarak Stimülasyon Index parametresine göre değerlendirildi.

#### **IFN $\gamma$ Kantitatif ELISA Sonuçlarının Yorumlanması**

Gerek ilk kez aşılanelarda, gerekse 1 yıl sonra 2. kez aşılanelan sığırlarda immünyanit durumu örnek alınma zamanına göre ifade edilmiştir. Brusellerjene bağılı olarak oluşın IFN $\gamma$  durumu, Stimülasyon İndeks (SI) bazında değerlendirilerek pozitiflik karşılaştırmaları ve ortalama SI değerleri hesaplanarak ifade edildi.

#### **3.2.5. Humoral İmmun Yanıt Uygulamaları**

##### **Kalitatif ELISA**

Kalitatif ELISA, Genç ve ark (2010), bildirdikleri şekilde yapıldı. Bu amaçla ELISA pleytleri LPS antijenler ile uygun konsantrasyonlarda coating buffer vasıtasıyla pleytlere kaplandı. Tüm kuyulara 200  $\mu$ l bloking solüsyonu (PBST-FG, %1 Fish gelatine içeren PBST) ilave edilerek 37°C’de 1 saat inkübe edilerek bloking işlemin yapıldı. Kuyulara PBST-FG ile 1/100 oranında dilüsyonları hazırlanan serum örneklerinden 100  $\mu$ l eklenerek 37°C’de inkübe edildi. PBST ile 4 kez yıkanan tüm kuyulara AP (Alkale Fosfataz) ile konjuge edilmiş anti-bovine Ig lerinin uygun dilüsyonlarından 100 $\mu$ l ilave edilerek 37°C’de inkübe edildi. Yıkama işlemini takiben kuyulara 100 $\mu$ l pNPP substrat solüsyonu ilave edilerek 37°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası pleytlerin ELISA okuyucu ile 405nm’de absorbans değerleri tayin edildi.

Testlerin sensitivite ve spesifite belirlenmesi amacıyla OMÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı koleksiyonunda bulunan, pozitif serum örnekleri olarak *B. abortus* S-19 ile derialtı aşılanmış ve aşığı takiben 2, 3, 4, 5 ve 6 aylarda alınmış kan örnekleri ile Brusella izolasyonu yapılmış hayvanlardan alınan kan serum örnekleri ile 5 yıldır Brusellozis bildirilmeyen ve kültür negatif olduğu belirlenmiş hayvan serumları negatif serum örnekleri olarak kullanıldı. Receiver Operating Characteristic (ROC) analizi ile testlerin cut-off değerleri oluşturularak testlerin sensitivite ve spesifite belirlendi.

Aşılama öncesi alınan kanlardaki pozitifliklerin gerçek pozitiflik durumunu aydınlığa kavuşturmak için *Y. enterocolitica* O:9 ve *E. coli* O157:H7'den ayırımı amacıyla kompetitif ELISA uygulamaları yapıldı.

### **Kompetitif ELISA**

Gerek IgG gerekse IgA ELISA'da spesifite %93.3 olarak belirlendiğinden incelenen serumlarda pozitifliğin kros-reaktif ajanlardan ileri gelme olasılığı minimuma indirgenmiş oldu. Ancak bu oran düşük olsa da seropozitifliğin kros-reaktif ajanlardan (*Y. enterocolitica* O:9 ve *E. coli* O157:H7) ileri gelip gelmediğinin belirlenmesi amacıyla aşılama öncesi pozitif bulunan serumlar *Y. enterocolitica* O:9 ve *E. coli* O157:H7 reaktifliği yönünden değerlendirildi. Test kısaca aşağıda belirtildiği gibi uygulandı.

- 1- Pleytler Brusella LPS antijeni ile kaplandı.
- 2- Bloking işlemi %1 FG+%0.05 Tween-20 içeren PBS ile yapıldı.
- 3- Serumlar (yani incelenen serum ve anti *Y. enterocolitica* O:9 ve anti *E. coli* O157:H7 içeren serumlar) ELISA pleytlerine konularak 37°C'de 1.5 saat inkübasyona bırakıldı.
- 4- Konjugat ilavesi: Farklı kuyulara anti-rabbit/anti-mouse/anti-bovine işaretli konjugatlar ilave edildi.
- 5- Substrat ilavesi: Konjugatlar alkalın fosfataz işaretli olduğundan pNPP substrat ilavesi ile reaksiyon gelişimi sağlandı ve belli süreler ile ELISA okuyucuda okunarak sonuçlar değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

Çalışmada ilk kez aşılanan 3-5 aylık 30 buzağı ile 15-17 aylık dönemde 2.kez aşılanan 30 sığırdan aşı öncesi, aşı sonrası 46, 85 ve 169. günlerde kan alınarak serum ve plazma koleksiyonları oluşturuldu. Serolojik testler için buzağı ve sığırlardan 120'şer olmak üzere toplam 240 kan serum örneği elde edildi. Hücresel immun yanıt takibi amacıyla brusellerjen ile kontrol olarak ConA ve PBS ile uyarılan kanlardan elde edilen plazma örnekleri değerlendirildi. Bu amaçla toplam 240 plazma örneği elde edildi. Tüm örnekler kullanılmaya kadar -80°C'de muhafaza edildi.

### 4.1. İndirekt IgG ve IgA ELISA

Testlerin sensitivitelerinin ve spesifiteilerinin belirlenmesi amacıyla OMÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı koleksiyonunda bulunan, pozitif serum örnekleri olarak *B. abortus* S-19 ile derialtı yol ile aşılanmış, aşılama öncesi ve aşırı takiben 2, 3, 4, 5 ve 6. aylarda alınmış kan örnekleri ile Brusella izolasyonu yapılmış hayvanlardan alınan kan serum örnekleri ve 5 yıldır brusellozis bildirilmeyen ve kültür negatif olduğu belirlenmiş sığır kan serumları negatif serum örnekleri olarak kullanıldı. ROC analiz ile testlerin cut-off değerleri oluşturularak testlerin sensitivite ve spesifiteileri belirlendi. Cut-off belirlenmesi amacıyla referans serum koleksiyonundan 30 pozitif 15 negatif serum kullanıldı. Cut-off değeri IgG için 0.50, IgA için ise 0.65 olarak belirlendiğinde spesifite her ikisi için %93.3, sensitivite IgG için %96.7 ve IgA için ise %93.3 olarak belirlendi ve buna göre Tablo 1 ve 2'de belirtilen sonuçlar elde edildi.

#### 4.1.1. IgG ve IgA ELISA Sonuçları

**Tablo 4.** İlk kez ve 1 yıl sonra 2. kez konjuktival olarak *B. abortus* S19 ile aşılanmış buzağı ve sığırlarda IgG ve IgA sonuçları

Örnekleme zamanı (aşılama sonrası gün)	IgG, GI test sonuçları				Örnekleme zamanı (aşılama sonrası gün)	IgG, GII test sonuçları		
	Neg.	Poz.	%poz	P		Neg.	Poz.	%poz
0	23	0	0 <sup>a</sup>	-	0 <sup>b</sup>	14	16	53.3
46	0	23	100	0.3771	46	01	29	96.6
85	18	05	21,8	0.0353*	85	15	15	50
169	13	10	43,5	0.0522	169	09	21	70

Örnekleme zamanı (aşılama sonrası gün)	IgA, GI test sonuçları				Örnekleme zamanı (aşılama sonrası gün)	IgA, GII test sonuçları		
	Neg.	Poz.	%poz	P		Neg.	Poz.	%poz
0	25	0	0 <sup>c</sup>	-	0 <sup>d</sup>	26	04	13.3
46	19	6	24	0.1626	46	27	03	10
85	17	8	32	0.0008*	85	30	0	0
169	11	14	44	0.0914	169	20	10	33.3

Group-I (GI) IgG sonuçları, 3-5 aylık yaşta konjuktival aşılanan buzağular; Grup-II (GII), *B. abortus* S19 ile aşılamaadan 1 yıl sonra tekrar konjuktival aşılanan sığırlar

a: 7 örnek kompetitif ELISA ile reaktif bulunduğundan bu örnekler çalışmaya dahil edilmedi

b,d: Grup II'deki örnekleme zamanı 3-5 aylık yaşta aşılamaadan 1 yıl sonra tekrar aşılanan sığırlarda aşı sonrası zamanı ifade etmektedir

c: 5 örnek kompetitif ELISA ile reaktif bulunduğundan bu örnekler çalışmaya dahil edilmedi

Bu sonuçlar aşı takibi amacıyla kullanılan antijenlere dayalı humoral immun yanıtın bağışıklığın uzun süre takibi için yeterli olmadığını gösterirken, 46. günde IgG yanıtının gençlerde %100 ve erginlerde %96.6 oranında tespit edilmesi araştırmanın ilk 46 günlük döneminin bağışıklığın izlenmesi açısından önemli olabileceğine işaret etmektedir. Örneklemenin yapıldığı diğer günlerde düşük düzeyde bir immun yanıt belirlenmiş, monitoring veya diyagnostik amaçla kullanılabilecek sonuçlar elde edilememiştir.

## 4.2. Kompetitif ELISA

Aşı öncesi döneme ait örneklerdeki pozitifliklerin kros-reaktif ajanlardan (*Y. enterocolitica* O:9 ve *E. coli* O157:H7) ileri gelip gelmediğinin belirlenmesi amacıyla serumlar *Y. enterocolitica* O:9 ve *E. coli* O157:H7 reaktifliği yönünden değerlendirildi. Değerlendirilen örneklerin 7'si IgG yönünden ve 5'i IgA açısından pozitif bulunduğundan bu örnekler araştırmada değerlendirme dışı tutuldu.

## 4.3. Hücresel İmmun Yanıt

Çalışmada immunojen olarak brusellerjen kullanıldı. Sandviç ELISA testinde cut-off belirlenmesi amacıyla negatif kontrol olarak kan örnekleri PBS ile, pozitif kontrol olarak ise ConA ile uyarılmış örneklerden elde edilen OD değeri baz alınarak hesaplandı. IFNg konsantrasyonu belirlenerek sonuçlar OD olarak ifade edildi. Buradan elde edilen sonuçlara göre cut-off durumu SI olarak belirlendi ve  $SI \geq 2.5$  değeri hücresel uyarım için pozitif kabul edildi.

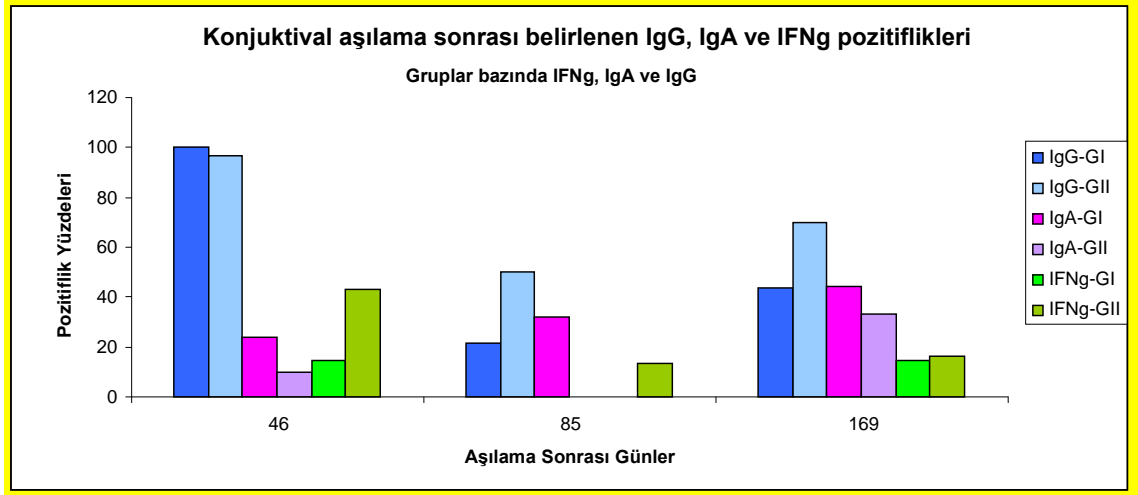
Buna göre incelenen örnekler ve sonuçlar aşağıda Tablo-2'de sunulmaktadır. Araştırmada IFNg sonuçlarının bağışıklık yanıtın izlenmesinde gruplar arasında önemli olmadığı belirlendi. Genel olarak tüm gruplarda %13.3-43.3 oranında pozitiflik belirlendiğinden (Tablo 2) bu oranların aşı takibi amacıyla kullanılacak yeterlilikte olmadığı sonucuna varılmıştır.

**Tablo 5.** Aşılı buzağı ve sığırlarda stimülasyon indekse göre IFNg sonuçları

Gruplar	örnekleme zamanı (gün)	negatif	pozitif (%)	SI (AM±SD)	P
Grup-I	0	21	0 (0)*	-	-
	46	18	3 (14.3)	4.6±0.60	0.0278*
	85	21	0 (0)	-	0.0812
	169	18	3 (14.3)	3.47±0.30	0.8231
Grup-II	0	26	4 (13.3)	4.65±0.44	
	46	17	13(43.3)	5.34±1.33	
	85	26	4 (13.3)	7.5±1.01	
	169	25	5 (16.6)	6.5±0.48	

Grup-I ve Grup-II deki IFNg sonuçları

\*: Dokuz (9) örneğin 7'si kros-reaktif, 2'si hemolizli olduğundan çalışmaya dahil edilmemiştir



Şekil 13. İki farklı grupta aşılama sonrası zamana bağlı olarak IgG, IgA ve IFNg pozitiflik yüzdeleri

## 5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Aşı kontrolü ve aşı etkinliğinin belirlenmesi için aşıli hayvanların takibi amacıyla diyagnostik testlerin geliştirilmesi önemlidir. Aşıli hayvanların uzun süre tespit edilebilmesi veya belirli zaman dilimlerinde tespiti amacıyla çeşitli natif ve rekombinant antijenler kullanılmaktadır (Denoel ve ark., 1997; Yang ve ark., 2007). Brusella aşı veya enfeksiyon suşu uyarımından sonra oluşan hücresel immun yanıt bilgileri korunma açısından mihenk taşlarını oluşturmakta ancak aşı ile ilgili olarak çok sınırlı kalmaktadır. Bazı pratik avantajları ve test sonuçlarının yorumlama kolaylığı ve spesifitesinin yüksekliği nedeniyle IFNg testi tercih nedenidir. Brusellin ve bazı spesifik proteinler *B. abortus* RB51 ve *B. melitensis* B115 gibi R özellikli Brusella suşlarından seçilmekte, in vitro ve in vivo stimülasyon için uyarı antijenleri olarak kullanılmaktadır (Weynants ve ark., 1995; Denoel ve ark., 1997; Adone ve ark., 2008). *B. abortus* ve *B. melitensis* benzer genoma sahip olduklarından brusellerjen (Brucellerjen OCM) (S-LPS den arı) (Wareth ve ark (2015) ve içeriğinde bulunan omp antijenleri immunojenik olduğundan (Blasco ve ark., 1994; Cha ve ark., 2010) stimülant antijen olarak kullanılmaktadır. Brusellin uygulamalarına bağlı gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunun sensitivitesi %70-75 düzeyindedir. *B. abortus* enfeksiyonunun veya aşı durumunun brusellin deri testi uygulaması brusellozisin infekte sürüden eradikasyonunu sınırlandırır (Macdiarmid, 1987). In vivo uygulamalar aşı ve enfeksiyon bulunmayan alanlarda spesifik bir test olarak önerilmektedir. In vitro hücresel immunité testleri

pratik olmasının yanında duyarlı olması ile de in vivo testlere tercih edilmektedir. Ancak spesifik bir uyarıcının olmaması ve erken dönemde değişken yanıtların oluşması nedeniyle standart bir test ve yöntem geliştirilememiştir.

Türkiye’de ve dünyada brusellozis kontrol programlarında *B. abortus* S19 aşısının konjunktival uygulamaları eradikasyon programlarında tercih edilmektedir. Dünyada yaygın olarak kullanılan S19 aşısının izlenmesi ile ilgili olarak tespit zamanı, test yöntemi ve kullanılacak antijenler ile ilgili kesin bir uzlaşma mevcut olmadığından farklı öneriler sunulmaktadır. Benzer olarak yapılan bir çalışmada Perez-Sancho ve ark. (2014) tarafından *B. melitensis* Rev-1 ile aşılanan koyunlarda aşılama sonrası 60-180 gün içerisinde IFNg yanıtının %10-50 arasında değiştiiği bildirilmiştir. Araştırmacılar 1 yıl sonra eprüvasyon yaparak 42 gün IFNg yanıtını izlemişlerdir. Perez-Sanco ve ark., (2014) benzer yaptıkları bu çalışma ile rapel uygulama sonrası 46. günde immün yanıt araştırmışlardır. Araştırmacılar %40-70 oranında IFNg yanıtını belirlerlerken bizim çalışmamızda rapel sonrası 46. günde alınan örneklerde %13.3-40.3 oranında bir pozitiflik belirlendi. Ancak ilk kez aşılanan buzağılarda bu oran %0-13.3 olarak oldukça düşük bulundu. Bir aylık dönemden sonra hücresel immün yanıtta bazı değişkenliklerin olduğu ileri sürülmektedir(Nielsen ve Yu, 2010; Ducrotoy ve ark., 2016). Nitekim sonraki dönemlerde bu oranların artmadığı 85. günde kaybolduğu görülmektedir. Weynants ve ark. (1995) IFNg test yönteminin infeksiyonu çok erken ve yüksek oranda tespit edebilmesi sebebiyle sığır brusellozis eradikasyon programlarına katkı sağlayacağını bildirmiştir. Ancak bu çalışma kapsamında Şekil 13’te de gösterildiği gibi aşılama sonrası ilk 46 gün için sonuçları takip etmek mümkün olmamıştır. En yüksek yanıt rapel yapılan ergin grupta 46. günde %43.3 olarak belirlendi sonraki dönemlerde %20’nin altında sonuçlar elde edildi. Test sonuçlarındaki değişkenlikler S19 aşıllı hayvanların izlenmesini sınırlandırmakta ve S19 aşı uygulaması yapılan hayvanların tarama testleri ile belirlenmesini önlemektedir. Cha ve ark (2010) immün yanıtı *B. abortus* suşlarının omp’leri ile 5 hafta içerisinde belirlediklerini bildirmişlerdir. Dorneles ve ark. (2015) ise, *B. abortus* S19 ve RB51 ile aşılanan buzağılarda IFNg yanıtının 28 günde belirlendiğini ve 1 yılda azaldığını açıklamışlardır. Bu çalışmada ilk 30 güne ait örnekler mevcut olmadığından bu zamana yönelik bağışıklık ve tespit oranı ile ilgili yorum yapmak mümkün olmamıştır. IFNg, infeksiyonun erken döneminde ve fazla sayıda olguda tespit edilmesi bilgisine rağmen Weynants ve ark (1995), bu



çalışmada buzağılarda %0-14.3 ve erginlerde %13.3-40.3 oranında ve aşı sonrası grup-2 de 86. günde kaybolduğunu belirttiler. Bu sonuçlar Weynants ve ark (1995) ile Dorneles ve ark (2015)'nin sonuçları ile belirlenen zaman aralığı açısından uyuşmamaktadır. Sonuçlar üzerindeki farklılıklar örnek alınma sürelerinin araştırmacılarındaki ile uyum içinde olmaması, sınırlı olması ve brusellerjen içeriğindeki farklılıktan kaynaklanabileceği kanısını ortaya koymaktadır. Bu konudaki eksikliklerin ortaya konulması için araştırma aşılama sonrası ilk 2 aylık süreyi içerecek şekilde organize edilmelidir.

Aşılı ve infekte hayvanlarda brusellozisin serolojik teşhisi amacıyla farklı testler ve SLPS, RLPS, OPS, natif hapten polisakkaridi, OMP, sitozolik proteinler, BP26 gibi çeşitli antijenler önerilmektedir. Testlerin spesifitelerini artırmak amacıyla özellikle ELISA'da farklı spesifitede epitoplara yönelik monoklonal antikolar, kaotropik ajanlar ve aşı uygulanmayan alanlarda brusellin deri testi önerilmektedir (Nielsen ve ark., 2004; Munoz ve ark., 2005). Araştırmada bağışıklık yanıtının izlenmesinde IgG ve IgA sonuçlarında 85.günde gruplar arasında istatistiki yönden önemli bir farklılık ( $P<0.05$ ) belirlenirken, 46. günde IgG için ( $P=0.3771$ ), IgA için ( $P=0.1626$ ) ve 169. günde IgG için ( $P=0.0522$ ), IgA için ise ( $P=0.0914$ ) olarak belirlendi (Tablo 4). IgG ve IgA için istatistiki olarak önemli farklılığın gözlemlendiği 85. günde farklılığın nedeninin izotip değişiminden kaynaklanabileceğini akla getirmekte ancak aynı dönemde elde edilen IFNg sonuçları bu farklılığın hücresel immün yanıt gelişimine neden olmadığını göstermiştir. Elde edilen sonuçlar bu durumun aydınlığa kavuşturulması için bu araştırma ile aynı dönemleri içerecek şekilde Ig izotip ve hücresel immün yanıt gelişiminin birlikte izleneceği çalışmaların yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. IFNg açısından değerlendirildiğinde, 46. günde istatistiki yönden önemli bir farklılık ( $p<0.05$ ) belirlenirken 85. ve 169. günde bu farklılığın olmadığı belirlendi (Tablo 5). Bu dönemde gözlenen istatistiki farklılık, ilk kez aşılanan buzağılarda %14.3, rapel yapılan sığırlarda %43.3 oranında IFNg tespitinden kaynaklanmıştır. Diğer dönemlerde önemli farklılık gözlenmemesi gruplar arasında düzenli ancak düşük düzeyde bir immün yanıtı ifade etmektedir. Bu sonuçlar aşı takibi amacıyla kullanılan antijenlere dayalı hücresel immün yanıtın bağışıklığın takibi için yeterli olmadığını gösterirken, 46. günde IgG yanıtının gençlerde %100 ve erginlerde %96.6 oranında tespit edilmesi araştırmanın ilk 46 günlük döneminin bağışıklığın takibi açısından önemli olabileceğine işaret etmektedir (Şekil 13). Ancak bu sonuçlar IgA

izotipi yönünden yorumlanamaz. Benzer olarak Chand ve ark. (2015), konjuktival *B. abortus* S19 ile aşılanan 336 hayvanı 3 ay süresince RBT ile inceledikleri çalışmada maksimum yanıtı %79.2 olarak ilk 3 haftada belirlerlerken sonraki 6 haftada %29.2 ve 9 hafta sonra da %4.2 olarak ve son örnekleme zamanı olan 12. haftada antikor belirleyemediklerini bildirmişlerdir. Bu çalışma 2 ayrı grupta yapılmış ve sonuçlar birbiri ile uyumlu bulunmuştur. Diğer bir çalışmada Perez-Sancho ve ark (2014), *B. melitensis* Rev-1 ile aşılanan koyunları 60-180 gün boyunca izlemişler RBT ve CFT sonuçlarına göre %20-60 oranında tespitini yapıldığı açıklamışlardır. Bu hayvanlar 1 yıl sonra eprüve edilmiş ve immun yanıt 42 gün izlenmiştir. Bu dönemde humoral immun yanıt %90 olarak belirlenmiştir. Bu oranlar Perez-Sancho ve ark (2014), ile benzerlik göstermiş ve 1 aydan sonra bazı değişkenliklerin olduğu ileri sürülmüştür.

Aşılı hayvanların immun yanıtının takibi açısından aşılama sonrası süre ve serolojik test sonuçları göz önüne alındığında bu çalışmadaki IgG sonuçları daha yüksek ve IgA sonuçları ise beklenilenden daha düşük bulundu. Bu durum örnekleminin yapıldığı dönemde mukozal ve hücrel immuniteden ziyade IgG kaynaklı humoral yanıtın uyarıldığını göstermektedir. Stevens ve ark (1994), ise deri altı S19 ile aşılanan sığırlarda maksimum pozitifliği 6 hafta boyunca CFT ile %100 olarak belirlediğini açıklamışlardır.

Bu çalışma hücrel ve humoral immun yanıtta rol alabilecek yeni antijenlerin belirlenmesi ve ilk 46 gündeki yanıtın hücrel ve humoral açıdan izlenmesi ile *B. abortus* S19 aşısına karşı oluşan bağışıklığın izlenmesinin daha anlamlı olabileceğini göstermektedir. Bu tez çalışması sonucunda aşağıda belirtilen durumlar gerçekleşmiş ve ileriye yönelik yapılabilecek öneriler aşağıda sunulmuştur.

Gelecekte brusellozis de ayırımı sağlayacak yeni antijenlerin belirlenmesi ile araştırmadaki yöntemler kullanılarak diyagnostiklerin geliştirilmesi mümkün olabilecektir.

Bu araştırma brusellozis immunolojisine yönelik immün yanıt süresi ve immunglobulin izotiplerine yönelik yararlı bilgiler sunmuştur.

Araştırmada mukozal immün yanıt tespiti için IgA ELISA'nın optimizasyonları yapılarak %93.3 sensitivite ve %93.3 spesifitede bir model oluşturulmuştur. Bu model ile sığırlarda brusellozis aşısı ve infeksiyon durumlarına yönelik mukozal immün yanıt takibi yapılabilecektir.

Hücresel immüntenin önemli ölçütlerinden biri olan IFNg'nın tespiti yapılmış, gelecek araştırmalarda diğer sitokinleri tespit edebilecek modellerin geliştirilmesine imkan sağlanmıştır.



## KAYNAKLAR

- Adone R, Francia M, Ciuchini F. Evaluation of *Brucella melitensis* B115 as rough-phenotype vaccine against *B. melitensis* and *B. ovis* infections. *Vaccine* 2008;26: 4913–4917.
- Ahmed W, Zheng K, Liu Z-F. Establishment of chronic infection. *Brucella's* stealth strategy. *Front Cell Infect Microbiol* DOI: 10.3389/fcimb.2016.00030.
- Akhvlediani T, Chitadze N, Laws TR, Makharadze M, Chubinidze M, Tsanova TS, Commander NJ, Perkins SD, Dyson EH, Rivard RG, Hepburn MJ, Simpson AJ, Imnadze P, Trapaidze N. Comparison of total antibody and interferon- $\gamma$  T-cell responses in patients following infection with brucellosis in Georgia. *J Infect Public Health* 2012;5(5):321-31.
- Al Dahouk S, Scholz HC, Tomaso H, Bahn P, Göllner C, Karges W, Appel B, Hensel A, Neubauer H, Nöckler K. Differential phenotyping of *Brucella* species using a newly developed semi-automated metabolic system. *BMC Microbiol* 2010;269(10):1471-2180.
- Al Dahouk S, Nöckler K, Scholz K, Tomaso H, Boqumil R, Neubauer H. Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of *Brucella* infections. *J Immunol Methods* 2006;309: 34–47.
- Alonso-Urmeneta B, Moriyón I, Diaz R, and Blasco JM. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Brucella* native hapten polysaccharide and smooth lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2642-2646.
- Alonso-Urmeneta B, Marin CM, Aragon V, Blasco JM, Diaz R, Moriyon I. Evaluation of lipopolysaccharides and polysaccharides of different epitopic structures in the indirect enzymelinked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis in small ruminants and cattle. *Clin Diag Lab Immunol* 1998; 5: 749–754.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. France, INRA. 1988.
- Anon. Brusellanın konjunktival aşısı ile kontrol ve eradikasyonu projesi. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 2012/03 nolu genelgesi, 13.01.2012.
- Anon. The Merck Veterinary Manual. Aiello SE, Mays A, (Eds). Eighth Edition, Whitehouse station, NJ, USA: Merck & CO 1988.
- Baldi PC, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Abdon LF, Velikovskiy CA, Kittelberger R, Fossati CA. Humoral immune response against lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella abortus* in cattle vaccinated with *B. abortus* S19 or experimentally infected with *Yersinia enterocolitica* serotype 0: 9. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3:472-476.
- Baldwin CL, Roop RM. *Brucella* Infections and Immunity. New York, Springer US. 2002;255-279.
- Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzman-Verri C, Chacon-Diaz C, Rucavado A, Moriyon I, Moreno E. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PloS One* 2 DOI:10.1371/journal.pone.0000631

- Bercovich Z. The use of skin delayed-type hypersensitivity as an adjunct test diagnose brucellosis in cattle. *Vet Quart* 2000;22(3):123-130.
- Bessoles S, Ni M, Garcia-Jimenez S, Sanchez F, Lafont V. Role of NKG2D and its ligands in the anti-infectious activity of Vgamma9Vdelta2 T cells against intracellular bacteria. *Eur J Immunol* 2011; 41:1619–1628.
- Blasco JM. A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med* 1997; 31: 275–283.
- Blasco JM, Garin-Bastuji B, Marin CM, Gerbier G, Fanlo J, Jimenes de Bacques MP, Cau C. Efficacy of different Rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet Rec* 1994; 134(16):415–420.
- Bricker BJ, Ewalt DR, Olsen SC, Jensen AE. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the Brucella AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15(4):374-378.
- Bricker BJ, Halling SH. Enhancement of the Brucella AMOS PCR Assay for Differentiation of *Brucella abortus* Vaccine Strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol* 1995; 33(6):1640–1642.
- Brooks-Worrell BM, Splitter GA. Antigens of *Brucella abortus* S19 immunodominant for bovine lymphocytes as identified by one- and two-dimensional cellular immunoblotting. *Infect Immun* 1992; 60(6):2459-2464.
- Bundle DR, Cherwonogrodzky JW, Perry MB. Characterization of Brucella polysaccharide B. *Infect Imm* 1988; 56: 1101–1106.
- Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC. *Brucella spp* noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories* 2006, 5:13 doi:10.1186/1475-2859-5-13.
- Cassataro J, Pasquevich K, Bruno L, Wallach JC, Fossati CA, Baldi PC. Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough *Brucellae*. *Clin Diag Lab Immunol* 2004; 11: 111–114.
- Carter GR, Wise DJ.(eds). *Brucella in Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. 6th Edition Virginia, Wiley-Blackwell.2004; 290.
- Cha S-B, Rayamajhi N, Kang M-L, Lee W-J, Shin M-K, Yoo H-S. Comparative study of gamma interferon production in mice immunized with outer membrane proteins and whole bacteria of *Brucella abortus*. *Jpn J Infect Dis* 2010; 63: 49-51.
- Chand P, Chhabra R, Nagra J. Vaccination of adult animals with a reduced dose of *Brucella abortus* S19 vaccine to control brucellosis on dairy farms in endemic areas of India. *Trop Anim Health Prod* 2015; 47: 29-35.
- Cloekaert A, Debarh HS, Vizcaino N, Saman E, Dubray G, Zygmunt MS. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* bp26 gene coding for a protein immunogenic in infected sheep. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 140:139-144.
- Cloekaert A, Kerkhoffs P, Limet JN. Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis: Immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3168.

- Coad M, Hewinson RG, Clifford D, Vordermeier HM, Whelan AO. Influence of skin testing and blood storage on interferon-gamma production in cattle affected naturally with *Mycobacterium bovis*. *Vet Rec* 2007; 160 (19):660-662.
- Connolly JP, Comerci DJ, Alefantis TG, Walz A, Quan M, Chafin R, Grewal P, Mujer CV, Ugalde RA, DelVecchio VG. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *Proteomics* 2006; 6: 3767–3780.
- Çelik Ü ve Kocabaş E. Tüberküloz tanısında yeni bir yöntem: İnterferon-gama araştırmasına dayanan testler. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2007; 55 (1): 108-117.
- De Miguel MJ, Marin CM, Munoz PM, Dieste L, Grillo MJ, Blasco JM. Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1458-1463.
- Denoel PA, Vo TK, Tibor A, Weynants VE, Trunde JM, Dubray G, Limet JN, Letesson JJ. Characterization, occurrence, and molecular cloning of a 39-kilodalton *Brucella abortus* cytoplasmic protein immunodominant in cattle. *Infect Immun* 1997; 65(2):495-502.
- Diaz-Aparicio E, Aragon V, Marin C, Alonso B, Font M, Moreno E, Perez-Ortiz S, Blasco JM, Diaz R, Moriyon I. Comparative analysis of *Brucella* serotypes A and M and *Yersinia enterocolitica* O:9 polysaccharides for serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep, and goats. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3136-3141.
- Dorneles EMS, Sriranganathan N, Lage AP. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Vet Res DOI:10.1186/s13567-015-0199-7*, 2015.
- Ducrotoy MS, Alvarez RC, Blasco JM, Moriyon I. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Vet Immunol and Immunopath* 2016; 171: 81-102.
- Dudal S, Turriere C, Bessoles S, Fontes P, Sanchez F, Liautard J, Liautard J-P, Lafont V. Release of LL-37 by Activated Human Vg9V2 T Cells: A Microbicidal Weapon against *Brucella suis*. *J Immunol* 2006; 177:5533-5539.
- Ebel ED, Williams MS, Tomlinson SM. Estimating herd prevalence of bovine brucellosis in 46 U.S.A. states using slaughter surveillance. *Prevent Vet Med* 2008; 85(3-4):295-316.
- Fays de K, Tibor A, Lambert C, Vinals C, Denoel P, Bolle X De, Wouters J, Letesson JJ, Depireux E. Structure and function prediction of the *Brucella abortus* P39 protein by comparative modeling with marginal sequence similarities. *Protein Engineering* 1999; 12(3):217-223.
- Fensterbank R, Pardon P, Marly J. Comparison between subcutaneous and conjunctival route of vaccination with Rev. 1 strain against *Brucella melitensis* infection in ewes. *Ann Rech Vet* 1982; 13(4):295-301.
- Fernandez-Prada CM, Nikolich M, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig G, Hadfield TL, Hoover DL. Deletion of wboA enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect Imm* 2001; 69: 4407–4416.
- Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckert A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst and Evol Microbiol* 2007; 57: 2688–2693.

- Gall D, Nielsen K. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Rev. sci tech Off int Epiz* 2004; 23(3):989-1002.
- Garofolo G, Ancora M, Di Giannatale E. MLVA-16 loci panel on *Brucella* spp. using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis. *J Microbiol Met* 2013;92(2):103-107.
- Genç O, Büyüktanır Ö, Serdar G, Kılıçoğlu Y, Otlu S. Development and validation of sandwich quantitative ELISA prototype based on the bovine IFN $\gamma$  for the detection of cellular immunity. *Turk J Vet Anim Sci* 2015;39(6):724-729.
- Genç O, Büyüktanır Ö, Yurdusev N. Development of qualitative and quantitative ELISA models for bovine Brucellosis diagnosis. *Kafkas Üni Vet Fak Derg* 2010;16 (2):287-291.
- Geresu MA, Kassa GM. A review on diagnostic methods of brucellosis. *J Vet Sci Techno* DOI:10.4172/2157-7579. 1000323.
- Godfroid J, Nielsen K, Sagerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife DOI: 10.3325/cmj.2010.51.296.
- Goldbaum FA, Leoni J, Wallach JC, Fossati CA. Characterization of an 18-kilodalton *Brucella* cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis. *J Clin Microbiol* 1993;31: 2141-2145.
- Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, Eller N, Golding H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.* 2001; 3: 43–48.
- Gomes MTR, Campos PC, de Almeida LA, Oliveira FS, Costa MMS, Marim FM, Pereira GSM, Oliveira SC. The role of innate immune signals in immunity to *Brucella abortus*. *Front Cell Infect Microbiol* DOI: 10.3389/fcimb.2012.00130.
- Gomez G, Adams LG, Rice-Ficht A, Ficht TA. Host-*Brucella* interactions and *Brucella* genome as tools for subunit antigen discovery and immunization against brucellosis. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; 3(17):1-12.
- Gomez G, Pei J, Mwangi W, Adams LG, Rice-Ficht A, Ficht TA. Immunogenic and invasive properties of *Brucella melitensis* 16M outer membrane protein vaccine candidates identified via a reverse vaccinology approach. *PloS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0059751, 2013.
- Gonzalez D, Grillo M, De Miguel M, Ali T, Gorvel VA, Delrue R-M, Alvarez RC, Munoz P, Goni1 IL, Iriartel M, Marin CM, Weintraub A, Widmalm G, Zygmunt M, Letesson J-J, Gorvel J-P, Blasco J-M, Moriyon I. Brucellosis Vaccines: Assessment of *Brucella melitensis* Lipopolysaccharide Rough Mutants Defective in Core and O-Polysaccharide Synthesis and Export. *PloS One* 3. DOI:10.1371/journal.pone.0002760.
- Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet Microbiol* 2006; 112(2–4):171–179.
- Gupta VK, Nayakwadi S, Kumar A, Gururaj K, Kumar A, Pawaiya RS. Markers for the molecular diagnosis of brucellosis in animals. *Adv Anim Vet Sci* 2004; 2(3S): 31-39.
- Grillo MJ, Blasco JM, Gorvel JP, Moriyon I, Moreno E. What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Vet Res* 2012; 43(29):2-35.

- Grillo MJ, Marin CM, Barberan M, de Miguel MJ, Laroucau K, Jacques I, Blasco JM. Efficacy of bp26 and bp26/omp31 *B. melitensis* Rev.1 deletion mutants against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine* 2009; 27(2):187-91.
- Haag AF, Myka KK, Arnold MFF, Caro-Hernandez P, Ferguson GP. Importance of Lipopolysaccharide and Cyclic  $\beta$ -1,2-Glucans in *Brucella* Mammalian Infections. *Intern J Microbiol*. DOI: 10.1155/2010/124509,2010.
- Hay FC, Westwood OMR. *Practical Immunology*. 4 th ed, London, Blackwell Sci 2002;408.
- He Y. Induction of Protection, Antibodies and Cell Mediated Immune Responses by *Brucella abortus* Strain RB51. *Ochrobactrum anthropi* and Recombinants Thereof, Blacksburg, Virginia, PhD Thesis, 2000;
- Hemmen F, Weynants V, Scarcez T, Letesson JJ, Saman E. Cloning and sequence analysis of a newly identified *Brucella abortus* gene and serological evaluation of the 17-kilodalton antigen that it encodes. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1995; 2: 263-267.
- İyisan AS, Akmaz Ö, Düzgün SG, Ersoy Y, Eskiizmirliler S, Güler L. Türkiye'de sığır ve koyunlarda bruselloz'in seroepidemiolojisi. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg* 2003; 31(1):21-75.
- Jenner DC, Atkins HS. Vaccines for Brucellosis. *Uni Sta Patent App Pub*, Pub no: US 2011/0033492 A1/Feb 10, 2011.
- Ko J, Splitter GA. Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. *Clin Mikrobiol Rev* 2003; 16(1):65-78.
- Le Fleche I, Grayon JM, Al Dahouk S, Bouchon P, Denoeud F, Nöckler F, Neubauer H, Guilloteau L, Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol* 2006; 6(9):1471-2180.
- Lesley-Jane Eales. Cell-mediated immunity. In: *Vet Immunol*. 2nd ed, Michigan, Wiley.2003.
- Lord VR, Rolo MR, Cherwonogrodzky JW. Evaluation of humoral immunity to *Brucella* sp in cattle by use of an agar-gel immunodiffusion test containing a polysaccharide antigen. *Am J Vet Res* 1989; 50: 1813–1816.
- Macdiarmid SC. A theoretical basis for the use of a skin test for brucellosis surveillance in extensively managed cattle herds. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1987; 6(4):1029-1035.
- Martirosyan A, Gorvel J. P. *Brucella* evasion of adaptive immunity. *Future Microbiol* 2013; 8: 147–154.
- McDermott JJ, Arîmi SM. Brucellosis in Sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Vet Microbiol* 2002; 20: 111–134.
- McGiven J, Howells L, Duncombe L, Stack J, Ganesh NV, Guiard J, Bundle DR. Improved serodiagnosis of bovine brucellosis by novel synthetic oligosaccharide antigens representing the capping M epitope elements of *Brucella* O-polysaccharide. *J Clin Microbiol*. 2015; 03: 185–14.
- Moreno E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front Microbiol* 2014; 213(5):1-18.



- Moreno E, Moriyon I. The Genus *Brucella*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes*. 3rd Ed., Newyork, Springer. 2006; 315-456.
- Moreno E, Jones LM, Berman DT. Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. *Infect Imm* 1984; 43: 779–782.
- Moriyon I, Lopez-Goni I. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int Microbiol* 1998; 1: 19-26.
- Munoz PM, Marin CM, Monreal D, Gonzalez D, Garin-Bastuji B, Diaz R, Mainar-Jaime RC, Moriyon I, Blasco JM. Efficacy of Several Serological Tests and Antigens for Diagnosis of Bovine Brucellosis in the Presence of False-Positive Serological Results Due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12(1):141-151.
- Nicoletti P. Use of 45/20 bacterin to detect latent infection in brucellosis, in: Crawford, RP, Hidalgo RJ (Eds). *Bovine Brucellosis. An International Symposium*. Texas A\&M University Press, College Station, 1977; 72–78.
- Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol* 2002; 90: 447–459.
- Nielsen K, Smith P, Widdison J, Gall D, Kelly L, Kelly W, Nicoletti P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. *Vet Microbiol* 2004; 100: 25-30.
- Nielsen K, Yu WL. Serological diagnosis of brucellosis. *Sec Biol Med Sci* 2010; 1: 65-89.
- OIE 2009. Bovine brucellosis.  
[http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.04.03 BOVINE BRUC ELL.pdf](http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.04.03_BOVINE_BRUC ELL.pdf) (erişim tarihi: 10.01.2017)
- Oliveira SC, Zhu Y, Splitter G. Recombinant L7/L12 ribosomal protein and gammairradiated *Brucella abortus* induce a T-helper 1 subset response from murine CD4+ T cells. *Immunology* 1994; 83: 659–664.
- Orzil LL, Preis IS, Almeida IG, Souza PG, Filho PMS, Jacinto FB, Junior AAF. Validation of the multiplex PCR for identification of *Brucella* spp. *Microbiology* 2016; 46(5):847-852.
- Pai M, Riley LW, Colford JM. Interferon gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4: 761-776.
- Palmer MV, Waters WR, Thacker TC, Lyashchenko K. Effect of Different Tuberculin Skin-Testing Regimens on Gamma Interferon and Antibody Responses in Cattle Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin Vac Immunol* 2006;13(3):387-394.
- Perez-Sancho M, Duran-Ferrer M, Garcio-Seco T, Macias P, Garcia N, Martinez I, Ruiz E, Legaz E, Diez-Guerrier A, Gonzalez S, Dominguez L, Alvarez J. Interferon-gamma responses in sheep exposed to virulent and attenuated *Brucella melitensis* strains. *Vet Immun Immunopathol* 2014; 160:123-128.
- Perry MB, Bundle DR. Lipopolysaccharide antigens and carbohydrates of *Brucella*, in: Adams, G.L. (Ed). *Adv Brucellosis Res* 1990; 76–88.
- Phillips M, Pugh GW, Deyoe BL. Chemical and protective properties of *Brucella* lipopolysaccharide obtained by butanol extraction. *Am J Vet Res* 1989; 50: 311–317.

- Plommet M, Fensterbank R. La vaccination antibrucellique administrée par voie conjonctivale. *Develop Biol Standard* 1984; 56: 681–687.
- Poester FP, Nielsen K, Samartino LE, Yu WL. Diagnosis of Brucellosis. *The Open Vet Sci J* 2010; 4: 46-60.
- Rossetti OL, Arese AI, Boschioli ML, Cravero SL. *Cloning of Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. *J Clin Microbiol.*1996; 34:165–169.
- Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PRA. Sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust Vet J* 1990;67(4): 134-137.
- Ryan TJ, Buddle BM, De Lisle GW. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res Vet Sci* 2000; 69: 57–61.
- Scholz HC, Vergnaud G. Molecular characterisation of *Brucella* species. *Rev Sci Tech* 2013;32(1):149-162.
- Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kampfer P, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeiffer M, Huber B, Busse H-J, Kumar De B. *Brucella inopinata* sp. nov, isolated from a breast implant infection. *Int J Syst and Evol Microbiol* 2010; 60: 801-808.
- Singh SV, Gupta VK, Kumar A, Gupta S, Tiwari R, Dhama K. Therapeutic Management of Bovine Brucellosis in Endemically Infected Dairy Cattle Herd of Native Sahiwal Breed. *Ad Ani Vet Sci* 2014; 2(IS):32-36.
- Skendros P, Boura P. Immunity to brucellosis. *Rev Sci Tech* 2013;32(1):137-47
- Stevens MG, Tabatabai LB, Olsen CS, Chevillie NF, Tabatabai LB, Hennager SG. Cattle serologically positive for *Brucella abortus* have antibodies to *B. abortus* Cu-Zn superoxide dismutase. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994; 1(5):506-510.
- Sutherland, SS, Searson J. The immune response to *Brucella abortus*: the humoral response, in: Nielsen KH, Duncan JR. (Eds). *Animal Brucellosis* 1990; 65–81.
- Tabatabai LB, Hennager SG. Cattle serologically positive for *Brucella abortus* have antibodies to *B. abortus* Cu-Zn superoxide dismutase. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994;1(5):506–510.
- Tibor A, Decelle B, Letesson JJ. Outer Membrane Proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella* spp. Are Lipoproteins. *Infect Immun* 1999;67(9):4960-4962.
- Tittarelli M, Giovannini A, Conte A, Di Ventura M, Nannini D, Caporale V. The use of homologous antigen in the serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella melitensis*. *J Vet Med* 2005; 52: 75–81.
- Tizard IR. Cell-mediated immunity In: *Vet Immunol*. 7 th ed., Saunders Elsevier. 2010;
- Velasco J, Diaz R, Grillo MJ, Barberan M, Marin CM, Blasco JM, Moriyon I. Antibody and delayed-type hypersensitivity responses to *Ochrobactrum anthropi* cytosolic and outer membrane antigens in infections by smooth and rough *Brucella* spp. *Clin Diag Lab Immunol* 1997; 4: 279–284.
- Vemulapalli R, Mcquiston JR, Schurig GG, Sriranganathan N, Halling SM, Boyle SM. Identification of an IS711 Element Interrupting the *wboA* Gene of *Brucella abortus* Vaccine Strain RB51 and a PCR Assay To Distinguish Strain RB51 from Other *Brucella* Species and Strains. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 760-764.

- Vergnaud G, Pourcel C. Multiple Locus VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) Analysis In: Stackebrandt E, editor. Molecular Identification, Systematics and Population Structure of Prokaryotes. Berlin, Springer Berlin Heidelberg. 2006;83-104.
- Vizcaino N, Cloekart A, Zygmunt MS, Dubray G. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of the *Brucella melitensis* omp31 Gene Coding for an Immunogenic Major Outer Membrane Protein. *Infect and Immun* 1996;64(9):3744-3751.
- Vizcaino N, Cloeckart A. Biology and genetics of the *Brucella* outer membrane, in: LópezGoni I., O'Callaghan D. (Eds.), *Brucella*. Mol Microbiol Gen. Norfolk, Caister Academic Press. 2012;133–161.
- Wanke MM. Canine brucellosis. *Ani Rep Sci* 2004;82-83: 195-207.
- Wareth G, Melzer F, Weise C, Neubauer H, Roesler U, Murugaiyan J. Proteomics-based identification of immunodominant proteins of *Brucella* using sera from infected hosts points towards enhanced pathogen survival during the infection. *Biochem and Biophys Res Comm* 2015; 456:202-206.
- Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Inf Gen Evol* 2009; 9(6):1168-1184.
- Whatmore AM, Perrett LL, MacMillan AP. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol* 2007;34(7):1471-2180.
- Weynants VJ, Godfroid B, Limbourg C, Saegerman, Letesson JJ. Specific bovine brucellosis diagnosis based on in vitro antigen-specific gamma interferon production. *J Clin Microbiol* 1995;33: 706-712.
- Weynants VE, Gilson D, Cloeckart A, Tibor A, Denoel PA, Godfroid F, Limet JN, Letesson J-J. Characterization of smooth lipopolysaccharides and O polysaccharides of *Brucella* species by competition binding assays with monoclonal antibodies. *Infect Imm* 1997; 65: 1939–1943.
- Wood PR and Jones SL. An in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 2001;81: 147-155.
- Xin T, Yang H, Wang N, Wang F, Zhao P, Wang H, Mao K, Zhu H, Ding J. Limitations of the BP26 protein based indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of brucellosis. *Clin Vac Immunol* 2013;20(9):1410-1417.
- Yang X, Walters N, Robison A, Trunkle T, Pascual DW. Nasal immunization with recombinant *Brucella melitensis* bp26 and trigger factor with cholera toxin reduces *B. melitensis* colonization. *Vaccine* 2007; 25: 2261–2268.
- Yumuk Z, O'Callaghan D. Brucellosis in Turkey-an overview. *Int Journal of Infectious Diseases* 2012;16(4): 228-235.
- Zaccheus MV, Ali T, Cloeckart A, Zygmunt MS, Weintraub A, Iriarte M, Moriyon I, Widmalm GOR. The epitopic and structural characterization of *Brucella suis* biovar 2 Opolysaccharide demonstrates the existence of a new M-negative C-negative smooth *Brucella* serovar. *PLoS One* 2013; 8: 1–7.
- Zhan Y, Cheers C. Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* Vol 1993; 61(11): 4899-4901.
- Zhan Y, Yang J, Cheers C. Cytokine response of T-cell subsets from *Brucella abortus* infected mice to soluble *Brucella* proteins. *Infect Immun* 1993; 61(7): 2841-2847.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gülnur SERDAR

Doğum Yeri: Vakfıkebir / TRABZON

Doğum Tarihi: 10.10.1984

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Lisans, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi / 2009

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü / 2011 - .....

E-posta: g\_atalar@hotmail.com