T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CORYNEBACTERİUM PSEUDOTUBERCULOSİS FOSFOLİPAZ D (PLD) GENİNİN AKTARIMI VE PLD ENZİMİNİN AŞI OLARAK KULLANILMASI

Aslı SAKMANOĞLU

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 11102016 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA- 2015

ÖNSÖZ

Koyun ve keçilerin kazeöz lenfadenitisi (KLA), *Corynebacterium pseudotuberculosis* tarafından meydana getirilen özellikle lenf düğümleri, bazı iç organlarda ve akciğerlerde nekrotik, suppuratif ve kapsüllü apse oluşumuyla karakterize, kronik seyirli bir enfeksiyondur. Patojenitesinde rol oynayan önemli virülens faktörünün fosfolipaz D (PLD) enzimi olduğu bilinmektedir. KLA koyun ve keçi yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı bölgelerde yüksek morbidite ile seyir göstermektedir. Aralarında Türkiye'nin de bulunduğu birçok ülkede bu hastalığa sıklıkla rastlanmaktadır. Enfeksiyonun antibiyotik ile tedavi şansının düşük olduğu bilinmekle birlikte, en iyi korunma yönteminin aşılama olduğu bildirilmektedir. KLA enfeksiyonuna karşı uygulanan pek çok ticari aşı bulunmakla beraber bölgesel saha izolatları ile hazırlanan otojen aşı etkinliğinin daha yüksek olması sebebiyle bu duruma yönelik çalışmalar devam etmektedir. Biyoteknoloji alanında hızlı ilerlemeler mikrobiyoloji alanında da devam etmektedir ve rekombinant DNA teknolojisinin önemi de günden güne artmaktadır.

Bu çalışmada, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak sahadan izole edilen *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in PLD geninin aktarımı sonrasında rekombinant PLD'nin (rPLD) elde edilmesi ve antijenik benzerliğinin doğal PLD (dPLD) ile karşılaştırılması, rPLD ve dPLD 4 farklı adjuvant ile kombine edilerek 8 farklı toksoid aday aşının geliştirilmesi ve ülkemizde KLA enfeksiyonundan korunmada yaygın olarak kullanılan yurt dışı menşeyli ticari bir aşı ile serolojik testlerle karşılaşılaştırılarak aşıda adjuvant ve antijen etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Doktora tez çalışmam sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Osman ERGANİŞ'e, SÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD Öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. U. Sait UÇAN, Prof. Dr. H. Hüseyin HADiMLi, Yard. Doç. Dr. Zafer SAYIN'a, Öğr. Gör. Yasemin PINARKARA'ya, Arş. Gör. Gökçenur SANİOĞLU'na, Arş. Gör. Ali USLU'ya, merhum Prof. Dr. Mehmet ATEŞ hocamıza ve Dr. Kürşat KAV abimize, tez çalışmama katkı sağlayan Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mehmet İNAN hocama ve Mert KARAOĞLAN'a, tez projemin yürütülebilmesi için gerekli desteği sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)

Koordinatörlüğü'ne ve çalışmalarım boyunca ilgi ve desteğini hiç esirgemeyen sevgili eşim ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR vii
1.GİRİŞ 1
1.1. Tanım 1
1.2. Tarihçe 3
1.2.1. Kazeöz Lenfadenitis (KLA) Tarihçesi 3
1.2.2. Biyoteknoloji ve Rekombinant DNA Teknolojisinin Tarihçesi 3
1.3. Etiyoloji 5
1.4. Virülens Faktörleri 7
1.4.1. PLD Enzimi 7
1.4.2. Serin Proteaz 9
1.4.3. Mikolik Asit 9
1.5. Epidemiyoloji 9
1.6. Patogenez 11
1.7. Korunma 12
1.8. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi 17
1.8.1. CAMP Benzeri Reaksiyon 17
1.8.2. Hemoliz İnhibisyon Testi 18
1.8.3. Agar-Jel İmmünodifüzyon Tekniği 18
1.9. Klonlama Çalışmasında Kullanılan Vektör Sistemi 19
1.9.1. Champion™ pET SUMO Protein Expression Vektör 19
1.10. Rekombinant PLD Üretimi İlgili Yapılan Araştırmalar 21
1.11. Protein Saflaştırılmasında Kullanılan Yöntemler 22
1.11.1. Çalışmada Kullanılan Protein Konsantrasyon ve Saflaştırma Yöntemleri 23
1.12. Hayvan Deneyi 24
1.12.1. Zararsızlık Testi 24
1.12.2. Toksisite Testi 24
1.13. Rekombinant PLD Etkinliğine Yönelik Yapılan Aşı Çalışmaları 24
1.14. Adjuvant Kullanımı 26
1.14.1. Adjuvantın Genel Özellikleri 26
1.14.2. Çalışmada Kullanılan Adjuvant Emülsüyonları 28
2.GEREÇ VE YÖNTEM 33
2.1. Gereç 33

2.1.1. Bakteriyel Suşlar ve Plazmid.....33
2.1.2. PLD Geni, Open Reading Frame (ORF) Bölgesi ve PLD Proteininin Biyoinformatik Verilere Göre Değerlendirilmesi.....34
2.1.3. Besiyerleri.....36
2.1.4. Kullanılan Kitler.....37
2.1.5. Kanamisin stok solüsyonu.....39
2.1.6. IPTG (1M) stok solüsyonu.....40
2.1.7. DNA Amplifikasyonu.....40
2.1.8. Agaroz Jel Elektroforezi.....41
2.1.9. Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE).....41
2.1.10. Western Blot.....43
2.1.11. Protein Konsantrasyonu.....44
2.1.12. Adjuvant.....44
2.1.13. Koyun Materyali.....45
2.1.14. Letal Doz (LD50) Belirleme Denemesi.....46
2.1.15. Çalışmada Kullanılan Aşı Formları.....46
2.1.16. Aşı Etkinlik Çalışmaları.....46
2.1.17. Kullanılan Serolojik Testler.....48
2.2. Yöntem.....52
2.2.1. *Corynebacterium pseudotuberculosis* Kültür Gelişimi ve PLD Enzimine Göre Suş Seçimi.....52
2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....53
2.2.3. PZR ürününün jel arındırma kiti ile arındırılması.....55
2.2.4. Vektöre Klonlama Protokol.....56
2.2.5. Transformasyon Protokol.....57
2.2.6. Rekombinant Plazmid Taşıyan Kolonilerin Tespiti.....57
2.2.7. Rekombinant Kolonilerden Plazmid İzolasyonu.....57
2.2.8. Klonlama İşlemi Yapılan Plazmidlerin Doğrulanması.....58
2.2.9. Rekombinant Proteinin Ekspresyonu, Analizi ve Saflaştırılması.....59
2.2.10. RPLD ve DPLD Enzim Konsantrasyonu.....64
2.2.11. Protein Miktar Tayini.....64
2.2.12. Konsantrasyon Sonrası dPLD ve rPLD Enzimlerinin Titre Ölçümü.....65
2.2.13. Aşı Çalışması.....65
2.2.14. Aşıların Laboratuar Kontrolü.....66

2.2.15. Aşı Etkinlik Çalışmaları 66
2.2.16. Farelerde Çelınç ve Seropotens Guplarınının Değerlendirilmesi 71
3. BULGULAR.....73
3.1. *C.pseudotuberculosis* ile İlgili Çalışma Sonuçları 73
3.1.1. Klonlamada Kullanılan *C. pseudotuberculosis* Seçimi ve Reverse CAMP Testi 73
3.1.2. *C. pseudotuberculosis*'te PLD Gen Varlığının PZR ile Doğrulanması 74
3.1.3. *C. pseudotuberculosis* PLD Geninin PZR ile Çoğaltılması 74
3.1.4. PLD Geninin Baz Diziliminin Belirlenmesi.....75
3.2. Klonlama Çalışması Sonuçları.....78
3.2.1. Transformasyon Çalışması 78
3.2.2. Klonlama İşlemi Yapılan Plazmid Varlığının Doğrulanması.....78
3.3. Çözünmeyen/Çözünebilir Protein Düzeyinin Belirlenme Sonuçları.....85
3.3.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Gel Elektroforez (SDS-PAGE) 85
3.3.2. Western Blot 86
3.4. Rekombinant PLD Enzim Etkinliğinin Belirlenmesi 86
3.5. rPLD Enzim Saflaştırılması ve Konsantrasyonu Sonuçları 87
3.5.1. Ni-NTA kolon ile protein saflaştırılması.....87
3.5.2. SUMO proteaz enzim ile kesim.....87
3.6. Aşı Çalışması Sonuçları.....88
3.6.1. Doğal PLD Enzimi ile Aşı Çalışması Sonuçları.....88
3.6.2. Rekombinant PLD Enzimi ile Aşı Çalışması Sonuçları.....96
4. TARTIŞMA.....108
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....116
6. KAYNAKLAR 119
7. EKLER.....132
EK A: Etik Kurul Kararı.....132
EK-B: Şekiller.....133
8. ÖZGEÇMİŞ 137

SİMGELER VE KISALTMALAR

$Al(OH)_3$	Alüminyum hidroksit
APS	Amonyum persülfat
BCG	Bacille Calmette-Guérin
bp	Baz çifti
BSA	Bovine serum albumin
CAMP	Christie-Atkins-Munch-Petersen Like Reaction
CFA	Complete Freund's Adjuvant
dk	Dakika
dNTP	Deoksi nükleotid trifosfat
dPLD	Doğal PLD enzimi
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	Enzim Linked İmmuno Sorbent Assay
iELISA	İndirekt Enzim Linked Sorbent İmmuno Assay
FAO	Food and Agriculture Organization of United Nations
FMDV	Food and Mouth Disease Virus
FTS	Fizyolojik tuzlu su
H_2SO_4	Sülfürik asit
HCl	Hidroklorik asit
HIV	Human immunodeficiency virus
HLB	Hidrofilik/lipofilik balans
IFA	İncomplete Freund's Adjuvant
IL	Interlökin
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
ISA 201 VG	Montanide ISA 201 VG

ISA 206 VG	Montanide ISA 206 VG
kb	Kilobaz
KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilo Dalton
KLA	Kazeöz Lenfadenitis
LB	Luria Bertani
LD	Letal doz değeri
MCS	Multiple klonlama bölgesi
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
$MgSO_4$	Magnezyum sülfat
MO	Mineral yağ
NCBI	National Center for Biotechnology Information
$(NH4)_2SO4$	Amonyum sülfat
O/W	Su içinde yağ
OD	Optik dansite
ORF	Open reading frame
PA	Fosfatidik asit
PBS	Fosfat tuz solüsyonu
PLD	Fosfolipaz D
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RBS	Ribozom bağlanma bölgesi
RE	Restriksiyon enzimi
RNase A	Ribonükleaz A
rPLD	Rekombinant PLD enzimi
SDS	Sodyum dodesil sülfat

SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Gel Elektroforez
SOC	Super optimal medium
SUMO	*Small Ubiquitin-like Modifier*
TAE	Tris Asetat EDTA
TB	*Mycobacterium tuberculosis*
TEMED	N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
W/O	Su içinde yağ
W/O/W	Su içine yağ, yağ içinde su
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
YAC	Maya yapay kromozomu

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Corynebacterium pseudotuberculosis Fosfolipaz D (PLD) Geninin Aktarımı ve PLD Enziminin Aşı Olarak Kullanılması

Aslı SAKMANOĞLU
Mikrobiyoloji (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2015

Özellikle koyun ve keçilerde Kazeöz Lenfadenitise (KLA) sebep olan *Corynebacterium pseudotuberculosis*, patojenitesinde önemli rol oynayan fosfolipaz D (PLD) ekzotoksinini sentezlemektedir. Enfeksiyonun kontrolünde ve engellenmesinde aşılama en etkili stratejidir. Yerel saha izolatlarından hazırlanan aşıların diğer ticari aşılardan daha etkin olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada, labaratuarımızın kültür koleksiyonunda bulunan sahadan izole edilen *C. pseudotuberculosis*'in PLD geni kullanıldı. PZR ile amplifiye edilen PLD geni pET SUMO ekspresyon vektöre klonlandı ve *E. coli BL21(DE3)*'e transformasyonu yapıldı. Rekombinant PLD (rPLD) geni kesim enzimi, sekans analizi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile doğrulandı. Çözünebilir rPLD'nin değerlendirilmesinde SDS-PAGE, Western Blot ve Reverse CAMP reaksiyon testleri kullanıldı. rPLD ve doğal PLD (dPLD) ile hazırlanan aşıların etkinliklerini karşılaştırmak için her bir rPLD ve dPLD; Montanıde ISA 201 VG, Montanıde ISA 206 VG, Complete Freund's Adjuvant, Aluminyum Hidroksit Jel ($Al(OH)_3$ ile kombine edildi ve sekiz farklı toksoid aday aşı elde edildi. Sonuçları ülkemizde yaygın olarak kullanılan ticari aşıyla karşılaştırıldı. Ticari aşı ve sekiz farklı toksoid aday aşının çelınç denemesi farelerde yapıldıktan sonra aşıların etkinliği kuzularda belirlendi. Dokuz farklı aşının etkinliğini ve iki antijenin benzerliğini değerlendirmek için ELISA, agar serum nötralizasyon, hemoliz inhibisyon testleri kullanıldı.

C. pseudotuberculosis'in PLD geni ile NCBI gen bankasındaki referans *C. pseudotuberculosis*'in baz dizilimi ile %99.7 oranında uyumlu bulundu. Amino asit dizilimi karşılaştırıldığındaysa 2 amino asitte farklılık gözlendi. Testlerde çapraz antijen uygulamasının değerlerde farklılığa sebep olmasından dolayı, test antijeni olarak aşı antijeninin kullanılmasının daha güvenilir sonuçlar verdiği ve ELISA diğer serolojik testlerle kıyaslandığında, en ayırt edici özelliğe sahip olduğuna karar verildi. Dokuz farklı aşı grubuna ait ELISA değerlerinin ortalamaları istatiksel analiz ile değerlendirildiğinde anlamlı farkın olduğu belirlendi. Çelınç deneme sonuçlarına göre; KLA enfeksiyonuna karşı sekiz aday aşı geliştirildi ve etkinliklerinin ticari aşıdan daha yüksek olduğu belirlendi. DPLD ve rPLD aşı grupları kendi içerisinde karşılaştırıldığında, rPLD aşı gruplarının dPLD aşı gruplarına göre immun sistemi daha kuvvetli uyardığı ve Montanide ISA 201 VG+rPLD aday aşısının çelınca karşı %100 koruma sağladığı belirlendi.

Sonuç olarak; koyunlarda KLA enfeksiyonuna karşı aşı uygulamalarında rekombinant toksoid aşının kullanabileceği, Montanide ISA 201 VG'nin immun yanıtı diğer adjuvanttlardan daha etkili uyardığı ve hedef aşının yerel saha izolatı ile hazırlanmasının önemi ortaya konuldu.

Anahtar Sözcükler: Adjuvant; *C. pseudotuberculosis*; Fosfolipaz D (PLD); Rekombinant PLD (rPLD); Toksoid Aşı

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNİVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCE

Recombination of Gene of Phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and Using PLD Enzyme for Vaccine

Aslı SAKMANOĞLU
Department of Microbiology (VET)

PhD THESIS / KONYA-2015

Corynebacterium pseudotuberculosis which is caused by Caseous lymphadenitis (CLA) in the especially sheep and goats is synthesized Phospholipase D (PLD) exotoxin that is played a great role of its pathogenicity. Vaccination is the most cost-effective strategy for controlling and prevention of this infection. The vaccines which is prepared by local field isolates is known to be powerfuler than other commercial vaccine.

In this study, PLD gene of *C. pseudotuberculosis* that is isolated from field in our labaratory culture collection was used. PLD gene which was amplified by PCR was cloned into pET SUMO expression vectors and transffered into *E. coli BL21(DE3)*. Recombinant PLD (rPLD) gene was confirmed with restriction enzyme, seguence analyzes and PCR. İnsoluble rPLD enzyme for analyzing about its solubility, yields and inclusion bodies was used tests of SDS_PAGE, Western Blot and Reverse CAMP Reaction. So that effectives of candidate vaccines prepared with rPLD and naturel PLD (dPLD) were compared in, each one soluble rPLD ve dPLD were combined with Montanıde ISA 201 VG, Montanıde ISA 206 VG, Complete Freund's Adjuvantt, Aluminum Hydroxide Gel ($Al(OH)_3$ and eight different candidade toxoid vaccine was composed. Results were compared with commercial vaccine which is usually used in our country. Challenge assays of commercial vaccine and 8 different vaccine were done in mice, after efficiency of vaccines were detected in lambs. İn order that efficiency of nine different vaccines and similarity of two antigens in serological tests were determined, tests was used iELİSA, agar serum neutralization test, hemolysis inhibition test.

As a results of seguence analyzes; base of PLD gene of *C. pseudotuberculosis* with NCBI Gene Bank Reference *C. pseudotuberculosis* was found to similar rate of 99.7%. When sequences of amino acid were compared with special programme, differences were detected in the two amino acid. When the assays of cross-antigen is caused by differences of value in test, the use of a vaccine antigen as the test antigen was considered to be more reliable results. When ELISA was compared with other serological tests, the test which has the most distinguishing characteristic was decided. While statistical analysis was evaluated with avarage of ELISA values of nine different vaccination, differences of these groups were determined to be significant. According to the results of challenge assays, eight candidate vaccines was formulated against to CLA infection and effective of its were supposed that are higher than other commecial vaccine. When efficiency of vaccines were compared into groups of rPLD and dPLD, results of test were considered that groups of rPLD about stimulate of immunological is a stronger than dPLD vaccine of groups. Montanide ISA 201 VG+rPLD vaccine was protected against CLA infection to rate os 100% was detected in this study.

Consequently; Recombinant toxoid vaccine could been used against CLA infection in sheeps and Montanide ISA 201 VG was stimulated stronger than other adjuvants in immune response and vaccine have been need to prepare from field isolates.

Key words: Adjuvant; *C. pseudotuberculosis*; Phospholipase D (PLD); Rekombinant PLD (rPLD); Toksoid Vaccine

1.GİRİŞ

1.1. Tanım

İrinli yüzeysel lenf nodüllerinin çatlayarak dışarıya açılmasından dolayı halk arasında ‘’Çatlak’’ olarak da adlandırılan Kazeöz Lenfadenitis (KLA), koyunlarda kronik olarak seyretmesi ve buna bağlı aşırı kilo kaybı nedeni ile zayıf koyun sendromu ‘’Thin Ewe Sendrom’’ olarak da adlandırılmaktadır (Gates ve ark 1977). *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) (*C. ovis*) tarafından oluşturulan KLA enfeksiyonu özellikle koyun ve keçilerde eksternal ve internal olmak üzere iki formda kronik olarak seyretmektedir (İzgür ve ark 1999).

KLA; döl veriminin düşmesine, deri ve yapağı kalitesinin bozulmasına, et ve süt veriminde azalmaya ve genç hayvanlarda da ölümlere neden olmasından dolayı ekonomik açıdan önemli bir enfeksiyondur (Batey 1986, Brown ve ark 1986, Brown ve Olander 1987, Alanson ve ark 1992). Koyun ve keçiler *C. pseudotuberculosis*’in primer konakçısı olmakla birlikte etken at, sığır ve insanlardan da izole edilmiştir (Batey 1986, Peel ve ark 1997).

C. pseudotuberculosis’in mükemmel parazitik özelliklere sahip olduğu, konakçı içerisine başarılı bir şekilde yerleşerek immün sistemden kolaylıkla kaçabildiği, kronik enfeksiyonlara yol açmakla beraber nadiren ölüme sebep olduğu ve etkenin çevre şartlarında uzun süre canlı kalabildiği bildirilmektedir (Pepin ve ark 1994). Bu özelliğinden dolayı *C. pseudotuberculosis*’in sebep olduğu sürü enfeksiyonları için genellikle ‘eradike edildi’ yerine ‘mücadele edildi’ terimi kullanılmaktadır (Baird ve Fontaine 2007).

C. pseudotuberculosis’in virülens faktörleri ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmış olup en etkili virülens faktörünün PLD ekzotoksini olduğu belirtilmiştir (Paton ve ark 1995). Enzimin membran sfingomiyelin yapısını bozarak damar permeabilitesini arttırmak suretiyle, etkenin vücuda giriş bölgesinden bölgesel lenf yumruları ile iç organlara yayılmasına yardımcı olduğu ve hastalığın patojenezisinde önemli rol aldığı bildirilmiştir (Lund ve ark 1982, Sutherland ve ark 1989, Paton ve ark 1995).

Koyun yetiştiriciliği et, süt, kıl, yün ve bunlardan elde edilen ürünlerin insan tüketimine sunulması amacı ile dünyanın pek çok ülkesinde yaygın olarak yapılmakta ve ekonomik açıdan da önem arz etmektedir. Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO) verilerine göre; koyun sayısının dünyada yaklaşık 1 milyar, Türkiye'de ise yaklaşık 23.08 milyon olarak bildirilmektedir (Anonim 1). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2011 verilerine göre Konya ilinde yaklaşık olarak 1.4 milyon koyun varlığı bildirilmiştir (Anonim 2).

Türkiye genelinde KLA enfeksiyonunun görülme sıklığı ile ilgili epidemiyolojik çalışma yapılmakla birlikte ülke genelinde yapılan yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bununla beraber farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda, özellikle koyun sürülerinde yaygın olduğu bildirilmiştir (Erganiş ve ark 1990, Çetinkaya ve ark 2002, İlhan 2003).

C. pseudotuberculosis'in hücre içi patojen olması ve konakçıya invazyonu sonrası, immün sistemin yok edici etkisinden kurtulmak için kapalı duvarlı kapsüller oluşturması sebebiyle hastalığın tedavisinde antibiyotikler etkili olmamaktadır (Baird ve Fontaine 2007, Freire ve ark 2008). Tedavi şansının düşük olmasından dolayı enfeksiyonun bir sürüdeki koyunların çoğunluğuna bulaşması söz konusu olmaktadır (Batey 1986, Valli ve Parry 1993, Paton ve ark 1988). Enfeksiyondan korunmada, hijyen kuralları ile beraber aşı kullanımı ön plana çıkmaktadır (Magdy ve ark 2009).

KLA'ya karşı immunoproflaktik koruma sağlamak amacıyla aşı uygulamaları yapılmaktadır ve bakterinin tüm antijenleri, attenüe veya inaktif *C. pseudotuberculosis* suşları, kültür üst sıvıından izole edilmiş antijen ve DNA aşıları gibi çeşitli aşılar geliştirilmiştir (Kuria ve Holstad 1989, Eggleton ve ark 1991, Ellis ve ark 1991, Middleton ve ark 1991). Ancak % 100 etkili aşı formulasyonu geliştirilememiş olup bölgeden bölgeye izolatlar arasında farklılık olabileceği ve aşının da hedef aşı bölgesinden izole edilen suş ile hazırlanmasının gerektiği bildirilmiştir (Fontaine ve ark 2006, Dorella 2009).

Rekombinant DNA teknolojisi, rekombinant protein üretiminde kullanılan taşıyıcı bakterilerin hızlı üremesi, kullanılan besiyerinin ekonomik olması, koşullar uygun olması halinde hedef rekombinant proteinin istenen miktarda sentezlettirilmesi

ve taşıyıcı vektör füzyon proteine sahip olması halinde saflaştırma imkanının bulunmasından dolayı avantajlı bir yöntemdir (Sorensen ve Mortensen 2005).

1.2. Tarihçe

1.2.1. Kazeöz Lenfadenitis (KLA) Tarihçesi

Edward Nocard tarafından 1888 yılında çiftlik hayvanlarında görülen lenfangitis vakasından alışılmadık bir mikroorganizma izole edildi. Hugo Von Preisz 1891 yılında koyunlarda meydana gelen böbrek abselerinden benzer bir organizma izole ederek *Bacterium pseudotuberculosis ovis* şeklinde, 19. yüzyılda Alman bakteriyolog Lehmanne Neumann ilk defa bakteriyoloji atlaslarında bakteriyi *Mycobacterium tuberculosis*'dekine benzer lezyonlara sebep olduğu için *Bacillus pseudotuberculosis* olarak adlandırmışlardır (Merchant ve Packer 1967). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin 6. baskısında (1948), KLA'a neden olan bu bakteri ilk defa *C. pseudotuberculosis* olarak adlandırılmıştır (Baird ve Fontaine 2007).

KLA ilk defa 1920'li yıllarda İngiltere'nin de içinde bulunduğu bazı ülkelerde koyun etinde verim düşüklüğüne yol açarak ekonomiyi etkileyen bir hastalık olarak ortaya çıkmıştır (Baird ve Fontaine 2007). Hayvan nakillerinin ülkeler arasında 18. yüzyıldan itibaren artmaya başlamasıyla birlikte enfeksiyon diğer ülkelere yayılmaya başlamıştır. Özellikle, İspanya kökenli olan merinos ırkının et ve süt bakımından oldukça verimli olması sebebiyle Güney Amerika, Avustralya ve Amerika'nın diğer bölgelerine ithalatlarının yapılmasıyla *C. pseudotuberculosis* dünyanın farklı bölgelerine yayılmaya başlamıştır (Paton 2000).

1.2.2. Biyoteknoloji ve Rekombinant DNA Teknolojisinin Tarihçesi

1960 Restriksiyon endonükleaz enzimleri keşfedildi.

1969 *Escherichia coli'*de (*E. coli*) EcoRI' in varlığı belirlendi.

1970 Revers transkriptaz enzimi saptandı.

1972 İlk rekombinant DNA molekülü hazırlandı.

1973 Plasmidler gen klonlamasında kullanıldı.

1975 Gen spesifik problarla parental DNA saptandı

1979 Şap virusu viral antijeni *E. coli* 'de klonlandı.

1982 İnsan insülini *E. coli* 'de klonlandı ve ticarete sunuldu.

1985 PCR tekniği geliştirildi.

1988 Genetik manipulasyon ile elde edilen soya fasulyesi üretildi.

1988 Gen tabancası (gene gun) geliştirildi.

1991 İnsan hemoglobini üreten transjenik domuz ve keçi elde edildi.

1991 İnsanlarda kanserin tedavisinde genler kullanıldı.

1992 Patojenik mutasyonların yeni bir sınıfı olan tri nükleotid yayılması bulundu.

1992 İnsanın Y ve 21. kromozomunun komple gen haritası yapıldı.

1992 X kromozomunun inaktivasyon merkezi belirlendi.

1992 Maya kromozomunun tüm baz sırası belirlendi.

1994 İnsan genomunun fiziksel haritası yapıldı.

1997 *E.coli* genomu dizilendi.

1998 *Mycobacterium tuberculosis* dizilendi.

2000 Genomik bilgiye serbest ulaşım sağlandı. Meyve sineği genomu dizilendi.

2001 $3{,}2x10^9$ yapı taşından oluşan insan genomu ana çizgileriyle açıklandı.

2003 "Ulusal İnsan Genom Araştırma Enstitüsü" ile "Ulusal Enerji Bölümü", Uluslararası İnsan Genom Dizisi Konsorsiyumu'nun, İnsan Genom Projesi'ni, plânlanandan iki yıl önce başarıyla tamamladığı açıklandı.

2005 Proteom Projesi başladı ve devam etmektedir.

2006 İnsanlarda immun yetmezliğe sebep olan papillom virusuna yönelik ilk defa rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak rekombinant aşı üretildi.

2007 İnsanlarda embriyonik köken hücreden deri hücreleri oluşturuldu.

2008 Japonya'da bir grup araştırıcı tarafından laboratuar ortamında yapay DNA molekülleri elde edildi. (Akman ve Tuncer 2007, Arda 1997).

2010 J. Craig (Venter Enstitüsü), ilk sentetik bakteriyel genomu üretip, onu DNAsı olmayan bir bakterinin içine enjekte ettiklerini duyurdu. Böylece *Synthia* bakterisi dünyanın ilk sentetik yaşam formu oldu (Pennisi 2010).

Fosfolipaz D (PLD) enzimi ile ilgili çalışmalar 1950'li yıllardan beri yapılmakta olup, klonlama ve sekanslama işlemlerinin geliştirilmesi ile 1990'lı yıllarda alt tipleri de belirlenmiştir. Biyoteknoloji alanındaki ilerlemelere paralel olarak PLD genine yönelik rekombinant DNA teknolojisi kullanılmıştır. Çoğunlukla aşı çalışmalarında kullanılmakta olan bu teknoloji ile PLD genini ihtiva eden yeni özel suşlarda elde edilebilmektedir (Hofmann 2003).

1.3. Etiyoloji

C. pseudotuberculosis, hücre içi patojen olmakla beraber kokoid, ipliksi yapıda basil gibi pleomorfik özelliklere sahip olan eni 0.5 µm ve 0.6 µm, uzunluğu 1 µm ve 3 µm arasında değişebilen, sporsuz, kapsülsüz, hareketsiz, fakültatif anaerob, katalaz pozitif ve Gram pozitif bir bakteridir. Bakterilerin bakteriyoskopik görüntülerinde karakteristik olarak ''Çin harfi'' görünümü vardır (Baird ve Fontaine 2007). Genellikle bir uçları şişkindir ve bu durum olup basile topuz görünümünü verir. Basilin içinde düzensiz olarak dağılmış olup çoğu kez uçlara yakın olarak bulunan ve anilin boyalarla koyu renkte boyanan granüller vardır. ''Metakromatik cisimcikler'' ya da ''Babes-Ernest Cisimcikleri''denilen bu cisimcikler, basile tesbih tanesi görünümü vermektedir (Akman ve Gülmezoğlu 1980).

Corynebacterium cinsi bakteriler, Aktinobakter sınıfında (yüksek G+C gram pozitif basil) alt sınıf Aktinobakteridia'ya bağlı Aktinomiket'lerden Corynebacterinea'ya bağlı *Corynebacteriacea* ailesi içerisinde yer almaktadır (Stackebrandt ve ark 1997).

Corynebacterium cinsi bakteriler gen düzeyinde analiz (16S rRNA ve 5S rRNA), kemotaksonomik (mikolik asit, peptidoglikan ve hücresel yağ asit çalışmaları), morfolojik ve fenotipik özelliklerine göre *C. pseudotuberculosis*, *C. accolens*, *C. afermentans*, *C. amycolatum*, *C. appendicis*, *C. argentoratense*, *C. aurimucosum*, *C. auris*, *C. confusum*, *C. coyleae*, *C. diphtheriae*, *C. durum*, *C. falsenii*, *C. freneyi*, *C. glucuronolyticum*, *C. imitans*, *C. jeikeium*, *C. kroppenstedtii*, *C. lipophiloflavum*, *C. macginleyi*, *C. matruchotii*, *C. minutissimum*, *C. mucifaciens*,

C. mycetoides, *C. propinquum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. riegelii*, *C. simulans*, *C. singulare*, *C. striatum*, *C. sundsvallense*, *C. thomssenii*, *C. ulcerans*, *C. urealyticum* ve *C. xerosis*, türlerinin yanı sıra Korineform CDC grup G'yi kapsayacak şekilde sınıflandırılmışlardır (Stackebrandt 1997).

C. pseudotuberculosis DNA, G+C (%47-74) oranı bakımından (*Corynebacterium, Mycobacterium, Rhodococcus equi, Nocardia*) CMN grubuna dahildir. *C. diphtheriae* ve *Mycobacterium tuberculosis* gibi çok önemli patojenleri barındıran *Actinobacter* ailesi farklı bir alt gruptur. Mikolik asit olarak bilinen uzun zincirli yağ asitleri hücre duvarının dışında bulundurması sebebi ile farklı bir grup içerisine dahil edilmiştir (Dorella ve ark 2006, Ventura 2007).

C. pseudotuberculosis'in hücre duvarı dışında bulunan 2-dallı 3-hidroksi yağ asiti (mikolik asit) sebebiyle 1939 yılında Carne tarafından identifiye edilen tüberküloz basiliyle benzerliği ortaya konulmuştur (Connor 2000). Hücre duvarı peptidoglikan tabakası mezo-diaminopimelik asit (meso-DAP) ve arabinoz ile galaktoz içermektedir (Jolly 1965, Selim 2001).

Besiyerinde gelişimleri esnasında inkübasyon sıcaklığı 37º C olup pH ısısı: 7-7.2 arasındadır. Besiyeri yüzeyinde ilk 24 saatte seyrek gelişen koloniler 48-72 saat sonunda sayıları artarak 1-2 mm çapına ulaşır. Koloniler kremden turuncu rengine doğru renk değiştirerek kuru opak R koloni formunda gözlenir (Connor ve ark 2000).

C. pseudotuberculosis izolasyonu yapılırken apseye neden olan *Trueperella pyogenes* (*Arcanobacter pyogenes) ve Pasteurella multocida* gibi diğer bakterilerden ayrımı yapılmalıdır (Dorella ve ark 2006). Buna yönelik olarak 16S rRNA sekansı yöntemi kullanılmaktadır (Çetinkaya ve ark 2002). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)-restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizim yöntemi güvenilir olmasına rağmen pahalı yöntem olmasından dolayı bir çok laboratuarda biyokimyasal testler kullanılmaktadır (Gavin ve ark 1992).

API Coryne Sistem ve Biochemical Pattern of Cowan and Steel (BPCS) testleri, 16S rRNA sekansına göre sensivite ve spesifitesinin yüksek olmasından dolayı *C. pseudotuberculosis* identifikasyonunda kullanılabileceği belirtilmiştir (Belén ve ark 2013).

1.4. Virülens Faktörleri

C. pseudotuberculosis ile doğal yolla enfekte olan koyun serumları kullanılarak yapılan immunoblot testleri sonucunda etkenin sentezlediği enzim ve somatik hücre duvarına ait 11 antijenin moleküler ağırlıkları 20 kDa, 22,4 kDa, 31,6 kDa, 35,5 kDa, 36,3 kDa, 39,8 kDa, 45,7 kDa, 56,2 kDa, 63,1 kDa, 79,4 kDa ve 100 kDa, üst sıvıta belirlenen antijenlerin moleküler ağırlıkları ise 20 kDa, 25,1 kDa, 31,6 kDa, 39,8 kDa ve 63,1 kDa olarak bildirilmiştir (Ellis ve ark 1991, Paule ve ark 2004).

1.4.1. PLD Enzimi

C. pseudotuberculosis'in patojenitesinde rol oynayan faktörler tam olarak açıklığa kavuşturulmamış olmasına rağmen bakterinin ürettiği toksik hücre duvarı lipidi ve fosfolipaz D enzimi önemli virülens faktörlerinin arasında bulunmaktadır (Barksdale ve 1981, Bernheimer ve ark 1980, Biberstein ve ark 1971). Fosfolipaz enzimi ilk kez Carne tarafından 1940 yılında karakterize edilmiştir (Baird ve ark 2007). Fosfolipaz aktivitesinin varlığı ilk defa fosfolipide özel fosfodiesteraz aktivitesi sonucu fosfotidilkolinin, fosfatidik asit (PA) ve koline ayrıştırıldığı havuç özütünde belirlenmiştir (Hanahan ve ark 1947).

Fosfotidilkolinin parçalanması sonucu açığa çıkan PA; diabet (Hammond ve ark 1995) yangı, sitosketal düzenlenmesi (Cross ve ark 1996) ekzositoz (Brown ve ark 2001, Siddhanta ve ark 2000), fagositoz (Kusner ve ark 1996), nöral ve kardiyak uyarımda (Bocckino ve ark 1991, Henry ve ark 1995, Xu ve ark 1996, Xu ve ark 1996, Dhalla ve ark 1997, Frohman 1999, Park ve ark 2000) matriks metalloproteinaz üretiminde (Reich ve ark 1995), onkogeneziste (Welsh 1994), bakteri patojenitesinde ve örümcek zehrinde (Van Dijk ve ark 1998) ve nötrofillerin patlamasında (Waite ve ark 1997) rol oynamaktadır. Fosfolipazlar, hidrolize ettikleri ester bağlarına özgül olarak A, B, C ve D olarak sınıflandırılmaktadırlar (Karkoeska ve 2009). PLD yanısıra lipoksigenaz da lipidlerin parçalanma ve modifikasyonunda temel rollere sahiptirler (Karakurt ve Huber 2008).

PLD enzimi membran sfingomiyelin yapısını bozarak damar permeabilitesini arttırarak etkenin vücuda giriş bölgesinden bölgesel lenf yumruları ve iç organlara

yayılmasına yardımcı olarak hastalığın patogenezisinde önemli rol oynamaktadır (Lund ve ark 1982, Sutherland ve ark 1989, Paton ve ark 1995).

Farklı *C. pseudotuberculosis* suşlarına ait ekzotoksin örneklerinin antijenik bakımdan benzer oldukları bildirilmiştir (Doty 1964). Bununla birlikte sentezlenen toksinin miktarı ve oluşan lezyonların büyüklükleri bakımından, suşlar arasında farklılıkların olduğu ifade edilmektedir (Sutherland ve ark 1989). Bakterinin daha çok sitoplazmasından olmak üzere hücre duvarından da sentezlenen PLD, etkene ait kültürlerden elde edilebilmektedir (Brown ve Olander 1987).

C.pseudotuberculosis'in virülens faktörleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Buna karşın yapılan çalışmalar sonucunda, virülens faktörlerinin genetik ve moleküler mekanizmasını anlamaya yönelik hızlı ilerlemeler kaydedilmiştir. *C.pseudotuberculosis*'in patojenitesinde görev alan iki önemli unsurun PLD ekzotoksini ve toksik hücre duvarı olduğu bildirilmektedir. PLD ekzotoksinininde endotelyal hücrelerde nekroza sebep olarak lenfatik dolaşıma ulaştığı ve deneysel çalışmalar sonucunda makrofaj yıkımına neden olduğu belirtilmektedir (Carne 1939, Onon 1979, Tashjian ve Campbell 1983, Egen ve ark 1989, Songer 1997, Bastos ve ark 2012).

PLD toksininin komplement sistemini aktive ettiği bilinmekle beraber tam mekanizması henüz anlaşılamamıştır (Muckle ve Gyles 1986). Düşük dozlarda fare ve tavşan gibi deney hayvanlarında dermonekrotik etkiye sahip olan PLD'nin, yüksek dozlarda deney hayvanlarının yanı sıra kuzu ve koyunlarda da letal etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Alansonve ark 1992, Hsu ark 1985). Hastalığın ileri dönemlerinde görülen anemi ve kaşeksi tablosunun oluşumunda ekzotoksinin önemli rolleri olduğu ifade edilmiştir (Hsu ve ark 1985). PLD ekzotoksininin yapısının ve karakterizasyonunun anlaşılması üzerine rekombinant PLD toksininin sentezi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Egen ve ark 1989, Hongson ve ark 1990, McNamara ve ark 1995).

C. pseudotuberculosis PLD toksini *Rhodococcus equi*'nin ürettiği fosfolipaz C ile sinerjistik olarak etkilenerek ve özellikle %4 defibrine koyun kanı içeren kanlı agarda eritrositleri hemoliz ederek koloni etrafında hemolitik alan oluşturmaktadır (Barksdale ve ark 1981, Hsu ve ark 1985, Songer ve ark 1987). Buna karşın

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) β-hemolizin ile antogonistik ilişki içerisine girerek hemoliz özelliği engellenmektedir (Jones ve Collins 1986).

1.4.2. Serin Proteaz

C. pseudotuberculosis patojenitesinde rol oynayan diğer virülens faktörü 40 kDa ağırlığında olan serin proteaz, koyunlarda subunit aşı uygulamalarında kullanılmıştır. Serin proteaza karşı şekillenen antikorların çelınç denemeleri sonrasında ilişkilendirildiğinde enfeksiyona karşı yeterli koruma sağlamadığı gözlenmiştir (Walker ve ark 1994, Wilson ve ark 1995).

1.4.3. Mikolik Asit

C. pseudotuberculosis kapsül bulundurmamasına karşın hücre duvarının dışı mikolik asit ile sarılmış durumdadır. Mikolik asit sitotoksik faaliyet gösterip fagositik hücrelere karşı dayanıklılığı sağlar (Billington ve ark 2002). Mikolik asit ekstraktları deneme amaçlı farelere derialtı (SC) yol ile veridiğinde lokalize yangı, konjesyon ve hemorajik nekroz belirtilerinin gözlemlendiği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra mikolik asit dejeneratif değişimleri ve lökosit ölümünü de uyardığı belirtilmiştir (Carne ve ark 1956).

1.5. Epidemiyoloji

Corynebacterium cinsi bakteriler kommensal ve patojen olarak insan ve hayvanların deri ve mukoz membranlarında bulunmaktadır. Enfeksiyon etkeninin bulaşması çoğunlukla deri yüzeyindeki sıyrık ve yaralardan nadiren solunum yolu ile olmaktadır (Zaitoun ve Bayoumi 1994). Enfeksiyonun ortaya çıkmasında olumsuz çevre koşullarının yanı sıra stres faktörlerinin de rol oynadığı tahmin edilmektedir. Koyunların kırkımı sırasında apseli lenf yumrularının açılması ile beraber etkenin etrafa ve diğer hayvanlara bulaşmasının enfeksiyonun bulaşma şeklinde esas kaynağı oluşturduğu tahmin edilmektedir (Arda ve ark 1992).

KLA, koyun ve keçilerde genellikle endemik ve subklinik seyretmekle beraber kuzularda nadiren ölümlere sebep olmaktadır. Endemik olaylarda apse kapsülünün antibiyotik etkisini azaltmasından dolayı, enfeksiyonun eradikasyonu güçleşmektedir. Enfeksiyonda inkübasyon süresinin uzun ve görülebilir lezyonların az olmasından dolayı enfekte koyunların tespiti zor olmaktadır (Kuyucuoğlu ve

Erganiş 1999). KLA enfeksiyonuna Avrupa, Avustralya, Güney Amerika, Kuzey Amerika ve Orta Doğu gibi geniş coğrafik alanlarda rastlanılmakta ve enfeksiyonun ilk teşhisi 1989 yılında yapılmıştır (Meldrum 1990). Türkiye'de KLA ihbarı mecburi hastalıklar sınıfında değildir. Enfeksiyona bağlı verim kayıpları göz ardı edildiğinden dolayı, hastalığın gerçek prevalansı ile ilgili net bir bilgi bulunmamaktadır (Burhan Çetinkaya 2002). Bu durumun aksine bazı ülkelerde KLA'nın prevalansının %8-90 arasında değiştiği bildirilmiştir (Erganiş ve ark 1990, Çetinkaya ve ark 2002, Al-Gaabary ve ark 2009, Guimeras ve ark 2009, Stanford ve ark 1998).

KLA, dünyanın pek çok ülkesinde yaygın olarak görülen ülkemizde de büyük ekonomik kayıplara neden olan bir enfeksiyondur (Arda ve ark 1992). Konya ilinde mezbahadan alınan 100 adet apseli lenf yumrusundan 16'sından *C. pseudotuberculosis* izolasyonu yapmışlardır (Erganiş ve ark 1990). Türkiye'nin değişik bölgelerinden alınan materyallerden 70 koyun ve 7 keçi orjinli *C. pseudotuberculosis* suşu izole edilerek, KLA'nın Türkiye'de de yaygın olarak görüldüğü rapor edilmiştir (Aydın 1977). Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre 201 ülkede insanlarda 64 KLA vakası bildirilmiştir (Ruiz ve ark 2011).

KLA Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Avustralya'da koyun ve keçilerde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Burrell 1980, Paton ve ark 1994, Stanford ve ark 1998). KLA'nın Avustralya'da sadece yün verimindeki düşmeye paralel olarak 17 milyon $ ekonomik zarara neden olduğu bildirilmiştir (Paton ve ark 1994).

İslam ülkelerinde ciddi miktarda koyun eti tüketimine paralel olarak koyun yetişticiliği de fazla miktarda yapılmaktadır. Mısır'da KLA'ya yönelik araştırmalara göre koyun popülasyonunun yaklaşık %10'u enfeksiyondan etkilenmekte ve bu durumun ülke ekonomisini yaklaşık 1,7 milyon $ zarara uğrattığı bildirilmektedir (Seddik ve ark 1983).

C. pseudotuberculosis'in koyun, keçi ve atlarda lenfadenitis, lenfangitis, septisemi ve pnömoni (Brown ve Olander 1987), sığırlarda mastitis, domuzlarda vajinitis (Watts ve ark 2000) etkeni olduğu bildirilmiştir. Atlarda da *C. pseudotuberculosis*'in ülseratif lenfangitise, bulaşıcı folikülitise, kıl foliküllerinde yaygın yangıya ve deri altı apselerine neden olduğu gözlenmiştir (Miers ve Ley

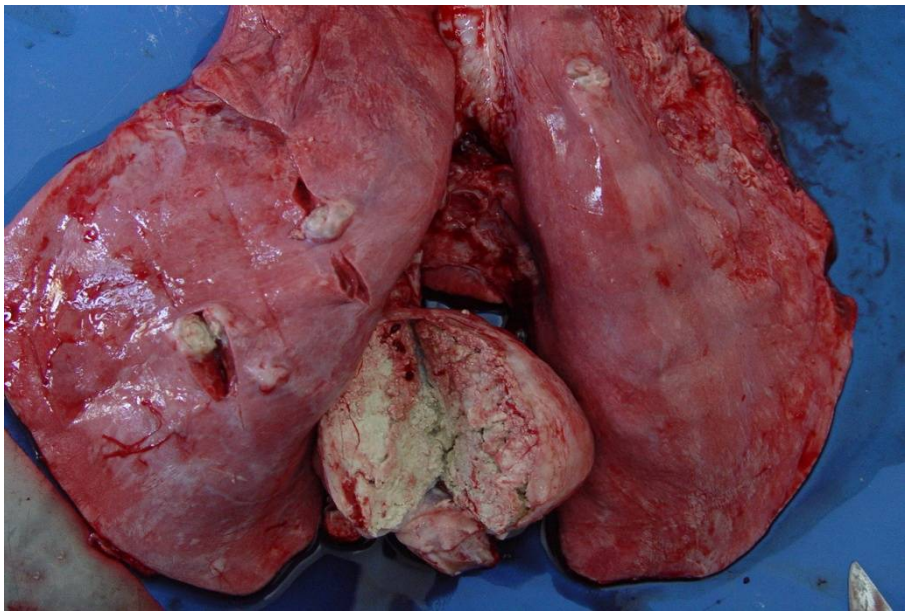
1980). *C. pseudotuberculosis*'in nadiren geyik ve develerde de enfeksiyona sebep olduğu belirtilmiştir (Bastos ve ark 2012). *C. pseudotuberculosis* ile enfekte olan koyunlarla temas halinde olan insanlarda da KLA'ya rastlanıldığı bildirilmiştir (Peel ve ark 1997, Hemond 2009, Romero-Pérez ve Luglio 2004, Join-Lambert 2006). KLA enfeksiyonu görülen hayvanlarda *C. pseudotuberculosis*'in süte geçebileceği ve çiğ süt tüketimi halinde insanlarda da enfeksiyon görülebileceği bildirilmiştir (Goldberger ve ark 1981).

Mısır'da yapılan çalışmalara göre koyunlarda keçilere oranla, dişilerde de erkeklere göre enfeksiyona daha sık rastlanıldığı ve antibiyotik kullanımından ziyade sürü yönetimi esasında hijyen kurallarına uyulmasının enfeksiyon prevelansını önemli ölçüde azaltılacağı gösterilmiştir (Magdy ve ark 2009). Özellikle 2 yaş ve üzeri koyunlarda KLA'ya daha sık rastlanıldığı belirtilmiştir (Magdy ve ark 2010). KLA'nın gözlemlendiği koyun ve keçilerde *C. pseudotuberculosis'*in benzer serotiplerinin enfeksiyona sebep olduğu düşünülmektedir (Baird 2003).

Koyunlarda yüzeysel lenf yumrularında ve özellikle iç organlarda lezyonlar gözlemlenirken, keçilerde baş ve boyun lenf düğümlerinde lezyonlara daha sık rastlanmaktadır (Muckle ve Gyles 1986, Williamson 2001). Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan araştırmalara göre az rastlanan bir durum olmakla beraber atlarda *C. pseudotuberculosis*'in yavru atmaya ve iç organ apselerine de yol açabileceği belirtilmiştir (Paton ve ark 2005).

1.6. Patogenez

C. pseudotuberculosis, koyun ve keçilerde yaradan bulaşarak lenf yollarıyla vücuda yayılmakta ve dolaşım sistemine geçişinin ardından lenf yumrusuna ve iç organlara yerleşerek kazeöz lezyon oluşturarak patojenite göstermektedir. İlk enfeksiyon dönemi 1 ile 4 gün, bulaşma bölgesinde nötrofillerin bölgede birikmesi ve etkenin çoğalarak pyogranuloma oluşturması 5 ile 10 gün sürmektedir (Pépin ve ark 1997, Bastos ve ark 2012). Bir çok çalışmada özellikle retrofaringial, parotid lenf nodülünde ve akciğerde kazeöz lezyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Baird ve Fontaine 2007) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. KLA enfeksiyonunda bronşiyal lenf nodülündeki apse.

PLD ve sitotoksik lipidler lokal enfeksiyon oluşumunun patojenitesinde rol oynarken, sistemik hastalık oluşumuna katkıda bulunmamaktadır. *C. pseudotuberculosis* nötrofil ve makrofaj tarafından yakalanmasının ardından fagolizom içerisinde saklanmaktadır (Batey 1986). *C. pseudotuberculosis* hücre içi özellikle makrofaj içerisine yerleşebilme özelliğine sahip olup 48 saatten fazla süre canlı kalabilmektedir. *C. pseudotuberculosis*'in patojenitesi hakkında hala bilinmeyen yada makrofaj ölümü gibi anlaşılamayan durumlar olduğu belirtilmektedir (Stefańska ve ark 2010, Bastos ve ark 2012). Ayrıca deneysel enfeksiyon oluşturulan keçilerin beyaz kan hücrelerinde özellikle makrofajlarında organize olmaktadırlar (Tashjian ve Campbell 1983, Pépin ve ark 1997, Stefańska ve ark 2010).

1.7. Korunma

C. pseudotuberculosis'in hücre içine yerleşmesi ve apseli granulom oluşturması sebebiyle KLA enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan antibiyotikler etkili olmamaktadır ve bundan dolayı enfeksiyon ciddiyetini korumaya devam etmektedir. Bu durum KLA enfeksiyonundan korunmada immunoproflaktik uygulamaların önemini arttırmaktadır (Olson ve ark 2002).

KLA enfeksiyonundan korunmada aşı çalışmaları ön plana çıkmaktadır ve enfeksiyon oluşumunda PLD enziminin önemi üzerine çeşitli çalışmalarda bulunmaktadır (Hodgson ve ark 1994, McNarmara ve ark 1994).

PLD enziminin KLA enfeksiyonunun oluşmasında önemli bir virülens faktörü olduğu bilinmektedir. PLD enzimi ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. PLD mutantlarının KLA enfeksiyonuna sebep olmadığı belirtilmiştir (Hodgson ve ark 1994, McNarmara ve ark 1994).

PLD ekzotoksininin karakterizasyonun yapılması ve mekanizmasının anlaşılmasından dolayı PLD toksini ile farklı aşı kombinasyonları yapılmış olup etkinlikleri karşılaştırılmış, koyun ve keçilerde kullanılabilinecek en etkili aşı kombinasyonunun bulunması hedeflenmiştir Özellikle, KLA enfeksiyonundan korunmaya yönelik aşı çalışmalarında PLD saf halde ve *E. coli*'de eksprese edilerek de kullanılmıştır (Egen ve ark 1989, Hongson ve ark 1990, Eggleton ve ark 1991, McNamara ve ark 1995).

KLA enfeksiyonuna karşı inaktif bakteri, atenue ve DNA aşı uygulamaları üzerine çeşitli aşı çalışmaları yapılmıştır (Leamaster ve ark 1987, Ellis ve 1991, Chaplin ve ark 1999, Pinho ve ark 2009). İnaktif bakterin *C. pseudotuberculosis* aşısı yaygın olarak kullanılmaktadır. KLA enfeksiyonunda, formalin ile inaktif edilen çeşitli PLD toksoid aşı formları kullanılmaktadır. İnaktif PLD toksiniyle aşılama sonrasında deneysel amaçlı yapılan çelınç sonrasında yayılımın önüne geçilmiştir (Brown ve ark 1986). Biyolojik inaktivasyonun toksisite riskini azaltmasının yanı sıra güvenilirliliğinin arttırmasına bağlı olarak kimyasal inaktivasyonla kıyaslandığında daha avantajlı olduğu bildirilmektedir (Hogson ve ark 1994).

İnaktif edilmiş olan PLD toksini ile beraber *Clostridium tetani*, *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. novyi* ve *Cl. chauvoei* içeren ticari aşı KLA enfeksiyonunu engellemek amacı ile sıklıkla kullanılmaktadır (Paton ve ark 2003, Piontkowski ve ark 1998, Stanford ve ark 1998, Williamson 2001).

KLA ile mücadelede yaygın olarak kullanılan konvansiyonel kombine toksoid aşı formunda olan *Clostridium tetani (C. tetani)*, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. chauvoei* etken toksinlerini ve inaktif PLD toksinini içeren aşının akciğer apselerini sayı ve büyüklüğünü azaltmakla beraber enfeksiyonun

saçılımınıda azalttığı belirtilmiştir (Paton ve ark 1994, Paton ve ark 2003, Williamson 2001). Ancak bu durumun aksine *Clostridium ssp.* toksinleri ile kombine edilen aşıdan ziyade toksinlerin monovalan halde aşı uygulamalarından daha başarılı sonuç alındığı bildirilmiştir (Anderson ve Narin 1984).

Klostridial aşılar ile kombine edilerek hazırlanan KLA'ya yönelik olarak kullanılan aşıların uygulandığı keçilerde aşının belirgin koruma sağladığı belirtilmesine karşın, klostridial komponentlerle kombine edilen polivalan aşılardan ziyade monovalan aşıların koruma gücünün daha iyi olduğu bildirilmiştir (Anderson ve Nain 1984). Avustralya kaynaklı aşı üretim merkezi tarafından 1983 yılından itibaren üretilen ticari kombine toksoid aşının KLA enfeksiyonundan korunmaya yönelik etkinliği üzerine yapılan araştırma sonucunda, akciğer apselerinin sayısını ve büyüklüğünü azalttığı ve saçılım oranını düşürdüğü bildirilmiştir (Paton ve ark 1995). Yapılan farklı araştırma sonucuna göre ise ticari kombine aşı ile aşılı kuzularda çelinç sonrası aşının etkinliğinin yeterli düzeyde olmadığı, akciğerde apselere rastlanıldığı belirtilmiştir (Fontaine ve ark 2006).

TAGEM tarafından desteklenen Sivas Koyun Keçi Yetiştiricileri Birliği yetiştiricilerinin koyun sürülerinde yaygın olarak görülen pseudotüberkülozis enfeksiyonu ile mücadele için, sahadan izole edilen patojen *C. pseudotuberculosis* suşu ile Alüminyum Hidroksit ($Al(OH)_3$) ile kombine edilen otovaksin aşısı 2007-2010 yıllarında (2010 yılında 90.000 doz hazırlanmıştır) yapılarak aşının uygulaması yapılmıştır (Erganiş 2010).

Erganiş ve ark. (2014), farklı aşı grupları oluşturulmuş ve aşı dozu 1 ml olarak belirlenmiş olup adjuvan olarak son konsantrasyonda %4 olacak şekilde $Al(OH)_3$ jeli kullanılmıştır. Aşı grupları; PLD 0.6 µg/ml, inaktif bakterin 1×10^9 ml/bakteri ve kombine PLD 0.6 µg/ml ve bakterin 1×10^9 ml/bakteri olmak üzere 3 farklı aşı grubu oluşturularak fare ve koyunlar üzerinde denemeleri yapılmıştır. PLD ve kombine aşıları ile aşılanan farelerde PLD ile çelinç sonrasında hastalık ve ölüm gözlenmezken, ticari aşı ile aşılı bir farede ölüm tespit etmişlerdir. *C. pseudotuberculosis*'e karşı oluşan immun cevap oluşumunun anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiş olup koyun ve keçilerde KLA enfeksiyonundan korunmaya yönelik %100 etkili aşı formulasyonu geliştirilememiştir (Bastos ve ark 2012, Dorella ve ark 2009). KLA'den korunmaya yönelik 40 yılı aşkın süredir yapılan

ticari aşı formları, aşı tipleri ve içerdiği farklı adjuvant tipleri bulunmaktadır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. KLA enfeksiyonuna karşı kullanılan ticari aşılar (Bastos ve ark 2012).

Sıra No	Üretim Yılı	Ülke	Hayvan Modeli	Aşı Modeli	Adjuvant Tipi	Uygulama Şekli
1	1972	Avustralya	Koyun	Bakterin	AP	-
2	1984	ABD	Koyun	Bakterin /CW	WOE	IM
3	1985	ABD	Fare	Bakterin /CW	MDP, TDM, BCG ve *Cpar*	IP
4	1986	ABD	Keçi	Toksoid	FIA	SC
5	1987	ABD	Koyun	Bakterin	-	SC
6	1988	Brazilya	Keçi	Bakterin	AP	-
7	1989	Norveç	Keçi	Bakterin/Toksoid	Levamizol	-
8	1989	Norveç	Keçi	Bakterin+Toksoid		-
9	1990	Norveç	Koyun/Fare	Bakterin	MDP	IM/IP
10	1991	Norveç	Koyun/Fare	CpW	MO + AA	IM
11	1991	Norveç	Koyun	CST	BPA	-
12	1991	Avustralya	Koyun	Toksoid /Bakterin+Toksoid	AH	SC
13	1991	Avustralya	Koyun	Toksoid /Toksoid *Cp* + 5 Clostridial Toksoid	AH / Sodium selenate	SC
14	1991	Avustralya	Koyun	Toksoid *Cp* + 5 Clostridial Toksoid	AH	SC
15	1991	Brazilya	Keçi	Bakterin/canlı atenue Cp	AP+Bakterin	ID
16	1992	Avustralya	Koyun	Toxminus Cp	-	SC
17	1994	Avustralya	Koyun	Toxminus *Cp* / Rekombinant Toxminus *Cp*	-	OR
18	1994	Avustralya	Koyun	40-kDa antijen	AH	SC

Çizelge 1.1 (Devam). KLA enfeksiyonuna karşı kullanılan ticari aşılar (Bastos ve ark 2012).

19	1996	ABD	Koyun/Keçi	Bakterin	MDP + MO	IM
20	1997	Avustralya	Fare	Canlı *Cp aroQ* mutant / canlı *Cp pld* mutant	-	IP
21	1998	Avustralya	Koyun	Canlı *Cp aroQ* mutant	-	SC
22	1998	Kanada	Koyun	Glanvac 6	MDP +MO bakterin	SC/IM
23	1998	ABD	Koyun	Bakterin+Toksoid	AH	SC
24	1999	Avustralya	Koyun	Glanvac 6 / Rekombinant Glanvac® 6	MA	SC
25	2000	Almanya	Keçi	CW	-	-
26	2000	Avustralya	Koyun	Toksoid Cp + 5 Clostridial toksoids	AH / Moxidectin	SC
27	2002	Brazilya	Keçi	Liyofilize canlı Cp	-	ID
28	2003	Peru	Fare	CST	AH	SC
29	2005	Mısır	Fare	Bakterin, toksoid / bakterin+toksoid	MO	SC
30	2006	İngiltere	Koyun	Bakterin, rPLD, bakterin + rPLD, Glanvac® 3	AH	SC
31	2007	Peru	Alpaka	Canlı Cp	-	SC
32	2007	Peru	Alpaka	CW /CST	MDP	SC
33	2007	Mısır	Fare	Bakterin, rPLD, / bakterin + rPLD	MO	SC
34	2008	Brazilya	Keçi	CST, konsantre CST + oligodeoksinükleotid CpG, / canlı attenue Cp	FIA	SC
35	2009	Brazilya	Fare	Rekombinant Isı-şok protein 60 (rHsp60)	FCA / FIA	SC

Çizelge 1.1 (Devam). KLA enfeksiyonuna karşı kullanılan ticari aşılar (Bastos ve ark 2012).

36	2010	Mısır	Koyun	Bakterin, bakterin + rPLD, Gamma-radyonize Cp + rPLD/ BCG + rPLD	MO (BCG içeren)	
37	2010	ABD	Fare	Bakterin+Toksoid	-	
38	2010	Türkiye	Koyun	Bakterin+Toksoid	FCA	
39	2012	Türkiye	Fare/ Koyun	Bakterin+Toksoid	AH	SC
40	2011	Suudi Arabistan Krallığı	Koyun	Glanvac 6	Zeytin Yağı	

Cp = *C. pseudotuberculosis*; Bakterin = *Cp* inaktif tüm hücre; CW = sonike *Cp* hücre duvarı; CST = filtre edilmiş ekzotoksin içeren kültür üst sıvıı; Toksoid = inaktif ekzotoksinler veya *Fosfolipaz D* (PLD); rPLD = rekombinant PLD; Glanvac® and Case-Vac® = ticari aşı; Toxminus = PLD geni çıkarılan Cp; Adjuvantlar- WOE = Water-in-oil emülsiyon; MO = Mineral Oil; AA = Arlakell A veya monooleate of manitol; AH = Aluminum hidroksit; AP = Alüminyum fosfat; MDP = Muramil dipeptid; TDM = Trehaloz dimikolat; BCG = ısı ile inaktif *Mycobacterium bovis* BCG; *Cpar* = ısı inaktif *Corynebacterium parvum*; FCA = Complete Freund's Adjuvant; FIA = İncomplete Freund's Adjuvant; BPA = Blok Polimer adjuvant; MA= Multikomponent adjuvant; Route of administration - SC = Subkutan; IM = İntramuskular; IP = İntraperitoneal; ID = İntradermal; OR = Oral.

1.8. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Bazı bakteriler sahip oldukları çeşitli tipteki hemolizin enzimleri ile kandaki eritrositleri çeşitli derecelerde hemoliz etme yani parçalama yeteneğine sahiptirler. Bakterilerin hemoliz yeteneği kanlı agar kullanılarak test edilebilmektedir (Anonim 3).

1.8.1. CAMP Benzeri Reaksiyon

CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen Like Reaction) testi ilk defa Christie, Atkins and Munch-Petersen tarafından 1944 yılında geliştirilmiştir. Bu test ile beta hemolitik *Streptococcus agalactia* (*Str. agalactia*) suşlarının sentezlediği 25 kDa moleküler ağırlığında hüre dışı sitolizinin enzimi ile *S. aureus*'un sentezlediği ısıya dayanıklı hücre dışı β-lizin enzimi arasındaki sinerjistik ilişkiden yararlanarak

geliştirilmiştir. Testin yapıldığı %5 koyun eritrositini içeren kanlı agara *S. aureus* yatay, *Str. agalactia* şüpheli suş dikey olacak şekilde ekimi yapılarak inkübasyon sonunda şüpheli suş *Str. agalactia* ise *S. aureus* ekim hattına doğru ok şeklinde hemolizin varlığı ile suşun identifikasyonu yapılmaktadır (Arda 1992, Ivanović ve ark 2009).

Reverse CAMP test

CAMP testi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda farklı bakteriler arasında da bu tür bir etkileşim olduğu belirtilmektedir. Bu bakteriler arasında *C. pseudotuberculosis'*in de bulunduğu bildirilmiştir. *C. pseudotuberculosis'*in sentezlediği PLD enzimi ile *S. aureus*'un sentezlediği β- hemolizin ve *R. equi*'nin sentezlediği fosfolipaz C enzimleri arasındaki ilişki Reverse CAMP test ile gösterilmektedir. C. *pseudotuberculosis'*in PLD enzim etkinliği, *R. equi*'nin sentezlediği fosfolipaz C enzimi ile artarken, *S. aureus'*in sentezlediği stafilokokal β-hemolizin ile azalmaktadır (Songer ve ark 1987, Egen ve ark 1988).

1.8.2. Hemoliz İnhibisyon Testi

PLD, *in vitro* ortamlarda koyun eritrositlerini lize edebilme özelliğine sahiptir. Toksinin bu özelliğinden yararlanılarak, PLD'ye karşı oluşmuş antikorların ortaya konulması amacıyla eritrositlerin hemolizi esasına dayanan bazı serolojik testler geliştirilerek ve teşhiste kullanılmaktadır (İlhan ve ark 2001). Bu testler arasında hemoliz inhibisyon, sinerjik hemoliz inhibisyon, anti hemoliz inhibisyon testleri yer almaktadır (Burrell 1980, Ellis ve ark 1991).

1.8.3. Agar-Jel İmmünodifüzyon Tekniği

Vücuda giren enfeksiyöz ajanlara karşı enfeksiyon yapma yeteneğini ortadan kaldıran antikorlara meydana gelir ki bu duruma nötralizan adı verilir. Nötralizan antikorların varlığını gözlemleyebilmek içinde nötralizasyon test geliştirilmiştir. Bu test sadece viruslara özgü olmayıp toksin ve enzimler için de uygulanabilir. Nötralizasyon testi hem antijenlerin (virusların) ve hem de spesifik nötralizan antikorların belirlenmesinde kullanılabilir (Anonim 4).

Agar-Jel İmmünodifüzyon Tekniği (AGİD) birbirine yakın radyal konumlu delik açılarak, antijenle antikor spesifiteleri hakkında bilginin edinilmesini sağlayan

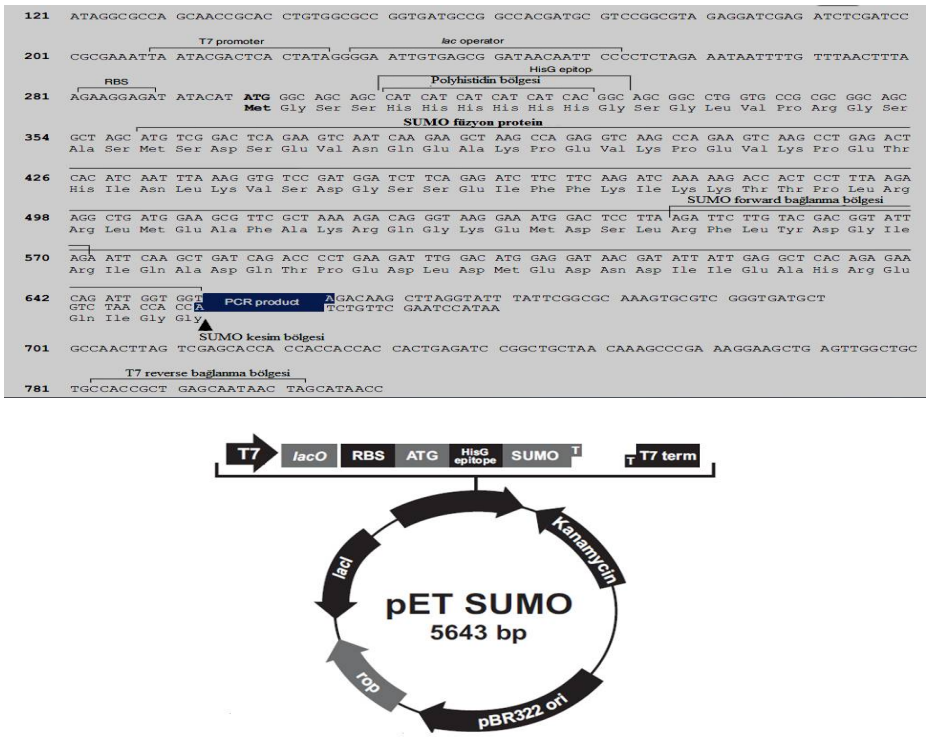
bir testtir. Amaca göre bu deliklere çeşitli pozisyonlarda, serum ve antijen konur. Böylece bu test ile bilinmeyen antijenler arasındaki ilişki veya bir serumdaki bilinmeyen antikorların niteliği hakkında bilgi edinilebilinir (Diker 2005)

1.9. Klonlama Çalışmasında Kullanılan Vektör Sistemi

1.9.1. Champion™ pET SUMO Protein Expression Vektör

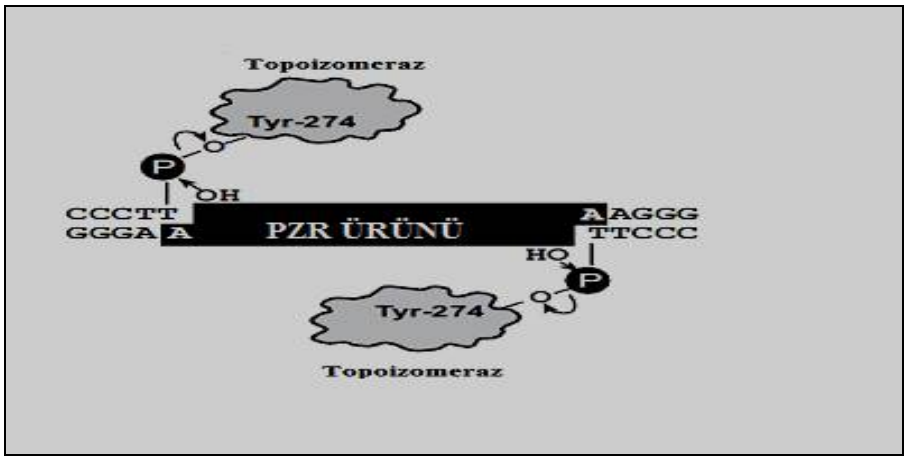
Ekspresyon plazmid vektör, hedef DNA'nın gen ürünü yabancı bir konakçı hücre içerisinde proteini sentezlettirilmesi amaçlandığında tercih edilmektedir. Ekspresör vektörler, klonlama vektörleriyle karşılaştırıldığında, bağımsız replikasyon orjini, Multipe (çoklu) Klonlama Bölgesi, direnç genini barındırmasının yanı sıra promotor, Ribozom Bağlanma Bölgesi (RBS), lac operatör bölgelerini barındırmaktadır (Mullis 1990).

pET SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) vektör sistemi rekombinant proteinlerin klonlanması ve *E. coli*'de ekspresyonu için geliştirilmiş yeni ve güçlü bir sistemdir. İstenilen proteinin büyük miktarda ve hızlı üretilebilmesini sağlayacak şekilde tasarlanmıştır. pET SUMO vektör sistemi içerisinde bulunan, T7 bakteriyofajının güçlü transkripsiyon ve translasyon sinyalleri kontrolünde proteinlerin eksprese olmasını sağlar. Protein ekspresyonu, kompetan hücrenin T7 RNA polimerazı ile de teşvik edilir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. pET SUMO vektör sisteminin yapısal özellikleri.

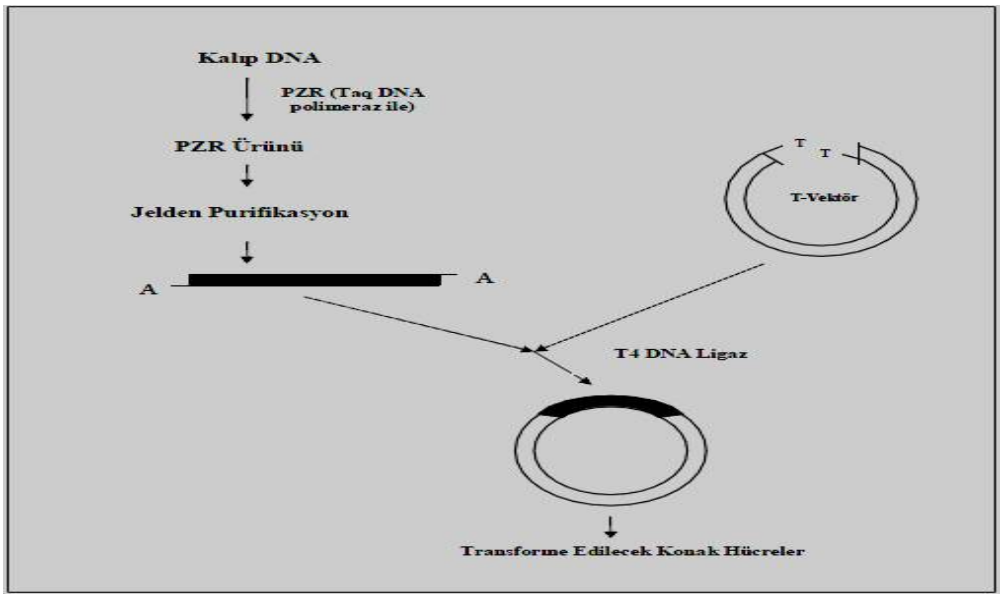
Topoizomeraz I, *Vaccinia* viruslardan izole edilen, çift sarmallı DNA'nın özel bölgelerine bağlanabilen 5'-CCCTT tek iplikçiğinden sonra fosfodiester bağının parçalaması sonrasında açığa çıkan enerji ile tirozil rezidue (Tyr-274) 3' fosfat (P) arasında kovalent bağ oluşmasını sağlayan bir enzim olmasından yararlanılarak T/A klonlama gerçekleştirilebilmektedir (Shuman 1994) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Topoizomeraz enziminin T/A klonlamadaki rolü.

Taq polimeraz enzimi gibi bazı polimeraz enzimleri PZR işleminin son safhasında çok sayıda kopyası oluşan çift sarmallı DNA kalıbının 3' ucuna tek

deoksiadenozin (A) nükleotidi ilave edebilmektedir. Taq polimerazın bu işlevinden yararlanılarak klonlanması hedeflenen DNA'yı ve kullanılacak olan vektörü RE'ler ile muamele etmeksizin vektöre bağlanma gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. T/A klonlama yöntemi (Zhou ve ark 2000).

1.10. Rekombinant PLD Üretimi İlgili Yapılan Araştırmalar

E.coli'de rekombinant protein sentezi esnasında en büyük problem yüksek oranda çözünmeyen protein sentezinin olmasıdır. Çözünmeyen protein oluşumunun engellenmesi için ısı, sentetik uyaran konsantrasyonu ve promotor gücünün uygun düzeyde ayarlanması çözünebilir protein sentezi yüzdesinin arttırılmasında önemli rol oynamaktadır. Hücresel toksisite ve inklüzyon form, rekombinant protein sentezinin çözünebilir formda supernatantta bulunma yüzdesini düşürdüğü ve verimi azalttığı bildirilmiştir (Jeffrey ve ark 1996). Rekombinant protein sentezindeki sorunları aşmak amacı ile birçok taşıyıcı bakteri ve vektör sistemi geliştirilmiştir (Baneyx 1999, Georgiou ve Valax 1996).

Çözünebilir rekombinant protein üretiminde kullanılan besiyeri bileşimi kadar sentezlettirmeyi uyarmak için kullanılan Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) oranının ve uyarma esnasındaki inkübasyon sıcaklığının önemi vurgulanmaktadır (Galloway ve ark 2003).

PZR ile çoğaltılan PLD geni restriksiyon enzimleri ile kesilerek kapalı pCpOl vektör (Promega) sistemine bağlanmasından sonra rekombinasyon işlemini

doğrulama amacı ile %5 koyun serumu içeren LB agara ekim yapmışlardır. Doğrulaması yapılan rPLD geni pCpO5O vektör sistemine ligasyonu gerçekleştirdikten sonra *E. coli* JM109 (Promega) aktarımı yapılarak rPLD sentezi için LB sıvı besiyerini kullanmışlar ve doğrulamasını Western blot ve Southern Blot ile yapmışlardır (Songer ve ark 1990).

PZR ile çoğaltılan PLD geni restriksiyon enzimleri ile kesilerek kapalı pUC12 vektör (Addgene) sistemine bağlandıktan sonra *E. coli* DH5α'e (Bethesda Araştırma Laboratuarı) transformasyonu sonrasında rekombinant PLD üretimi için LB sıvı besiyerinde 37ºC'de inkübe edilmiştir. RPLD toksini kompetan bakteri içerisinde olması sebebi ile bakteri parçalanarak enzim açığa çıkartılmıştır ve doğrulamasını Western blot ile yapmışlardır (Adrian ve ark 1990).

PZR ile çoğaltılan PLD geni kapalı pET-15b vektör (Novagene) sistemine bağlanması sonrasında *E. coli* XL10-Gold Kan (Stratagene) konakçı bakteriye aktarımı yapılarak dizi analizi ile rekombinasyon işlemini doğrulamışlar ve rekombinant PLD enzimini sentezlettirmek için klonlaması doğrulanan geni pMMF004 vektör sistemine bağlanma işlemini yaparak *E.coli* BL21(DE3) (İnvitrogen) aktarımı yapmışlardır. Luria Bertani (LB) sıvı besiyerinde 10 mM glikoz IPTG final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde sentez indüklenerek 3 saat inkübe ettikten sonra rekombinant PLD (rPLD) sentezini doğrulamak amacı ile Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) yöntemini kullanmışlardır (Fontaine ve ark 2006).

1.11. Protein Saflaştırılmasında Kullanılan Yöntemler

Protein saflaştırma işleminde temel kriter en düşük maliyetle, en yüksek saflık ve enzim aktivitesi elde etmektir. Çok çeşitli protein saflaştırma yöntemleri bulunmaktadır;

I- Enzim Kaynağından Enzimin Çıkarılması: Bu işlem her kaynak için farklı şekillerde yapılabilir. Örneğin bakteriler için sonikasyon kullanılırken, bitkiler için ezme yöntemi kullanılabilir.

II- Santrifüjleme: Değişik basamaklarda uygulanabilecek bir işlemdir. Birinci basamaktan sonra hücre organellerinin ve büyük partiküllerin uzaklaştırılması için

kullanılabilir. Bunu yanı sıra amonyum sülfatla çöktürme işleminden sonra da yapılabilir.

III- Amonyum Sülfatla Çöktürme: Belirli doygunluk derecesine göre eklenen amonyum sülfat değişik molekül ağırlığındaki enzimlerin çökmesine neden olur. Çöktürme işlemlerindeki uygun aralık bulunduğu zaman diğer proteinlerden uzaklaştırılmış olur.

IV- Diyaliz: Osmotik basınca dayalı bir sistem olmakla beraber istenmeyen küçük maddelerden kurtulmak için yapılan bir işlemdir.

V- Isıtma: Çalışılan enzim ve solüsyonda bulunan diğer proteinlerin özellikleri göz önünde bulundurarak belirli dereceye kadar ısıtma işlemi ile diğer proteinlerin denatüre edilerek ortamdan uzaklaştırılmasına dayalı bir yöntemdir.

VI- İzoelektrik Noktaya Göre Çöktürme: Aranılan enzimin izoelektrik noktasına göre belli bir PH aralığında karıştırılarak yapılan çöktürme işlemidir (Anonim 5).

1.11.1. Çalışmada Kullanılan Protein Konsantrasyon ve Saflaştırma Yöntemleri

Çalışmada protein konsantrasyon işleminde ultrafiltrasyon sistemi kullanıldı. Ultrafiltrasyon sisteminde hedef proteinin moleküler ağırlığına uygun olarak seçilen selülotik yapıda protein bağlamayan özellikte kaset membran filtreler kullanılmaktadır. Kaset membran filtrelerin por çapları 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 50 kDa, 100 kDa, 300 kDa olan kaset filtre sistemleri bulunmaktadır. Hedef proteine yönelik por çapı uygun filtreler belirlendikten cihazı kurulumu yapılırarak ve tercih edilen por çapına uygun hızda filtrasyon işlemi gerçekleştirilir.

Çalışmada rekombinant protein saflaştırılmasında kolon kromotografi yöntemi kullanıldı. Rekombinant protein ile beraber champion™ pET SUMO protein expression vektör sistemine bağlı 6xHis-tagged proteinini yapısında bulundurması sebebiyle sentezlenen rekombinant proteinin saflaştırma işlemi güvenilir şekilde yapılabilmektedir. Saflaştırma işlemi metal affinite kolon kromotografisine sistemine dayalı yöntem yapılmaktadır. Rekombinant proteine bağlı füzyon proteinine özel resin veya manyetik etkinliğe sahip olan çeşitli kolonlar kullanılarak saflaştırma işlemi yapılabilmektedir. (Brown 2001).

1.12. Hayvan Deneyi

1.12.1. Zararsızlık Testi

Deney hayvanları yeni geliştirilen bir ilacın etkinliğinin araştırılması, o ilacın özel bir hastalıkta kullanım etkinliğinin saptanması ve hastada güvenli kullanım derecesinin ortaya konulmasında tercih edilmektedir (Saygı ve ark 1997). Bu amaçla, deney hayvanlarında hastalık oluşturulur ve yeni sentezlenmiş bir madde deney hayvanına verilerek etkili olup olmadığı araştırılır (Saygı 2003, Mouse Safety Test 2014).

1.12.2. Toksisite Testi

Letal Doz belirleme testi

Bir enzimin veya kimyasal maddenin toksisite potansiyelini belirlemek için akut toksisite testinin yapılması gerekmektedir. Bu amaç ile en yaygın kullanılan akut toksisite testi letalite testidir. Bu testin amacı, bir kimyasal maddeye maruziyetin sonucu ortaya çıkabilecek toksik semptomlar, beyin, böbrek, karaciğer gibi belli başlı organların etkileniş derecesi veya öldürücü doz (letalite) değerine göre hesaplanmaktadır. Letal doz değeri (LD), o maddenin ne kadar güvenli kullanılabileceğinin de bir göstergesi olarak kabul edilir. Test genellikle fare veya sıçan gibi temini kolay ve maliyeti düşük deney hayvanları üzerinde yapılır. Bu hayvanlardan alınacak sonuçlara göre, test kobay veya tavşan üzerinde de tekrarlanabilir (Lorke 1975, Saygı 2003).

1.13. Rekombinant PLD Etkinliğine Yönelik Yapılan Aşı Çalışmaları

Mikroorganizmaların antijenik yapıları, hastalık oluşturma mekanizmaları ve immun sistem ile ilişkileri birbirlerinden farklı olabilir. Bundan dolayı mikroorganizmalardan ileri gelen enfeksiyonlara karşı farklı tipte aşı üretilir (Erganiş ve Kaya 1990, Erganiş ve İstanbulluoğlu 1993, Erganiş 1994, Erganiş 2009, Erganiş 2014).

Rekombinant DNA teknikleri canlı vücudunda mikroorganizmanın enfeksiyon oluşturması esnasında patojenitesinde rol oynayan hedef antijenin başka

bir konakçıda üretilerek daha saf halde ve bol miktarda üretilmesi ile elde edilen rekombinant proteinlerin sonrasında aşı uygulamalarında kullanım şeklidir.

Rekombinant antijen elde edilerek aşı uygulaması, ilk defa şap virusunun koruyucu antijenini (VP1) kodlayan genleri plazmide aktarıldıktan sonra konakçı bakteride eksprese ettirildikten sonra yapılmıştır (Carrillo ve ark 1998, Wigdorovitz ve ark 1999).

Hodgson ve ark (1992), *C. pseudotuberculosis* genomundan PLD geni çıkartılan Toxminus (Rekombinant *C. pseudotuberculosis*) olarak adlandırılan rekombinant suş ile sahadan izole edilen *C. pseudotuberculosis* suş kullanılmıştır. Aşı uygulamasında 2 ml aşı dozunda 10^8 cfu/ml ile 10^{10} cfu/ml olacak şekilde sulandırma yapılmış ve aşı gruplarının denemesinde 9 aylık kuzu grupları kullanılarak deneme gruplarının etkinliği karşılaştırılmıştır. Mutant PLD'nin yayılımı engelleyemediği fakat immun sistemi uyardığı bildirilmiştir. Bununla birlikte canlı mutant suşundan, aşı formulasyonu içerisinde kullanımı sonrasında beklenen olumlu sonucun alınmadığı bildirilmiştir.

Hodgson ve ark (1994), KLA enfeksiyonuna karşı genomundan PLD geni çıkartılan *C. pseudotuberculosis* formu olan Toxminus (Rekombinant *C. pseudotuberculosis*) ve *C. pseudotuberculosis*'in PLD enzimi ile hazırlanan 2 farklı canlı aşı ile oral yolla aşılanan koyun grubunda aşı etkinliğinin ölçümüne yönelik yapılan 6. hafta sonunda 1×10^6 ml/bakteri ile çelınç denemesi yapılmış olup tek doz oral yol ile uygulanan Toxminus ile hazırlanan aşının, çelınç uygulama sonrası koyunlarda koruyuculuğunun olmadığı belirtilmiştir

Hodgson ve ark (1999), KLA enfeksiyonundan korunmaya yönelik yapılan, *C. pseudotuberculosis* formalin ile inaktivasyonu sonrasında tek dozda 5×10^9 bakteri ve rekombinant PLD toksini tek dozda 50 µg olacak şekilde 2 faklı aşı formulasyonu % 50 (v/v) oranında Alüminyum hidroksit ile kombine edilerek hazırlanan aşılar ile etkinlik denemesi yapılmıştır. Sonuçlar Glanvac 3^{TM} ile karşılaştırılmıştır. Aşılama sonrası oluşan nötralizan anti-PLD antikorların koruyucu bağışıklığın sağlanmasında etkili olduğu belirtilmiştir (Burrell 1978, Eggleton ve ark 2005, Batey 1986, Sutherland ve ark 1992). Ancak başka bir araştırmaya göre genetik olarak inaktif

olan PLD ile hazırlanan Glanvac 3^{TM} ile aşılama sonrası hayvanlarda KLA enfeksiyonundan korunmaya yönelik etkili bağışıklığın sağlanamadığı belirtilmiştir

Moore ve ark (2000), büyük immünodominant antijenlerden arındırılan virülens yönünden inaktif edilerek atenue hale getirilen Toxminus suşu rekombinant canlı bir vektör olarak kullanılmaktadır. Toxminus suşunun mutant PLD geni barındırmasına paralel olarak konakçısında inaktif PLD toksini sentezlemektedir. Koyunlara Toxminus ve inaktif PLD geni taşıyan Toxminus suşundan 2 ayrı aşı hazırlanarak oral yolla verilmesi sonrasında her iki aşıya da bağlı olarak benzer humoral bağışıklığın oluştuğu gözlemlenmiştir. Ancak inaktif PLD geni taşıyan suş ile aşılı hayvanlarda daha çabuk ve daha güçlü bir bağışıklık şekillenmiştir. Çelınç denemesi sonrasında Toxminus suşu ile oral yolla aşılanan aşılı hayvanlarda çelınca karşı korumada yeterli bağışıklığın oluşmadığı, subkutan aşılama sonrasında korumanın gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu durumun aşının veriliş şekliyle ilgili olduğu belirtilmiştir.

Fontaine ve ark (2006) tarafından 1 ml aşı dozunda %50 oranında $Al(OH)_3$ olacak şekilde adjuvan kullanılmıştır. Farklı antijen kombinasyonunun aşı etkinliği üzerine etkisini değerlendirmek amacı ile; 50 µg/ml rPLD, inaktif *C. pseudotuberculosis* 5×10^9 cfu/ml bakterin, 50 µg/ml rPLD ve inaktif *C. pseudotuberculosis* 5×10^9 cfu/ml bakterin olacak şekilde 4 farklı aşı grubu oluşturulmuş ve etkinliği inaktif PLD enzimi barındıran Glanvac-3^{TM} (Commonwealth Serum Laboratories (CSL), Avustralya) ile karşılaştırılmıştır. RPLD ile aşılı hayvanlarda humoral bağışıklığın etkili şekilde uyarıldığı ancak PLD temelli hazırlanan aşılarda hücresel bağışıklığın uyarılmadığı ve adjuvant ile desteklenmesinin gerektiği belirtilmiş olup, ayrıca ülkede şiddetli enfeksiyona yol açan yerel saha izolatları ile hazırlanan aşı etkinliğinin diğer aşılardan daha etkili olduğu bildirilmektedir.

1.14. Adjuvant Kullanımı

1.14.1. Adjuvantın Genel Özellikleri

Enfeksiyöz hastalıklara karşı hazırlanan aşılarda immun cevabın etkisini arttırabilmek en önemli hedeftir. Bu sebeple adjuvant kullanımı kaçınılmaz bir durum olarak ortaya çıkmıştır. Adjuvantın Latinceden dilimize giren kelime kökü

‘’Adjuvare’’ olmakla beraber anlamı yardımcı ya da arttırmak şeklinde tanımlanmaktadır (Vogel 1998). Adjuvantlar etki şekline, tipine göre antijenlerin etkisini arttıran, çoklu aşılama sonrası immun yanıtı uyaranların yanı sıra tek enjeksiyon ile de immun yanıt uyaranlar, yetişkinlerde ve immun yanıtı zayıf çocuklarda sitotoksik T lenfositleri uyaranlar olarak sınıflandırılmaktadır (Aguilar ve Rodriguez, 2007, Achal ve ark 2005, Sivakumar ve ark 2011, Sezer 2011).

Aşı çalışmalarında; suş, antijen miktarı, inaktivasyon yöntemleri ve kullanılan adjuvantın çeşidi şekillenecek humoral ve hücresel bağışıklık üzerinde etkili olabilmektedir (Hadimli ve ark 2007).

Hedef hastalığa karşı koruma sağlamak için hazırlanan aşı içerisinde immun sistemin cevabını kuvvetlendirmek, koruyucu etkisini arttırmak ve uzun vadede de devam ettirebilmesini sağlamak amacı ile aşı kombinasyonu içerisinde etki şekline göre çeşitli adjuvantlar tercih edilmektedir (Berg ve ark 2007, Horne ve ark 1984).

Birçok immunojen, aşı olarak kullanılacağında vücutta daha uzun süre kalması için yavaş emileceği bir bölgeden ve emilmeyi yavaşlatarak immünojeniteyi arttıran adjuvantlarla karıştırılarak kullanılır (Erganiş ve İstanbulluoğlu 1993).

Özellikle de inaktif mikroorganizmaların vücutta çok hızlı şekilde katabolize olmaları, immun yanıtı yeterince uzun süre uyaramamalarına neden olur. Bu nedenle inaktif aşıların etkinliğini arttırmak için vücutta daha uzun süre kalmalarını sağlayacak ve immünolojik belleği uyaracak şekilde verilmeleri gerekmektedir (Diker 1998, Kampstrup e ark 1999) (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Bazı önemli adjuvantlar ve etki tarzları (Diker 1998).

Tip	**Adjuvant**	**Etki Tarzı**
Alüminyum Tuzları	Alüminyum fosfat	Depo etkisi
	Alüminyum hidroksit	Depo etkisi
Su-Yağ Emülsiyonları	İnkomplete Freund Adjuvant (IFA)	Depo Etkisi
	Mineral Yağlar	Depo etkisi
Bakteriyel Fraksiyonlar	Anaerobik Corinebakteri	Makrofaj uyarıcısı
	BCG	Makrofaj uyarıcısı
	Muramil dipeptid	Makrofaj uyarıcısı
	Bordotella pertussis	Lenfosit uyarıcısı
	LPS	Makrofaj uyarıcıs
Yüzey Aktif Ajanlar	Saponin	Antijen işlenme uyarıcısı
	Lizolesitin	Antijen işlenme uyarıcısı
	Pluronik deterjanlar	Antien işlenme uyarıcısı
Kompleks Karbonhidratlar	Glukanlar	Makrofaj uyrıcısı
Karışık Adjuvantlar	Freund Complete Adjuvant (CFA)	Makrofaj ve T hücre uyarıcısı

Aşı etkinliğinin arttırılmasında seçilen adjuvant büyük önem taşımaktadır. Özellikle rekombinant ve sentetik protein kombinasyonundan oluşan aşılar ve inaktif mikroorganizmalardan hazırlanan aşıların etkinliği karşılaştırıldığında; rekombinant ve sentetik proteinlerin daha az immunojen özellik göstermesinden dolayı aşılama sonrası bağışıklık düzeyinin daha düşük seyrettiği gözlemlenmiştir. Bu durum ile karşılaşılmasından dolayı daha spesifik adjuvantların aşı kombinasyonlarında kullanılmasının gerekliliği düşünülmüştür. Adjuvant seçimi hedef canlının özelliklerine, antijenin immun cevabı oluşturma ve aşının verilme şekline göre değişmektedir (Aucouturier ve ark 2001).

1.14.2. Çalışmada Kullanılan Adjuvant Emülsüyonları

Adjuvant emülsiyonları sınıfında FIA, Montanide, Adjuvant 65 ve lipovant bulunmaktadır (Byars ve Allison 1990). Adjuvant emülsiyonlarının mekanizmasının en büyük özelliği aşı içerisinde bulunan antijenin enjeksiyon yerinden oldukça yavaş salınımını sağlaması ve plazma hücrelerinden antikor salgılanmasını uyarmasıdır (Freund 1956). Genellikle bu tip adjuvantların insanlarda oldukça toksik olduğu

bilinmektedir. Enjeksiyon yerinde yangıya, granuloma ve ülsere neden olabilirler (Waters ve ark 1986). Montanide yağlı adjuvantlar doğal, rekombinant protein ve sentetik proteinlerle beraber deneysel amaçlı olarak fare, rat, kedi ve köpeklerde kullanılmıştır. İnsanlarda Human İndeficiency Virus (HIV), Malarya ve akciğer kanserine karşı aşı uygulamarında kullanılmıştır (Jones 1990).

Mineral yağ bazlı adjuvan formları

Adjuvantı oluşturan dağınık ve devamlı fazın stabilizesini arttırmak için yüzey gerilimini azaltan maddeler ilave edilmektedir. Hidrofilik/Lipofilik Balans'ına (HLB) göre çeşitli emülsiyonlar bulunmaktadır. HLB'nin durumuna göre su içinde yağ (Water-in Oil, W/O), yağ içinde su (Oil-in Water, O/W), su içinde yağ içinde su (Water-in-Oil-in-Water W/O/W) formları bulunmaktadır (Aucouturier ve ark 2001).

W/O kuvvetli ve uzun süreli bağışıklığı uyarması sebebiyle kanatlı aşılarında adjuvant olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak adjuvantın içeriğini oluşturan yağın yapısının güvenilirliği hususunda dikkat edilmelidir (Belloc ve ark 2008). W/O formunda olan adjuvantların humoral bağışıklığı uyardığı bilinmekle beraber yeni formüle edilen yağlı adjuvantların aşılama sonrası hücresel bağışıklığıda uyardığı bildirilmiştir (Arous ve ark 2013).

O/W kombine edildiği antijeni enjeksiyon yerinde yavaş emilmesini engelleyememekte bu sebeple W/O emülsiyonuna göre etki gücü daha zayıf sayılmaktadır. W/O emülsiyonu ise antijen salınımına engel olabilmekte yada çok yavaş şekilde salınımını sağlamaktadır. W/OW mineral adjuvant formunun etki şekli bakımından O/W ve W/O arasında sayılmaktadır (Aucouturier ve ark 2001).

Complete Freund's Adjuvant (CFA)

İnaktive *Salmonella typhimurium* süspansiyonu mineral yağ ile beraber ilk defa adjuvant olarak kullanılmıştır (Le Moignic Piony 1916). 1925 yılında Ramon difterik ve tetanoz antitoksinin vücutta etkisini arttırmak amacıyla aşıya lesitin, saponin, ekmek kırıntısı, nişasta yağı, tapyoka ve agar ekleyerek adjuvantın önemi üzerinde durmuştur (Edelman 2000). Freund tarafından 1930 yılında formulasyonu W/O (water in oil) olan %10 mannide monooleate içeren ''İncomplete Freund's Adjuvant'' (IFA) ve ölü patojen *Mycobacterium tuberculosis* (TB) içeren W/O

formunda olan ‘’Complete Freund’s Adjuvant’’ (CFA) olmak üzere iki önemli adjuvant geliştirilmiştir (Ott ve Nest 2007). Adjuvantın ilk kullanımından günümüze kadar geçen süre içerisinde de çeşitli adjuvantlar geliştirilmiş olup kullanılmaktadır.

Complete Freund’s Adjuvant, yağlı adjuvantlar sınıfına dahil edilmekle beraber W/O fazındadır. IFA, CFA’nın aksine inaktif *Mycobacterium tuberculosis* barındırmaması ile CFA’dan farklıdır. CFA humoral bağışıklığın yanı sıra hücresel bağışıklığıda uyarması ile diğer adjuvantlardan farklıdır (Lindblad 2000, Stills 2005).

CFA’nın uygulama yapıldığı bölgede granulom, nekroz, doku harabiyeti ve buna bağlı olarak aşılanan hayvanda stres oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir (Jiao ve ark 2010). Aşı içeriğinde adjuvant olarak CFA bulunması halinde aşının yapıldığı bölgede lezyonlarla karşılaşılabileceği bildirilmiştir. Ayrıca CFA inaktif *Mycobacterium tuberculosis* bazı antijenlerini barındırmasının tüberkülin PPD deri testinde yanlış pozitifliğede sebep olabileceği düşünülerek inaktif *Mycobacterium butyricum* içeren Modifiye Freund’s Complete Adjuvant’ın (mCFA) kullanımını daha avantajlı kıldığı belirtilmiştir (Conforti ve ark 2008, Karakuş ve ark 2013).

Freund Adjuvant, otoimmun hastalıkların deneysel hayvan modeli üzerinde uygulanmasına yönelik tercih edilen başlıca adjuvant çeşididir (Billiau ve Matthys 2001). Freund’s adjuvant ile ilgili uzun yıllardır yapılan araştırmalar sonucunda, deney hayvanlarına uygulama sonrası etkili düzeyde antikor salınımını uyardığı gözlemlenmiştir. CFA ısıyla inaktif edilmiş *Mycobacteria ssp.* antijeni içermesinin etkisiyle antikor salınımını uyarmasına karşın yan etkilerinin de olduğu belirtilmiştir (Jackson ve Fox 1995).

20. yüzyılın ikinci yarısından sonra CFA ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Billiau ve Matthys 2001). CFA’ya bağlı olarak enjeksiyon yerinde yangıyla beraber bölgesel veya uzaktaki lenf nodülüne bağlı olarak hiperplazi ve yapısal değişiklikler gözlemlenmiştir. Yapılan ilk çalışmalarda parafin oil içerisinde bulunan inaktif *Mycobacteria*, lenf nodülü içerisinde tüberkül benzeri lezyon oluşumuna sebep olduğu bildirilmiştir (Freund 1956, Rigdon ve Schadewald 1972, Wanstrup ve Christensen 1965).

Montanide ISA 206 VG (Vegetable Grade)

Montanide ISA 206 VG (ISA 206 VG) adjuvan tipi W/O/W fazında mannitol ve oleik asidi barındıran bitkisel mineral yağ içeren, hayvansal orjinli bileşik barındırmayan, uzun süreli ve etkili şekilde humoral ve hücresel immun yanıtın uyarılmasını sağlayan enjeksiyon uygulaması kolay adjuvant emülsüyonudur (Anonim 9).

Montanide ISA 201 VG (Vegetable Grade)

Montanide ISA 201 VG (ISA 201 VG) adjuvan tipi W/O/W fazında mannitol ve oleik asidi barındıran bitkisel mineral yağ içeren, hayvansal orjinli bileşik barındırmayan, uzun süreli ve etkili şekilde humoral ve hücresel immun yanıtın uyarılmasını sağlayan enjeksiyon uygulaması kolay adjuvant emülsüyonudur, Montanide ISA 206 VG dahil olmak üzere diğer mineral yağlı adjuvantlardan farkı, içeriğinde zenginleştirilmiş yağ zinciri bulundurması sebebi ile enjeksiyon sonrası Th1 hücrelerini uyararak IgG2 salınımını etkili şekilde tetiklemesidir (Anonim 9).

Alüminyum Hidroksit Jel ($Al(OH)_3$)

Alüminyum tuzu ilk defa difteri toksinleri ile hazırlanan toksoid formda olan aşıda adjuvant olarak 1926 yılında Glenny ve ark. tarafından kullanılmıştır (Glenny ve ark 1926). Günümüze kadar hayvan ve insan aşılarının üretiminde adjuvant olarak sıklıkla Alüminyum Hidroksit veya Alüminyum Fosfat kullanılmıştır (Gupta 1998, Hem ve White 1995). Ancak adjuvant olarak kullanılan Alüminyum tuzu Th2 hücrelerini uyararak humoral bağışıklığın uyarılmasını sağlarken yağlı adjuvantların özellikle Freund's adjuvantın aksine immun sistemde etkin rol oynayan Th1 hücrelerini uyaramamakta ve sitotoksik T hücrelerini aktive edememektedir (Bomford 1980, Comoy ve ark 1997). Bu durumun yanı sıra 70 yılı aşkın süredir insanlara yönelik uygulamalarında çok az vakada ciddi yan etkisine rastlanıldığı bildirilmiştir (Gupta ve ark 1995). Alüminyum tuzları beraber verildikleri antijenlerin enjeksiyon yerinden salınımlarını uzun vadede yapamayarak, yağlı adjuvantların aksine depo etkisi gösterememektedir (Heimlich ve ark 1999, Weissburg ve ark 1995).

Alüminyum tuzları ile yapılan aşı kombinasyonları ile aşılama sonrasında aşı yerinde lokal veya sistemik reaksiyonlara rastlanabilmektedir. Alüminyum tuzlarına bağlı olarak Alzheimer's Diseases gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olabileceği belirtilmektedir (Petrovsky ve Aguılar 2004). Alüminyum tuzunun, intramüsküler enjeksiyonu sonrasında enjeksiyon yerinde nekroz ve granulom oluşturabileceği bildirilmiştir (HogenEsch 2002).

Bu çalışmada; rekombinant PLD enzimi elde edilerek antijenik benzerliğinin doğal PLD enzimi ile karşılaştırılması, rekombinant PLD ve doğal PLD toksinleri 4 farklı adjuvant (Complete Freund's Adjuvant, Montanide ISA 206 VG Montanide ISA 201 VG ve Alüminyum Hidroksit Jel) ile kombine edilerek 8 farklı toksoid aday aşının geliştirilmesi ve aday aşıların etkinliklerinin ülkemizde yaygın olarak kullanılan ticari aşı (Glanvac3^{TM}, Pfizer, Avustralya) ile değerlendirilerek aşı etkinliğinde adjuvant ve antijen etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Bakteriyel Suşlar ve Plazmid

***Corynebacterium pseudotuberculosis* seçiminde kullanılan test**

SÜVF Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür kolleksiyonunda bulunan 60 adet *C. pseudotuberculosis* saha suşu içerisinden, çalışmada kullanılmak üzere PLD aktivitesi en yüksek olan suş Reverse CAMP test ile seçildi.

Reverse CAMP test

Besiyeri

Blood Agar Base	40 gr
Koyun kanı	%5
Distile su	1000 ml

Antijen

PLD enziminin hemolitik titresini belirleyebilmek için steril fizyolojik tuzlu su ile 2'şer katlı (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256) sulandırma yapılarak agar üzerinde açılan kuyucuklara dağıtıldı.

Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

NaCl	9 gr
Distile su	1000 ml'e tamamlandıktan sonra sterilize edildi.

R. equi

Sahadan izole edilen ve PZR ile doğrulaması önceden yapılan SUVF kültür koleksiyonunda bulunan186 nolu şuş kullanıldı.

Çalışmada kullanılan *Corynebacterium pseudotuberculosis* suşu

Çalışmada Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (SÜVF) **323** nolu *C. pseudotuberculosis* suş kullanıldı.

***Escherichia coli* suşları ve plazmid**

Kompetan hücre olarak *E. coli* alt tipi olarak;

I- One Shot®Mach1™-T1^{R} F- Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *hsd*R(rK- mK+) Δ*rec*A1398 *end*A1 *ton*A (Champion™ pET SUMO Protein Expression System-Invitrogen)

II- One Shot®BL21(DE3) F- *ompT hsdS*B (rB-mB-) *gal dcm* (DE3) (Champion™ pET SUMO Protein Expression System-Invitrogen, K300-01) kullanıldı.

Plazmid olarak;

I- pET SUMO Vektör (Invitrogen, K300-01) kullanıldı.

2.1.2. PLD Geni, Open Reading Frame (ORF) Bölgesi ve PLD Proteininin Biyoinformatik Verilere Göre Değerlendirilmesi

National Center for Biotechnology Information (NCBI) verilerine göre *C. pseudotuberculosis*'in PLD geni 1638 bp uzunluğunda olup linear DNA formundadır. Klonlama çalışması için NCBI veri tabanına göre, PLD geninin Open Reading Frame (ORF) bölgesi ve PLD enziminin aminoasit dizilimi belirlendi (Anonim 6) (Şekil 2.1.1).

```
     source          1..1638
                     /organism="Corynebacterium pseudotuberculosis"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:1719"
     gene            55..1137
                     /gene="pld"
     -35_signal      55..60
                     /gene="pld"
     -10_signal      79..84
                     /gene="pld"
     RBS             203..206
                     /gene="pld"
     CDS             214..1137
                     /gene="pld"
                     /EC_number="3.1.4.4"
                     /note="putative"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="phospholipase D"
                     /protein_id="AAA64910.1"
                     /db_xref="GI:289916"
                     /translation="MREKVVLFLSIIMAIMLPVGNAAAAPVVHNPASTANRPVYAIAH
                     RVLTTQGVDDAVAIGANALEIDFTAWGRGWWADHDGIPTSAGATAEEIFKHIADKRKQ
                     GANITFTWLDIKNPDYCRDARSVCSINALRDLARKYLEPAGVRVLYGFYKTVGGPAWK
                     TITADLRDGEAVALSGPAQDVLNDFARSENKILTKQKIADYGYYNINQGFGNCYGTWN
                     RTCDQLRKSSEARDQGKLGKTFGWTIATGQDARVNDLLGKANVDGLIFGFKITHFYRH
                     ADTENSFKAIKRWVDKHSATHHLATVADNPW"

    1 gtcaacagtc agctttctga aaattatatg agttataaac atatgcaata acccttgatt
   61 ttattgttat ttaagtttca taatggggat atagcgcagg gtgttcacgc tggtaaaggg
  121 ctt  tttgg gcacctctcc gtgggaaatg tatccgcaaa ttatagtgcg acatcctttt
  181 gttgctctat ttatcgaaac ttggtgataa aaaatgaggg agaaagttgt tttattctta
  241 tcaataatta tggcgatcat gcttccggta gggaatgcag ctgcagcgcc tgttgtgcat
  301 aacccagctt ctacagcaaa tcggccagtc tatgcgattg cccaccgcgt tttaaccact
  361 caaggcgtgg atgacgcagt tgcgatcggt gcgaatgcgt tagaaattga cttcactgcg
  421 tggggtcgtg gctggtgggc agatcatgat ggtattccta ctagcgcagg tgctactgca
  481 gaggaaattt ttaagcatat agctgataag cgtaagcagg gagcaaatat tactttcacc
  541 tggcttgaca tcaagaatcc agactactgc agggatgctc gtagtgtgtg ctccataaat
  601 gcgttgcgtg atttggcacg taaatatctt gagccggcag gggttcgagt tctctatggg
  661 ttctataaga cagtcggcgg acctgcctgg aagacaatca ccgctgatct tcgggatggc
  721 gaggcggtag ctcttagcgg cccggcgcag gacgtattaa atgattttgc aaggtctgaa
  781 aataagatcc ttactaaaca aaaaatcgct gactatggtt actacaacat taaccaaggg
  841 tttggtaact gctatggaac ctggaatcgg acttgtgatc aactccgtaa gtccagcgaa
  901 gctcgtgacc aaggaaaact cggtaaaact tttgggtgga caatcgctac aggtcaggac
  961 gcgcgagtta atgatctttt aggaaaagcc aacgtagatg gactgatctt tggctttaag
 1021 attactcact tctaccgtca tgcagacacc gaaaattctt tcaaagccat caagaggtgg
 1081 gtggataagc actccgctac tcaccatctg gctaccgtag cggataaccc gtggtgagct
 1141 agcaaataag tagacatttg accgctaggg cctctcagcg taagaggccc tagccctgca
 1201 tcatagcgac gtttggcact ggtaattcgg ttggaatgac tacgagttgg tcgtcgtcga
 1261 taagcatggt gcgaaccgtg atattaaaaa cttcggatat gagttctgcg ctgatcactt
 1321 cctgcgggga accggtagct acgatgctgc cattttcat aacaatcagg tggtcggcgt
 1381 agcgacagcc tgttgtagat cgtgcagtac cgcgacaacg gtgcgattga gctgagttgt
 1441 aagagatcgt gctaactcaa gaagttggta ctggtgggcg atgtctagga aggtggtggg
 1501 ttcgtccaga agtaccgtag gagtattttg ggctagaacc attgcaagcc atacgcgctg
 1561 acgctgtcca ccggataaat cggtcacgcg tttgtgagtg agttctttaa cactggaggc
 1621 attgagagca gcgtcgac
```

Şekil 2.1.1. NCBI Genbank Erişim No: L16587.1 olan *C. pseudotuberculosis'*in PLD geni ile ilgili veriler (Anonim 6).

Ayrıca dPLD peptidinin ABIM (Aix Marseille Universite) programı taraması sonucuna göre moleküler ağırlığı 33884,21 Da (33.8 kDa) olup içerdiği amino asit kompozisyonu belirlendi (Anonim 7) (Çizelge 2.1.1).

Çizelge 2.1.1. dPLD peptidinin amino asit kompozisyonu (Anonim 7).

Amino asit adı	Sayısı	% miktarı
Alanin (A)	40	13,03
Arginin (R)	18	5,86
Asparagin (N)	17	5,54
Aspartik asit (D)	23	7,49
Sistein (C)	4	1,30
Glutamin (Q)	8	2,61
Glutamik asit (E)	9	2,93
Glisin (G)	25	8,14
Histidin (H)	9	2,93
İzolösin (I)	20	6,51
Lösin (L)	20	6,51
Lizin (K)	19	6,19
Metiyonin (M)	3	0,98
Fenilalanin (F)	12	3,91
Prolin (P)	10	3,26
Serin (S)	11	3,58
Treonin (T)	21	6,84
Triptofan (W)	9	2,93
Tirozin (Y)	10	3,26
Valin (V)	19	6,19

2.1.3. Besiyerleri

Corynebacterium pseudotuberculosis besiyeri ortamı

C. pseudoutuberculosis bakterisinin koloni morfolojisini ve dPLD enzim etkinliğini gözlemlemek amacı ile %5 defibrine koyun kanı içeren Blood Agar Base (Merck, 1.10886) ve %5 koyun serumu içeren Brain Heart Infüzyon Broth (Merck, 1.10493) kullanıldı.

Rekombinant koloni besiyeri ortamı

Rekombinant kolonileri geliştirmek için Luria Bertani Agar (LB) (Merck, VM361985) ve rekombinant koloni sayını arttırmak için de plazmid izolasyonu öncesinde Luria Bertani Broth (Merck, 71753) kullanıldı.

RPLD enzimini sıvı besiyeri ortamında fazla miktarda sentezlettirmek maksadıyla TY (tryptone 26.8 gr, maya ekstrakt 21.4 gr, monopotassium fosfat 5.4 gr, di-ammonium hydrogen fosfat 1.6 gr, magnezyum sülfat 1.2 gr, NaCl 8.5 gr, gliserol 10 g) kullanıldı.

2.1.4. Kullanılan Kitler

DNA ekstraksiyon kit

C. pseudotuberculosis'in DNA ekstraksiyonu Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120) ile gerçekleştirildi. Ayrıca DNA ekstraksiyonunda; 50 mM etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), lizozim (10 mg/ml), %70 soğuk etanol kullanıldı.

EDTA (50mM, PH:8)

EDTA	0,93 gr
Distile su	50 ml'ye tamamlandı.

Lizozim (10 mg/ml)

Lizozim	10 mg
Distile su	1000 µl'ye tamamlandı.

Soğuk Etanol %70 (w/v)

Etanol	70 ml
Distile su	100 ml'ye tamamlandı.

Champion™ pET SUMO protein ekpresör sistem kiti

RPLD enzim sentezleme işleminde Champion™ pET SUMO Protein Expression Kit (Invitrogen, K300-01) kullanıldı.

pET SUMO T/A klonlama solüsyonları

pET SUMO vektör

10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0) içerisinde 25 ng/µl miktarında bulunmaktadır.

10X PZR solüsyon

100 mM Tris-HCl, pH 8,3 (at 42°C); 500 mM KCl, 25 mM $MgCl_2$, %0,01 gelatin içermektedir.

dNTP miks

12,5 mM dATP, 12,5 mM dCTP, 12,5 mM dGTP, 12,5 mM dTTP (pH 8,0)'den oluşmaktadır.

10x bağlanma solüsyonu

60 mM Tris-HCl (pH 7,5), 60 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 70 mM β-mercaptoethanol, 1 mM ATP, 20 mM dithiothreitol, 10 mM spermidinden oluşmaktadır.

T4 DNA Ligaz

T4 DNA Ligaz 4,0 Weiss units/µl miktarındadır.

Süper optimal besiyeri

Super optimal besiyeri (SOC) % 2 tryptone, % 0,5 maya extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM glukozdan oluşmaktadır.

SUMO proteaz solüsyonları

SUMO proteaz

SUMO Proteaz (1 U/µl); 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), % 1 Igepal (NP-40), 250 mM NaCl, 500 µM dithiothreitol (DTT), % 50 (v/v) gliserol içermektedir.

10X SUMO proteaz solüsyon+ tuz

500 mM Tris-HCl, pH 8,0, % 2 Igepal (NP-40), 1,5 M NaCl, 10 mM DTT içermektedir.

10X SUMO proteaz solüsyonu– tuz

500 mM Tris-HCl, pH 8,0, % 2 Igepal (NP-40), 10 mM DTT içermektedir.

Jel ekstraksiyon kit

Ligasyon öncesi jelde görüntülenen PLD genine ait DNA bandı GenElute™ Jel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, NA1111) ile temizlendi.

Plazmid ekstraksiyon kit

Dizi analizi öncesi plazmid ekstraksiyonu GenElute™ Plazmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, PLN70) ile yapıldı.

Restriksiyon endonükleaz enzim kiti

PLD geninin ligasyonun doğrulanması amacı ile Ssp I endonükleaz enzimi (Thermo Scientific, ER0771) kullanıldı.

Rekombinant protein saflaştırma kiti

pET SUMO vektör sisteminde bulunan saflaştırma işleminde rol oynayan füzyon protein 6×His tag, Ni-NTA Spin Kit (QIAGEN, 31314) ile rPLD enziminin saflaştırma işlemi yapıldı.

Protein ölçüm kiti

Protein miktar tayini Pierce^{TM} BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23227) ile yapıldı.

2.1.5. Kanamisin stok solüsyonu

Kanamisin pure (AppliChem, A1493) 10 mg

Ultra saf su 1000 µl'ye tamamlandı, 0,22 µm (Merck, Millipore) ile filtre edildikten sonra –20°C'de saklandı.

2.1.6. IPTG (1M) stok solüsyonu

IPTG (AppliChem, A4773 0,238 gr

Ultra saf su 1000 µl'ye tamamlandı ve 0,22 µm (Merck, Millipore) ile filtre edildikten sonra –20°C'de saklandı.

2.1.7. DNA Amplifikasyonu

Taq polimeraz ve PZR karışımı

Taq polimeraz (Fermentas, EP0402) amplifikasyon aşamasında kullanıldı.

10× Taq buffer 750 mM Tris-HCl (pH 8,8, 25°C), 200 mM $(NH4)_2SO_4$, % 1 (v/v) Tween 20 kullanıldı.

Deoksinükleotid trifosfat set

dNTP set (Fermentas, R-0181) ultra saf su ile 2 mM molariteye ayarlandıktan sonra kullanıldı.

Çalışmada kullanılan primerler

Saha suşu olan *C. pseudotuberculosis*' te PLD geninin varlığının doğrulanması, PLD geninin amplifikasyonu ve dizi analizi için kullanılan primerler;

PLD-F 5'-ATA AGC GTA AGC AGG GAG CA-3' (Pacheco ve ark 2007).

PLD-R1 5'-ATC AGC GGT GAT TGT CTT CC-3 (Pacheco ve ark 2007).

CLON-F1 5'- ATGAGGG AGAAAGTTGT TTTATTC-3'

CLON-R1 5'-TCA CCA CGG GTT ATC CGC TAC G -3

PLD CPF-5' G TTC TAT AAG ACA GTC GGC GG 3'

PLD CPR- 5' GT GAT TGT CTT CCA GGC AGG T 3'

SUMO Forward 5´-AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3´

T7 Reverse 5´-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3´

Marker

100 bp DNA ladder (Sigma, P1473), 1 kb DNA ladder (Fermentas, SM0311), 1 kb plus DNA ladder (Fermentas, SM1332), kullanıldı.

2.1.8. Agaroz Jel Elektroforezi

TAE tampon (50×)

Tris base	242 gr
0.5M EDTA (pH 8.0)	100ml
Glacial asetik asit	57.2ml
Distile su	1000 ml'e tamamlandı

Agaroz jel (%1) (w/v)

Agaroz	1,5 gr
TAE	100 ml

Etidyum bromür stok solüsyonu (10 mg/ml)

Etidyum bromür	20 mg
Distile su	1.98 ml

Karanlıkta muhafaza edildi, agaroz jelde son konsantrasyonu 5 µg/ml olacak şekilde ilave edildi.

Yükleme tamponu

Amplifiye edilen DNA' ların boyanması amacı ile 6×yükleme solüsyonu (Fermentas, R0411) kullanıldı.

2.1.9. Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE)

Unstained protein marker

Elektroforez işleminde unstained protein marker (Thermo Scientific, SM0431) kullanıldı.

4×Tris-Cl/SDS (pH: 8,8)

Tris/Cl	91 gr
SDS	2 gr
Distile su	500 ml'e tamamlandı ve 1N HCl ile pH 8.8' e ayarlandı.

4×Tris-Cl/SDS (pH: 6,8)

Tris/Cl	6.05 gr
SDS	0.4 gr
Distile su	100 ml'e tamamlandı ve 1N HCl ile pH 6.8' e ayarlandı.

Amonyum Persülfat (%10)

APS	0.1 gr
Distile su	1 ml

Tris-Glisin Tamponu (5×)

Tris	15 gr
Glisin	94 gr
SDS	5 gr
Distile su	1000 ml

4×SDS Boya Tamponu

Tris/Cl (1 M)	2 ml
SDS	0.8 gr
Gliserol	2 ml
Bromothymol blue	0.04 gr
Distile su	10 ml'e tamamlandı.

Commasie Brilliant Blue boya çözeltisi

Commasie Brilliant Blue	1 gr
Metanol	400 ml
Glasiyel Asetik Asit	100 ml
Distile su	500 ml

Boya giderme çözeltisi

Metanol	400 ml
Glasiyel Asetik Asit	100 ml
Distile su	500 ml

2.1.10. Western Blot

Prestained protein marker

Elektroforez işleminde prestained multicolor ladder (Thermo Scientific, SM 1841) kullanıldı.

Nitroselüloz membran

Transfer işleminde 0,45 µm nitroselüloz membran (BioRad, 162-0167) kullanıldı

Transfer tampon

Tris (25 mM)	3 gr
Glisin (150 mM)	11.3 gr
Metanol (%20)	200 ml

Distile su 1000 ml'e tamamlanarak pH: 8,3'e ayarlandı ve +4ºC saklandı.

Yıkama solüsyonu (10X TBST)

Tris-base (1.0 M)	121.1 gr
NaCl (1.5 M)	87.7 gr

Tween 20 (%1.0)	10 ml

Distile su ile1000 ml'e tamamlarak pH:7,5'e ayarlandı ve +4ºC saklandı

Bloklama solüsyonu (10×TBSTM)

TBST	100 ml
Yağsız Süt Tozu	3 gr

Pozitif serum

ELISA ile en yüksek titre verdiği belirlenen ISA 201 VG+rPLD ve ISA 201 VG+dPLD aşılarıyla aşılı kuzu gruplarına ait serumlar 1/200 oranında sulandırılarak kullanıldı.

Konjugat

Eşekte hazırlanan horseradishperoksidaz ile işaretli anti koyun IgG (tüm molekül) (Sigma-Aldrich, S2763) konjugat 1/400 oranında kullanıldı.

Substrat

Fosfat-sitrat buffer (Phosphate-citrate buffer with sodium perborate capsules, Sigma P4922, USA)'da taze olarak hazırlanan δ- Fenildiamin dihidroklorid (δ-phenylenediamine dihydrochloride tablet Sigma P8287, USA) tablet kullanıldı.

2.1.11. Protein Konsantrasyonu

DPLD ve rPLD enzimlerinin konsantre edilmesi için ultra filtrasyon yöntemine dayalı sistem (Sartorius Stedim, Slice 200) kullanıldı ve besiyeri üst sıvıında bulunan rPLD ve dPLD enzimlerinin konsantrasyonunda sırasıyla 0,45 µm (Hydrosart, 00637123, Sartorius Stedim Slice200) ve 10 kDa (Polyethersulfone,10022213,Sartorius Stedim Slice200) çapında membran kaset sistem kullanıldı (Bkz. EK-B. 7.2).

2.1.12. Adjuvant

Montanide ISA 206 VG (Seppic, Fransa) (ISA 201 VG) ve Montanide ISA 201 VG (Seppic, Fransa) (ISA 206 VG), Complete Freund's Adjuvant (Sigma-

Aldrich, F5881) ve Alüminyum Hidroksit Jel temin edilerek (Vetal A.Ş, Adıyaman) aşı çalışmalarında kullanıldı (Çizelge 2.1.2).

Çizelge 2.1.2. Tezde kullanılan adjuvantların özellikleri.

	Complete Freund's Adjuvant	**Montanide ISA 201 VG**	**Montanide ISA 206 VG**	**Alüminyum Hidroksit ($Al(OH)_3$)**
Yağ/Su oranı	50:50	50:50	50:50	0.85mg/lt
Emülsiyon Tip	W:O	W:O:W	W:O:W	-
Sabitlik 4ºC	>2 yıl	>2 yıl	>2 yıl	>2 yıl
Sabitlik 25ºC	-	1 ay	1 ay	15 ay
Sabitlik 37ºC	-	>1 hafta	>1 hafta	>1 hafta
Uyarım Şekli	Th1, TNF	Th1	Th1	Th2
Etki Süresi	Uzun	Uzun	Uzun	Kısa

2.1.13. Koyun Materyali

Aşı çalışmalarında Akkaraman ırkı 10 aylık 20 adet kuzu kullanıldı. Kuzular, Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden (Konya) temin edildi. Enstitünün koyunculuk tesislerinde uygulama süresince uygun koşullarda 6 hafta boyunca bakım-beslemeye tabi tutuldu (Bkz. Ek-B. 7.7). Koyunculuk tesisisinde yapılan rutin taramalarda sonucunda negatif çıkan ve KLA enfeksiyonundan korunmaya yönelik aşılama yapılmayan kuzular aşı çalışma denemelerinde kullanıldı.

Etik kurul onayı

Sunulan bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü (Proje No: 11102016) tarafından desteklenmiştir. Araştırma projesi 23.03.2011 Tarih ve 2011/035 sayılı karar ile Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul onayı almıştır.

2.1.14. Letal Doz (LD50) Belirleme Denemesi

Çalışmada kullanılan rPLD, dPLD ve canlı *C. pseudotuberculosis*'in LD50 miktarının belirlenmesinde swiss albino ırk ağırlıkları 15-18 gr arasında değişen fareler kullanılarak, rPLD ve dPLD'ninaşı için kullanılacak antijen miktarları ile çelınç denemeleri için kullanılan canlı *C. pseudotuberculosis*'in LD50 değeri belirlendi.

2.1.15. Çalışmada Kullanılan Aşı Formları

Ticari aşı

Aday aşıların etkinliğinin karşılaştırılmasında ticari aşı olarak Glanvac3^{TM} (Pfizer, Avustralya) kullanıldı.

Aday aşı formları

Çalışmada rPLD+CFA, rPLD+ISA 206 VG, rPLD+ISA 201 VG, rPLD+$Al(OH)_3$, dPLD+ CFA, dPLD+ISA 206 VG, dPLD+ISA 201 VG, dPLD+$Al(OH)_3$ aşı kombinasyonları yapıldı (Bkz. Ek 7.6).

2.1.16. Aşı Etkinlik Çalışmaları

Çelınç ve seropotens deneme grupları

Çalışmada aday aşıların ve ticari aşıların etkinliğini belirlemek için her aşı grubunun potens+çelınç denemelerini yapmak için swiss albino ırk ağırlıkları 15-18 gr arasında değişen fareler kullanıldı (Çizelge 2.1.3).

Çizelge 2.1.3. Çelınç ve seropotens denemelerinde kullanılan fare sayısı.

Aşı Grupları	Çelınç Fare Adet	Potens Fare adet
rPLD+ CFA	4	2
rPLD+ ISA 201 VG	4	2
rPLD+ ISA 206 VG	4	2
rPLD+ $Al(OH)_3$	4	2
dPLD+ CFA	4	2
dPLD+ ISA 201 VG	4	2
dPLD+ ISA 206 VG	4	2
dPLD+ $Al(OH)_3$	4	2
Ticari Aşı	4	2
Kontrol Grubu	4	0

Kullanılan antijenler; dPLD (doğal PLD) ve rPLD (rekombinant PLD),adjuvanlar; CFA (Complete Freund's Adjuvant), ISA 201 VG (Montanide ISA 201 VG), ISA 206 VG (Montanide ISA 206 VG), $Al(OH)_3$ (Alüminyum Hidroksit Jel), Ticari Aşı (Glanvac3^{TM}).

Kuzu Deneme Grupları

Çalışmada oluşturulan 8 farklı aday aşının ve ticari aşının serolojik testler denemesi için 20 adet kuzu kullanıldı (Çizelge 2.1.4).

Çizelge 2.1.4. Çalışmada kullanılan aşı grupları ve gruplardaki kuzu sayısı.

Aşı Grupları	Kuzu Adet
rPLD+ CFA	2
rPLD+ ISA 201 VG	2
rPLD+ ISA 206 VG	2
rPLD+ $Al(OH)_3$	2
dPLD+ CFA	2
dPLD+ ISA 201 VG	2
dPLD+ ISA 206 VG	2
dPLD+ $Al(OH)_3$	2
Ticari Aşı	2
Kontrol Grubu	2

Kullanılan antijenler; dPLD (doğal PLD) ve rPLD (rekombinant PLD),adjuvanlar; CFA (Complete Freund's Adjuvant), ISA 201 VG (Montanide ISA 201 VG), ISA 206 VG (Montanide ISA 206 VG), $Al(OH)_3$ (Alüminyum Hidroksit Jel), Ticari Aşı (Glanvac3^{TM}).

2.1.17. Kullanılan Serolojik Testler

Hemolitik ünite ölçüm testi

Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

NaCl	9 gr
Distile su	1000 ml'e tamamlandıktan sonra sterilize edildi.

Eritrosit solüsyonu

rPLD ve dPLD enzimlerinin oluşturduğu hemolizi gözlemleyebilmek için lityum heparin içeren steril kan tüplerine alınan steril FTS ile yıkanan ve son konsantrasyonu FTS ile %2 olacak şekilde sulandırılan koyun eritrositi kullanıldı.

Test antijeni

Konsantre edilen dPLD (23,6 mg/ml) ve rPLD'nin (22,6 mg/ml) antijenler kullanılarak hemoliz ünite ölçüm testi yapıldı ve test antijenlerinin hemolitik ünitesi (HU) belirlendi.

Hemoliz inhibisyon test

Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

NaCl	9 gr
Distile su	1000 ml'e tamamlandıktan sonra sterilize edildi.

Eritrosit solüsyonu

rPLD ve dPLD enzimlerinin oluşturduğu hemolizi gözlemleyebilmek için lityum heparin içeren steril kan tüplerine alınan koyun kanı kullanıldı. Steril FTS ile yıkanarak son konsantrasyonu %2 olacak şekilde steril FTS ile sulandırılan koyun eritrositi kullanıldı.

Test serumu

rPLD ve dPLD ile oluşturulan 8 farklı aşı, ticari aşı ve kontrol grubuna ait kuzu serumları kullanıldı.

Test antijeni

Hemolitik titre tayini ile rPLD'nin HU'si 5.65 mg/ml ve dPLD'nin HU'si için 5.9 mg/ml belirlenen antijenler kullanıldı.

Agar serum nötralizasyon test

Çalışmada kullanılan 8 adet aday aşı ve ticari aşıyla aşılanan seropotens ve çelınç grubu fare serumları ve kuzu gruplarına ait serumlar reverse CAMP test ile agar jel immünodifüzyon test tekniğinden yararlanılarak agar serum nötralizasyon testi geliştirilerek her bir grubun antikor varlığını tespit edebilmek amacı ile kullanıldı.

Besiyeri

Blood Agar Base	40 gr
Koyun kanı	%5
Distile su	1000 ml

Serum

Çalışmada kombine edilen 8 farklı aday aşı ve ticari aşı aşılanan kuzu serumları ile seropotens ve çelınç grubuna ait fare serumları kullanıldı.

Antijen

Konsantre edilen dPLD (23,6 mg/ml) ve rPLD'nin (22,6 mg/ml) antijenleri kullanıldı.

R. equi

Sahadan izole edilen ve PZR ile doğrulaması önceden yapılan SUVF kültür koleksiyonunda bulunan 186 nolu şuş kullanıldı.

ELISA

Kaplama antijeni

ELISA testinde kullanılacak pleytlerin kaplanmasında dPLD ve rPLD enzimleri kullanıldı.

Antijen kaplama tamponu

Karbonat-bikarbonat tamponu, pH: 9,6

0,2 M $NaCO_3$	16 ml
0,2 M $NaHCO_3$	34 ml

PBS

NaCl	8,5 gr
K_2HPO_4	1,121 gr
KH_2PO_4	0,34 gr
Distile su	1000 ml

Yıkama solüsyonu (%0,05 PBS-T w/v)

Tween 20	0,5 ml
PBS	1000 ml

Bloklama solüsyonu (%1 BSA w/v)

BSA (Sigma A21153)	1 gr
PBS	100 ml

Test serumu

rPLD ve dPLD ile oluşturulan 8 farklı aşı, ticari aşı ve kontrol grubuna ait kuzu serumları kullanıldı.

Konjugat

Eşekte hazırlanan horseradish peroksidaz ile işaretli anti koyun Ig G (whole molekül) (Sigma-Aldrich S2763) konjugat 1/400 oranında kullanıldı.

Substrat

Fosfat-sitrat buffer (Phosphate-citrate buffer with sodium perborate capsules, Sigma P4922, USA)'da taze olarak hazırlanan δ- Fenildiamin dihidroklorid (δ-phenylenediamine dihydrochloride tablet Sigma P8287, USA) tablet kullanıldı.

Enzim stop solüsyonu (0.5 M H_2SO_4)

H_2SO_4	4,9 ml
Distile su	45,1 ml'e tamamlanarak hazırlandı.

2.2. Yöntem

2.2.1. *Corynebacterium pseudotuberculosis* Kültür Gelişimi ve PLD Enzimine Göre Suş Seçimi

Sahadan izole edilen ve enfeksiyona neden olan SÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bakteri koleksiyonunda bulunan 60 adet *C.pseudotuberculosis* suş içerisinden en etkili dPLD enzimi sentezleyen suş çalışmada kullanıldı. Bunun için öncelikle 60 adet suş %5-10 oranında koyun kanı içeren agara (Merck, 113414) ekilerek 37 °C'de 48 saat %10 CO_2'li etüvde inkübe edildikten sonra koloni oluşumu ve morfolojisi yönünden gözlemlendi (Mohan ve ark 2008). PLD enziminin sentezlenmesini ve etkisini gözlemleyebilmek amacıyla Reverse CAMP testi kullanıldı. Testte %5-10 koyun kanı içeren agara *S. aureus* ve *R. equi* suşları ile *C.pseudotuberculosis* suşunun ekimi yapıldı ve agar 37°C' de 48 saat %10 CO_2'lik etüvde inkübe edildi. Etkili PLD sentezleyen *C. pseudotuberculosis* suşları seçildi (Şekil 2.2.1), (Şekil 2.2.2), (Şekil 2.2.3), (Şekil 2.2.4).



Şekil 2.2.1. *S. aureus*.



Şekil 2.2.2. *R.equi*.



Şekil 2.2.3. *C. pseudotuberculosis*.



Şekil 2.2.4. Reverse CAMP test.

Çalışmada rPLD enziminin üretimi ve rPLD'nin aşı kombinasyonlarında kullanılması amaçlandığı için en etkili ve yüksek titrede PLD enzimini sentezleyen suşun belirlenmesi çalışmanın güvenilirliliği açısından önemli bir husustur. Bunun için etkili PLD enzimi sentezlediği belirlenen *C. pseudotuberculosis* suşlarının PLD aktivitelerini ve titrelerini belirleyebilmek amacı ile bu suşlar %5 koyun serumu içeren BHI sıvı besiyerinde 37 °C'de 48 saat %10 CO_2'li etüvde inkübe edildi ve besiyeri üst sıvıları 9000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek toplandı ve Reverse CAMP testi yapıldı. Bunun için her bir suşun üst sıvısı 2'şer katlı (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/) olacak şekilde steril FTS ile sulandırıldı. Deneme sayısına göre %5 koyun kanı içeren agarlara çukur açılarak çukurların dipleri agarla doldurulduu. Agarın orta hattına *R. equi* suşu çekildi ve çukurlara suşlara ait PLD sulandırmalarında 100'er µl koyuldu ve 37°C' de 48 saat %10 CO_2'lik etüvde inkübe edildikten sonra en etkili ve yüksek titrede PLD enzimi sentezleyen *C. pseudotuberculosis* suşu seçilerek tez çalışmasında kullanıldı.

2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

C. pseudotuberculosis'in genomik DNA izolasyonu

C. pseudotuberculosis'in üreyen kolonilerinden 5 ml Brain Hearth sıvı besiyerine (BHI) tek koloni ekimi yapıldı ve 48 saat 37ºC'de inkübe edildi.

C. pseudotuberculosis'in DNA ekstraksiyonu ticari olarak temin edilen kit (Wizard® Genomic DNA Pürification Kit, Promega) ile yapıldı. 1.5 ml'lik ependorf tüpüne BHI'da üreyen kültürden 1 ml alındı. 16.000 g×2 dk santrifüj edilerek üst sıvısı uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 50 mM EDTA'dan 480 µl ve 60 µl lizozim (10

mg/ml) ilave edilerek 37ºC'de 60 dk inkübe edildi ve 16.000 g×2 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı uzaklaştırıldı. 600 µl Nükleik lizis solüsyonundan ilave edilip pipetlendikten sonra 80 ºC'de 5 dk inkübe edildi. Üzerine 3 µl RNase A eklenerek karıştırıldı ve 37ºC'de 45 dk bekletildi. Daha sonra 200 µl protein precipitation solüsyonu ilave edildikten sonra kırık buz üzerinde 5 dk bekletildi ve 16.000 g×3 dk santrifüj edilerek üst sıvı kısmı 1.5 ml'lik başka bir ependorfa aktarıldı. Üst sıvının üzerine 600 µl isopropanol alkol ilave edilerek DNA iplikçikleri göz ile görünür hale gelinceye kadar yavaşca alt üst edildi. Görünür hale gelen iplikçikler içerisinde 600 µl %70 soğuk etanol bulunan başka bir 1.5 ml'lik ependorfa aktarıldı ve alt üst edildi. 16.000 g×2 dk santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. Ependorf tüpü kapağı açık şekilde 15 dk oda ısısında bekletildi. Tüpün dibindeki DNA peleti üzerine DNA rehidration solüsyonundan 100 µl koyulduktan sonra 65ºC'de 60 dk bekletildi. DNA, PZR analizinde kullanılıncaya kadar -20ºC'de muhafaza edildi.

Ekstraksiyonu yapılan DNA'ların absorbans tayini

Ekstraksiyonu yapılan DNA örneklerinin saflık ve miktar tayinlerini hesaplamak için 260 nm ve 280 nm dalga boylarında optik dansiteleri (OD) spektrofotometre (Nanodrop2000, Thermo Scientific) kullanılarak ölçüldü. DNA rehidratation solüsyonu boş olarak kullanıldı. DNA ekstraksiyonundan 1 µl DNA örneği 260 nm (OD260) ve 280 nm (OD280) dalga boylarında ölçümleri yapıldı. DNA örneklerinin konsantrasyonları ng/ml cinsinden değerleri elde edildi.

OD260 ve OD280 değerlerine göre hesaplama sonucuna göre 1,8-2,0 arasında bulunan değerlere göre kaliteli, kullanılabilir 100 ng/µl DNA içeren izolasyonlar PZR'da kullanıldı.

C*orynebacterium pseudotuberculosis PLD* gen varlığının doğrulaması

Saha suşu olan *C. pseudotuberculosis*'te PLD gen varlığının doğrulanması için ileri primer PLD-F 5'-ATA AGC GTA AGC AGG GAG CA-3' geri primer PLD-R1 5'-ATC AGC GGT GAT TGT CTT CC-3 kullanıldı (Luis ve ark 2007).

Amplifikasyon 25 µl PZR tamponu içerisinde gerçekleştirildi. PZR tamponu; 2,5 µl 10×PZR tampon (KCl'lü), 2,5 µl $MgCl_2$ (25 mM), 1 µl dNTP set (2 mM), her

bir primer 1 µl (10 pmol), 0,2 µl Taq DNA polimeraz (5U/ µl), 14,9 µl steril ultra saf su ve 2,5 µl DNA (100 ng/ µl) içerdi. Hedef DNA, PZR-*termal cycler* cihazında (Ependorf, Matercycler *gradient* 5331 000.010, Germany) 95ºC'de 3 dk ön denatürasyon, 39 siklus 95ºC'de 1 dk, 58ºC'de 40 saniye, 68ºC'de 90 saniye ve 68ºC'de 7 dk son zincir uzamasıyla çoğaltıldı. Agaroz jelde görüntülemek amacı ile 6×yükleme boyasından 1 µl ile 5 µl DNA boyandı, 5 µg/ml etidyum bromid içeren %1,5 agaroz jele yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutuldu. Marker olarak 1000 bp DNA ladder kullanıldı. DNA örneği 203 bp büyüklüğünde bant vererek *C. pseudotuberculosis*'te PLD gen varlığı doğrulandı (Pacheco ve ark 2007).

PLD geninin PZR ile çoğaltılması

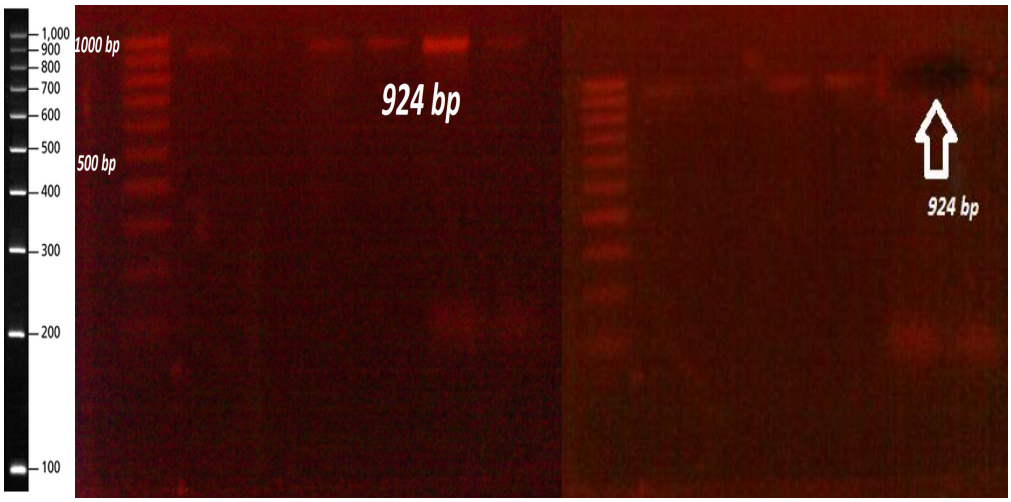
Saha suşu olan *C. pseudotuberculosis*'in PLD geninin ORF kısmının amplifikasyonu için CLON-F1 5'- ATGAGGG AGAAAGTTGT TTTATTC-3' CLON-R1 5'-TCA CCA CGG GTT ATC CGC TAC G -3 primerleri kullanıldı

Amplifikasyon 50 µl PZR tamponu içerisinde gerçekleştirildi. PZR tamponu; 5 µl 10×PZR tampon (KCl'lü), 3 µl $MgCl_2$ (25 mM), 5 µl dNTP set (2 mM), her bir primer 2 µl (10 pmol), 0,4 µl Taq DNA polimeraz (5U/ µl), 27,6 µl steril ultra saf su ve 5 µl DNA (100 ng/ µl) içerdi. Hedef DNA, PZR-*termal cycler* cihazında (Ependorf, Matercycler *gradient* 5331 000.010, Germany) 95ºC'de 3 dk ön denatürasyon, 39 siklus 95ºC'de 1 dk, 58ºC'de 40 saniye, 68ºC'de 90 saniye ve 68ºC'de 7 dk son zincir uzamasıyla çoğaltıldı. Agaroz jelde görüntülemek amacı ile 6×yükleme boyasından 1 µl ile 5 µl DNA boyandı, 5 µg/ml etidyum bromid içeren %1,5 agaroz jele yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutuldu. Marker olarak 1000 bp DNA ladder kullanıldı. DNA örneği 924 bp büyüklüğünde bant vererek *C. pseudotuberculosis*'te PLD geninin ORF bölgesinin çoğaltıldığı doğrulandı

2.2.3. PZR ürününün jel arındırma kiti ile arındırılması

PLD genine özel dizayn edilen CLON-F1 ve CLON-R1 primerleri ile çoğaltılan sonrasında elde edilen PZR ürünü elektroforez işlemi ile ayrıştırıldıktan sonra görüntülenen bant, UV altında bistüri ile agaroz jelden kesilerek 1.5 ml'lik DNase-RNase free mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı (Şekil 2.2.5).

Ependorf tüpünde bulunan 100 mg jel üzerine jel eritici solüsyondan 300 µl ilave edilerek 60ºC'de 10 dk termal blokta (VWR, DH, USA) jel erinceye kadar bekletildi. GenElute Binding Kolon G içerisine aktarıldı ve üzerine 100 µl %100'lük isopropanol alkol ilave edilerek 16.000 g×1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildikten sonra 700 µl yıkama solüsyonu kolona ilave edilerek 16.000 g×1 dk santrifüj yapıldı. DNA eldesi için son aşamada 100 µl DNA Sulandırma Solüsyonu kolona ilave edilerek 16.000 g×1 dk santrifüj edildi. Tüpün dip kısmında biriken DNA, klonlama aşamasında kullanılıncaya kadar -20ºC'de muhafaza edildi.



Şekil 2.2.5. Jel pürifikasyon esnasında agaroz jelden bant kesimi.

2.2.4. Vektöre Klonlama Protokol

Klonlama işleminde pET SUMO vektör sistemi (Invitrogen) kullanıldı. Reaksiyon için DNA bağlama kapasitesi düşük 0.5 ml'lik tüpler kullanıldı. Klonlamanın sağlıklı gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacıyla kit içindeki kontrol klonlama DNA'sı ile reaksiyon tekrarlandı. Klonlama esnasında kullanılacak pET SUMO vektörü, kontrol klonlama DNA'sı ve klonlama çözeltisi santrifüj edildi. Gen fragmanının plazmid vektöre transferi yapıldı (Çizelge 2.2.1). Karışım, pipetle karıştırılarak klonlamanın gerçekleşmesi için 15 ^{o}C'de 4 saat bekletildi. Klonlama ürünü kullanılacağı zamana kadar -20^{o}C'de saklandı.

Çizelge 2.2.1. Klonlama işleminde kullanılan materyal ve miktarları.

PZR ürünü (10 ng/µl)	2µl
pET SUMO vektör (25 ng/µl)	2 µl
10X Ligasyon Solüsyonu	1 µl
T4 DNA Ligaz (4.0 unite)	1 µl
Steril ultra saf su	4 µl
Toplam volüm	10 µl

2.2.5. Transformasyon Protokol

Klonlama reaksiyonu icin 2 adet 50 µg/ml kanamisin içeren LB agar besiyeri hazırlandı. One Shot®Mach1™-T1^R (Invitrogen) taşıyıcı bakteri -80^{o}C 'den çıkarılarak kırık buza koyuldu ve 5 dk hücrelerin çözünmesi beklendi ve üzerine 50-100 ng plazmid DNA olacak şekilde 2 µl ligasyon reaksiyonundan eklendi. Kompetan bakteriye zarar vermeyecek şekilde tüpün içindekilerin karışması sağlandıktan sonra 20 dk buzda inkübasyona bırakıldı. Hücreler 42^{o}C 'ye ayarlanmış su banyosunda (Memmert, WNB14, Germany) 45 saniye çalkalamadan tutularak ısı şokuna tabi tutulduktan sonra tekrar 2 dakika kırık buzda bekletildi. Bu sürenin bitiminde, önceden 37^{o}C'ye ılıtılmış olan S.O.C. medyumdan 250 µl eklendi. 1.5 saat 37^{o}C 'de 200 rpm inkübe edildi. Bu sürenin sonunda transformasyon kültürünün 100 µl 'si 50 µg/ml kanamisin içeren besiyerine ekimi yapıldı. Artan transformasyon kültürü 3000 rpm 'de 5 dk santrifüj edildikten sonra 100µl LB besiyerinde çözülmek suretiyle tekrar ekildi ve 37^{o}C 'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

2.2.6. Rekombinant Plazmid Taşıyan Kolonilerin Tespiti

Transformasyon işlemi gerçekleştirilen ve besiyeri yüzeyinde gelişen kolonilerden rastgele seçim yapılarak numaralandırıldı. Doğrulama amacı ile LB sıvı besiyeri bulunan steril ependorflar içerisine numaralı kolonilerden tek tek öze ile aktarım yapıldı.

2.2.7. Rekombinant Kolonilerden Plazmid İzolasyonu

Rastgele seçilen kolonilerden, plazmid izolasyon verimini arttırmak amacı ile tek koloni 50 µg/ml kanamisin içeren LB besiyerinde 1 gece inkübe edildi. 12.000 g×3 dk santrifüj edildikten sonra pelet işleme tabi tutuldu. Pelete 200 µl tekrar sulandırma solüsyonundan ilave edilip pipete edildikten sonra, üzerine 200 µl lizis

solüsyon eklendi ve alt üst edildi. Tüpe 350 µl nötralizasyon/ bağlanma solüsyon ilave edilip alt üst edildikten sonra 12.000 g× 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen üst sıvı, kolon hazırlama solüsyonu ile hazırlanan kolon içerisine aktarıldıktan sonra 12.000 g× 1 dk santrifüj edildi ve tercihen kullanılacak olan yıkama solüsyonundan 500 µl ilave edilip 12.000 g× 1 dk santrifüj edildi ve kolona yıkama solüsyonundan 750 µl eklendi ve 12.000 g× 1 dk santrifüj edildi. Son aşamada yeni toplama tüpüne alınan kolona sulandırma solüsyonundan 100 µl ilave edilip 14.000 g× 1 dk santrifüj edildi ve toplama tüpünün dip kısmında bulunan lizat sonra kullanılmak üzere -20ºC'ye kaldırıldı.

2.2.8. Klonlama İşlemi Yapılan Plazmidlerin Doğrulanması

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile doğrulanması

Pozitif klonlardaki rekombinant plazmidlerde klonlanacak DNA fragmentinin varlığını tespit etmek için PZR yapıldı. Amplifikasyon 50 µl PZR tamponu içerisinde gerçekleştirildi. PZR tamponu; 5 µl 10×PZR tampon (KCl'lü), 3 µl $MgCl_2$ (25 mM),5 µl dNTP set (2 mM), her bir primer 2 µl (10 pmol), 0,4 µl Taq DNA polimeraz (5U/ µl), 27,6 µl steril ultra saf su ve 5 µl DNA (10 ng/ µl) içerdi. Hedef DNA, PZR-termal cycler cihazında (Ependorf, Matercycler *gradient* 5331 000.010, Germany) 95ºC'de 3 dk ön denatürasyon, 39 siklus 95ºC'de 1 dk, 58ºC'de 40 saniye, 68ºC'de 90 saniye ve 68ºC'de 7 dk son zincir uzamasıyla çoğaltıldı. Agaroz jelde görüntülemek amacı ile 6×yükleme boyasından 1 µl ile 5 µl DNA boyandı, 5 µg/ml etidyum bromid içeren %1,5 agaroz jele yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutuldu. Marker olarak 1000 bp DNA ladder kullanıldı. 924 bp büyüklüğünde bant veren DNA örneği PLD geninin vektöre ligasyonu yönünden pozitif değerlendirildi.

Restriksiyon endonükleaz enzimi ile doğrulanması

İzolasyonu yapılan plazmidlere PLD geninin yerleştiğini doğrulamak amacı ile restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim işlemi uygulandı. Reaksiyon koşulları sağlandıktan sonra 37ºC'de 20 dk inkübe edildi (Çizelge 2.2.2).

Çizelge 2.2.2. Ssp I enzimi ile kesim işlemi.

10× Hızlı kesim solüsyonu	2 µl
Plazmid DNA (1 µg)	2 µl
Ssp I enzim	1 µl
Ultra saf su	15 µl
Toplam miktar	20 µl

Dizi analizi ile doğrulanması ve verilerin bioinformatik yöntemler ile analizi

Plazmid izolasyonunun ardından klonlamanın doğrulanması için dizi analizi BM Metabion A.Ş'ye (Ankara) yaptırıldı.

Dizi analizi sonucunda elde edilen grafiksel sonuç Tracy 0.9 Beta programı vasıtasıyla geni oluşturan baz dizilimi şekline dönüştürüldü. Dizi analizi sonucu çıkan veriler NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/L16587.1) gen bankası *C. pseudotuberculosis* verileri ile karşılaştırıldı. Dizi analizi ile çıkan baz diziliminin aminoasit şekline dönüştürülmesi işlemi sonucu erişim numarası L16587.1 olan *C. pseudotuberculosis*'in sentezlediği PLD enziminin protein dizilimi ile karşılaştırmak için, rPLD enzim protein dizilimi EMBOSS Transeq (http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq) programı ve ExPasy Translate Tool (http://web.expasy.org/translate/) kullanılarak belirlendi. Protein dizilim baz dizilimi karşılaştırması EMBL-EBI Clustal W2 Çoklu Sekans Hizalama ve LALIGN EMBL-EBI (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2) ile yapıldı.

2.2.9. Rekombinant Proteinin Ekspresyonu, Analizi ve Saflaştırılması

Rekombinant koloniden protein ekspresyon denemesi

Plazmid izolasyonu sonrasında PLD geninin doğru şekilde yerleştiği doğrulanan plazmid, PLD enzimini sentezlettirmek amacı ile tekrar One Shot®BL21(DE3) (Invitrogen) taşıyıcı bakteriye aktarımı edildi. Transformasyon, One Shot®Mach1™-T1^{R} uygulanan transformasyon protokolüne uygun olarak yapıldı.

Rekombinant plazmid, ekspresyon amacıyla One Shot®BL21(DE3) hücrelerine transforme edildi. İçerisinde 50 µg/ml kanamisin bulunan LB besiyerine tek koloniden ekim yapılarak 16 saat 37ºC'de inkübasyona bırakılmak suretiyle ön kültür hazırlandı. Hazırlanan ön kültürün 10 ml'si son konsantrasyonda 50 µg/mL

kanamisin içeren 100 ml TY besiyerinde inokule edilerek 37ºC'de inkübasyona bırakıldı. Bakteri kültürü OD550 = 0.6-0.8'e ulaştığında son konsantrasyonu 0.1 mM Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) olacak şekilde ayarlandı ve 30ºC sıcak su banyosunda 4 saat inkübe edildi. RPLD sentezinin yapıldığını doğrulamak amacı ile negatif kontrol oluşturuldu. Bunun için içerisinde 50 µg/ml kanamisin bulunan LB besiyerine tek koloniden ekim yapılarak 16 saat 37ºC'de inkübasyona bırakılmak suretiyle ön kültür hazırlandı. Hazırlanan ön kültürün 10 ml'si son konsantrasyonda 50 µg/mL kanamisin içeren 100 ml TY besiyerinde inokule edilerek 37ºC'de inkübasyona bırakıldı. Bakteri kültürü OD550 = 0.6-0.8'e ulaştığında IPTG ilave edilmeden 30ºC sıcak su banyosunda 4 saat inkübe edildi. RPLD sentezlenmesinin kontrolü için sonuçlar SDS-PAGE ile karşılaştırıldı.

Çözünmeyen/çözünebilir protein düzeyinin belirlenmesi

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Gel Elektroforez (SDS-PAGE)

Ekspresyon sonucunda elde edilen protein ekstraktlarını moleküler ağırlıklarına göre ayırmada Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Gel Elektroforez (SDS-PAGE) kullanıldı. Öncelikle, %12'lik ayırma jelini oluşturan çözeltiler Çizelge 2.2.3'deki gibi karıştırıldı. APS eklendikten sonra karışım, cam plağın üst kısmından 1,5 cm uzaklık olacak şekilde cam plakalar arasından döküldü. Jelin yüzeyini düzgünleştirmek için 0.3 ml saf su ile doyurulmuş n-butanol kaset kenarından jelin yüzeyine sıkıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra yüzeydeki n-butanol döküldü ve distile su ile yıkandı. Diğer bir erlende % 5'lik yığma (yükleme) jeli Çizelge 2.2.4'de belirtildiği gibi hazırlandı. Yine APS hariç tüm malzeme manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. APS'de eklenerek polimerize haldeki ayırma jelinin üzerine döküldü ve jelde kuyular oluşturmak için tarak yerleştirildi. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra tarak çıkarıldı ve elektroforez tankına (Thermo Scientific, EC120 Mini Vertikal Jel Sistem) yerleştirilerek Tris- Glisin Tamponu ile dolduruldu. 4× SDS Yükleme Tamponu ve 1 M DTT ile beraber numuneler Çizelge 2.2.5'de belirtildiği gibi hazırlandıktan sonra 70°C' de 10 dk su banyosunda bekletildikten ve her numuneden 25 µl olacak şekilde kuyulara yüklendi. Akım, proteinler % 5'lik yığma jelinde ilerlerken 90 volta, % 12'lik ayırma jeline ulaştıktan sonra 150 volta ayarlandı. Numune ayırma jel çizgisine geldikten 2.5 saat sonra elektroforez işlemine son verildi (Bkz. EK-B. 7.1).

Çizelge 2.2.3. Ayırma jelinin hazırlanması.

Akrilamid/Bisakrilamid	3.3 ml
1.5 M Tris-Cl	2.5 ml
% 20 SDS	50 µl
% 20 APS	50 µl
TEMED	4 µl
Distile Su	4.1 ml

Çizelge 2.2.4. Yükleme jelinin hazırlanması.

Akrilamid/Bisakrilamid	850 µl
1 M Tris-Cl	625 µl
% 20 SDS	25 µl
% 20 APS	25 µl
TEMED	5 µl
Distile Su	3.45 ml

Çizelge 2.2.5. Yükleme öncesi proteinlerin hazırlanması.

4× SDS Yükleme Tamponu	6 µl
Numune	18 µl
1 M DTT	2.5 µl
Toplam	1 µl

İşlem bitiminde düzenek açıldı ve cam plaklar birbirinden ayrıldı. %5'lik yığma jeli uzaklaştırıldı. Ayırma jeli, bir kesikle işaretlendi ve Commasie Brilliant Blue Boya Çözeltisi içine alındı. Protein bantları net bir şekilde görünene kadar çalkalayarak boyandı. Daha sonra boya giderme çözeltisi alınarak hafifçe karıştırılarak boya fazlası alındı ve bantlar görünür hale getirildi. Çözünebilir protein sentezinin üretilebilmesi için uygun koşullar belirlendi.

Western Blot

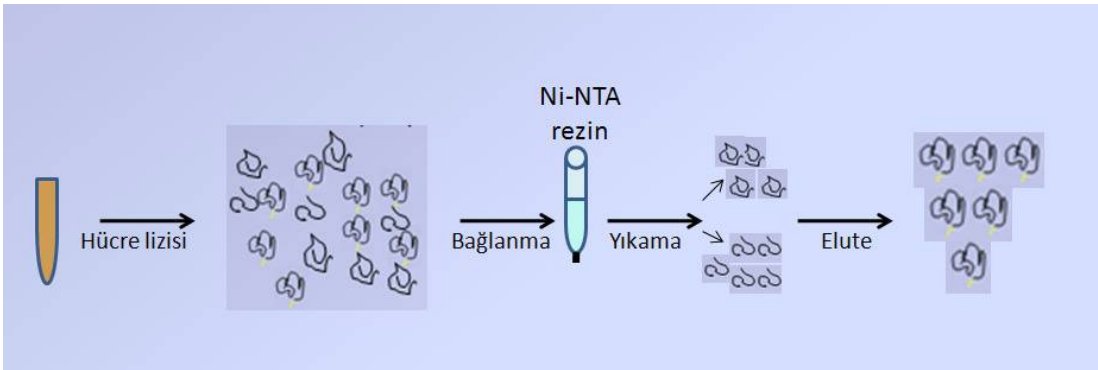
SDS-PAGE işlemi için iki ayrı jel hazırlandı ve aynı sırada numuneler yüklenip elektroforez işlemi gerçekleştirildikten sonra durduruldu ve jellerden birisi boyandı diğeri ile blotlama işlemine geçildi. Jel ile aynı boyutta iki adet kurutma kağıdı transfer tamponu ile ıslatılarak kaset üzerine yerleştirildi. Jel ile aynı boyutta

kesilen nitroselüloz membran, distile suda 5 dk bekletildikten sonra transfer tamponu ile ıslatıldı ve transfer tamponu ile ıslatılmış kurutma kağıtlarının üzerine yerleştirildi. Jel, nitroselüloz membranın üzerine yerleştirildi. Son olarak bir cam tüp üzerinde yuvarlanarak, katmanların arasındaki hava kabarcıkları giderildi. Jel akım yönüne göre katot tarafında olacak şekilde kaset aktarım tankı (Thermo Scientific, Owl™ VEP-2 Mini Tank Elektroblotting Sistem) içerisindeki bölmeye yerleştirildi ve 30 mA'de 1 saat aktarım işlemi sonrasında cihaz durduldu. Nitrosellüloz membran karıştırıcı üzerinde, 30 ml bloklama solüsyonu içerisinde bir gece +4 °C'de inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile 3 kere 5 dk süre ile membran yıkandı. 1/ 400 oranında yıkama solüsyonu ile sulandırılan anti-PLD IgG ile nitroselüloz membran oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildikten sonra membran yıkama solüsyonu çalkalayıcıda 5 dk boyunca 3 kez yıkandı. horseradish peroksidaz ile işaretli anti koyun Ig G (whole molekül) (Sigma-Aldrich S2763) yıkama solüsyonu ile 1/ 6000 oranında sulandırıldıktan sonra nitroselüloz membran ile oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra yıkama solüsyonu çalkalayıcıda 5 dk boyunca 3 kez yıkandı. Fosfat-sitrat buffer (Phosphate-citrate buffer with sodium perborate capsules, Sigma P4922, USA)'da taze olarak hazırlanan δ- fenildiamin dihidroklorid (δ- phenylenediamine dihydrochloride tablet Sigma P8287, USA) tablet kullanıldı. 15 dk sonra nitroselüloz membranda beliren bantlar beyaz ışık üzerinde görüntülendi.

Rekombinant PLD enzim saflaştırılması

Ni-NTA kolon ile protein saflaştırılması

Rekombinant protein harici farklı proteinleri de içerdiği için, His-Tag içeren rekombinant proteinlerin saflaştırılması Ni-NTA rezin ile gerçekleştirildi (Şekil 2.2.6).



Şekil 2.2.6. Ni-NTA'dan rekombinant proteinlerin saflaştırılma işlemi.

Yıkama 10 mM imidazol ve 200 mM imidazol içeren iki farklı yıkama tamponu ile yapıldı. 10 mM imidazol içeren tampon ile özel olmayan bağlanma gösteren farklı proteinler rezin kolondan ayrıştırılırken, 200 mM imidazol içeren yıkama tamponu ile rPLD saf elde edildi. RPLD enzimi 6× His tag ile beraber, kompetan bakteri tarafından sentezlenen diğer proteinlerden Ni-NTA kolon sistemi ile pürifikasyonu yapılarak saf olarak elde edildi.

SUMO proteaz enzim ile kesim

pET SUMO vektör sisteminde bulunan SUMO (Small Ubiquitin-like modifier) rekombinant protein ile beraber sentezlenmektedir. SUMO protein sentezlenen rekombinant proteinin nüklear transportunda görev alması bakımından önemlidir. Ni-NTA ile saflaştırılma işleminden sonra SUMO Proteaz ile kesim işleminde kullanılan materyaller ve miktarları Çizelge 2.2.6'da belirtildiği gibi hazırlanarak 30ºC'de 4 saat inkübe edildi. SUMO Proteaz ile kesim işlemi sonrasında Pierce™ BCA Protein Assay Kit ile ölçüm sonrasında protein miktarı 30 µg/ml olarak belirlendi.

Çizelge 2.2.6. SUMO proteaz ile kesme işlemi.

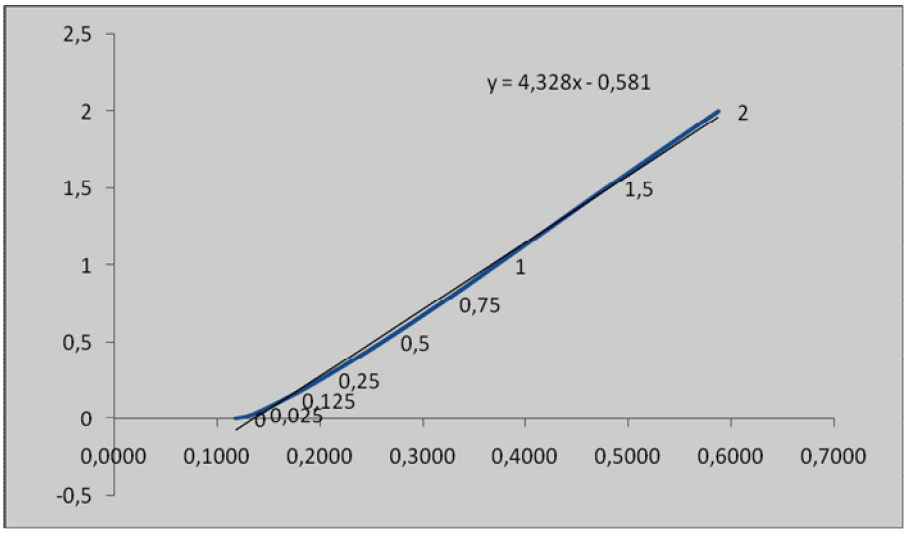
Rekombinant PLD protein	20 µg
10× SUMO proteaz solüsyon (ilave tuzlu)	20 µl
SUMO Proteaz (10 unite)	10 µl
Ultra saf su	150 µl
Toplam miktar	200 µl

2.2.10. RPLD ve DPLD Enzim Konsantrasyonu

En etkili ve yüksek titrede PLD sentezlediği Reverse CAMP test ile belirlenen *C. pseudotuberculosis* suşu %5 koyun serumu içeren BHI sıvı besiyerinde 37ºC'de 2 gün inkübe edildi ve konsantrasyon işlemi öncesinde geliştirilen kültürün üst sıvısını elde etmek için 9000 rpm× 10 dk santrifüj edildi. Rekombinant One Shot®BL21(DE3) *E. coli*'nin TY sıvı besiyerinde inkübasyonu sonrasında üst sıvıya geçen rPLD enzimini elde etmek için 9000 rpm× 10 dk santrifüj edildi. RPLD ve dPLD enzimlerinin konsantrasyonunda sırasıyla 0,45 µm (Hydrosart, 00637123, Sartorius Stedim Slice200) ve 10 kDa (Polyethersulfone,10022213,Sartorius Stedim Slice200) çapında membran kaset sistemleri kullanılarak aşı çalışmaları için enzimler yaklaşık 200 kat oranında konsantre edildi (Bkz. EK-B. 7.2).

2.2.11. Protein Miktar Tayini

Pierce™ BCA Protein Assay Kitin (Thermo Scientific, 23227) belirttiği protokole uygun olarak, içerisinde 2 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) bulunan standart tüp ile standartlar hazırlandı. Konsantrasyonu yapılan dPLD ve rPLD enzimleri 2'şer katlı (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) olacak şekilde sulandırıldı. Düz tabanlı mikropleytin gözlerine standart ve numuneler 25'şer µl dağıltıldıktan sonra her birinin üzerine hazırlanan BCA çalışma solüsyonundan (50:1, Solüsyon A: Solüsyon B) 200 µl ilave edildi ve 37ºC'de 30 dk bekletildi. Mikropleyt ELISA okuyucuda (BİOTEK *EL*×800, USA) 450 nm dalga boyunda okutuldu. Çıkan Optik Dansite (OD) sonuçları Microsoft Office Excel programı aracılığı ile numunelerin protein miktarları göre değerlendirildi (Şekil 2.2.7).



Şekil 2.2.7.: Protein ölçümü sonrası elde edilen eğim grafiği.

2.2.12. Konsantrasyon Sonrası dPLD ve rPLD Enzimlerinin Titre Ölçümü

Reverse CAMP test

Konsantrasyon sonrası dPLD ve rPLD enzim aktivite ve titrelerini belirleyebilmek amacı ile Reverse CAMP testi yapıldı. Deneme sayısına göre %5 koyun kanı içeren agarlara çukur açılarak çukurların dipleri agarla doldurulduu. DPLD ve rPLD enzimleri ayrı ayrı 2'şer katlı (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/) olacak şekilde steril FTS ile sulandırıldı. Agarın orta hattına *R. equi* suşu çekildi ve çukurlara yapılan enzim sulandırmalarından 100'er µl koyuldu ve 37°C' de 48 saat %10 CO_2'lik etüvde inkübe edilerek rPLD ve dPLD enzimlerinin titresi belirlendi.

2.2.13. Aşı Çalışması

Letal Doz belirleme denemesi

Necmettin Erbakan Üniversitesi Deney Hayvanı Ünitesinden (Konya) temin edilen ve ağırlıkları 15-18 gr arasında değişen swiss albino ırkı farelerden yararlanıldı. DPLD ve rPLD enzimleri için iki ayrı grup oluşturularak steril FTS ile 2'şer katlı (1/4, 1/8) sulandırıldı. Her grupta 2 dişi fare olmak üzere toplam 8 adet fareye periton içerisine yapılan sulandırmalardan 0,3 ml yapıldı ve dPLD ve rPLD'nin LD_{50}'i değerleri belirlendi. Çelınç denemesinde kullanılan canlı *C. pseudotuberculosis*'in LD50'sini belirlemek için, *C. pseudotuberculosis* suşu BHI'da 37ºC'de 48 saat inkübe edildi. Üreyen kültür 10'ar katlı (1×10^6, 1×10^7, 1×10^8,

1×10^9) sulandırıldı ve agara ekim yapılarak canlı koloni sayımı yapıldı. Canlı koloni sayım sonucuna göre ml/bakteri sayısı belirlendikten sonra 10'ar katlı (10^{-3}, 10^{-4}) sulandırma yapıldı ve her grupta 2 adet fare olmak üzere toplam 4 farenin periton içerisine 0,3 ml miktarında sulandırılan bakteri kültürden verildi (Bkz. EK-B. 7.4).

Aşı formülasyonu

Konsantre edilen dPLD'nin LD_{50} değeri, ml/mg protein miktarı ve hemolitik titresi göz önünde bulundurularak; CFA, ISA 201 VG, ISA 206 VG adjuvantları için enzim ve adjuvant oranı 1:1 ve $Al(OH)_3$ jel için aşı dozunun son konsantrasyonunda içerisinde %4 adjuvant olacak şekilde 4 farklı aşı kombinasyonu hazırlandı.

Konsantre edilen rPLD'nin LD_{50} değeri, ml/mg protein miktarı ve hemolitik titresi göz önünde bulundurularak; CFA, ISA 201 VG, ISA 206 VG adjuvantları için enzim ve adjuvant oranı 1:1 ve $Al(OH)_3$ jel için aşı dozunun son konsantrasyonunda içerisinde %4 adjuvant olacak şekilde 4 farklı aşı kombinasyonu hazırlandı.

2.2.14. Aşıların Laboratuar Kontrolü

Sterilite testi

Hazırlanan aşılar, aerobik ve anaerobik bakteriler ile mikoplazma ve mantar yönünden uygun besiyerlerinde, 37ºC ve 22 ºC'de 14 gün inkübe edildi (OIE 2004).

2.2.15. Aşı Etkinlik Çalışmaları

Çelınç ve seropotens çalışması

Çalışmada aday aşıların ve ticari aşıların etkinliğini belirlemek için her aşı grubunun potens+çelınç denemelerini yapmak için swiss albino ırk ağırlıkları 15-18 gr arasında değişen fareler kullanıldı. Bu amaçla 9 adet aşı grubu için seropotens ve çelınç grubu olacak şekilde iki alt grup oluşturularak ilgili 3'er hafta ara ile 2 kez 0,2 ml aşı ile aşılandı. Aşıların koruyuculuğunu ve antikor salınımı üzerindeki etkinliğini gözlemleyebilmek için sadece çelınç grubu farelerine son aşılamadan 10 gün sonra canlı *C. pseudotuberculosis* suşunun belirlenen LD50 değeri 0,3 ml oranında periton içi verildi.

Kuzu aşılama çalışması

Aşıların sterilite kontrolleri yapılarak kontaminasyon olmadığı doğrulandıktan sonra 10 aylık kuzular aşı çalışmaları için kullanıldı. Uygulama öncesinde toplam 20 adet kuzudan kan alındıktan sonra 9 farklı aşı grubundaki toplam 18 adet kuzu 3'er hafta ara ile 2 kez 1 ml aşı ile aşılandı. Aşılama sonrası 8. haftaya kadar aşı yapılan bölge kontrol edildi. 0. gün 21. gün ve 43. gün kan alınarak serumları çıkarıldı.

Aşılı Kuzu Serumlarının Değerlendirilmesi

Hemolitik ünite ölçüm testi

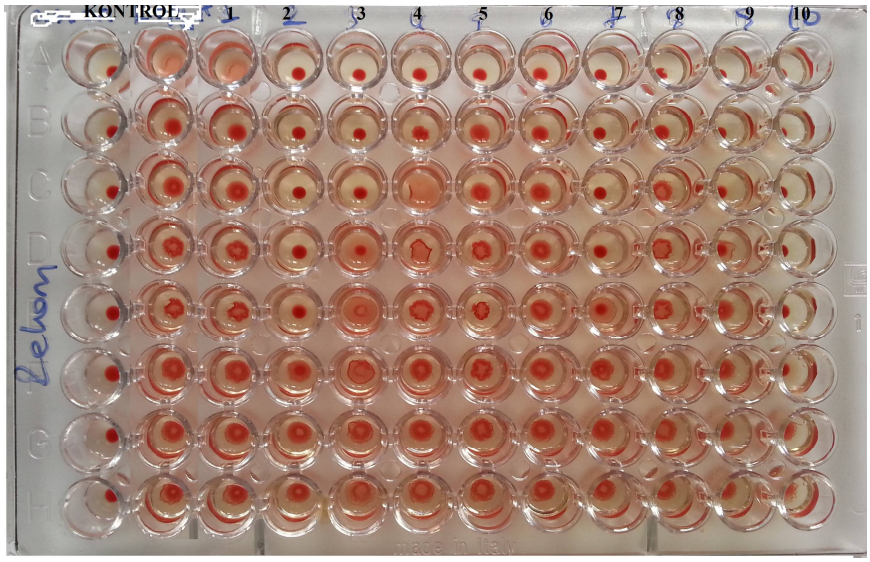
Konsantre edilen rPLD ve dPLD enzimlerinin hemolitik ünite birimleri belirlendi. Bu amaçla, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi koyunculuk ünitesinde bulunan koyunlardan defibrine kan alındıktan sonra, 3 kez fizyolojik tuzlu su (pH: 7,2) ile yıkandı ve elde edilen eritrosit %2 oranında steril FTS ile sulandırıldı. DPLD ve rPLD enzimleri 2'şer katlı (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) oranında sulandırıldı ve mikropleytin çukurlarına sulandırılan rPLD ve dPLD enzimlerinden 50'şer µl dağıtıldıktan sonra her bir çukura % 2'lik koyun eritrositinden 50'şer µl eklenerek 37 °C'de 3 saat inkübe edildi. Son hemolizin görüldüğü çukurun iki çukur üstü HU olarak belirlendi.

Hemoliz inhibisyon testi

Çalışmada kullanılan 9 adet farklı aşı ile aşılanan ve kontrol grubu kuzularının 0. gün 21. gün ve 43. gün alınan kan serumları steril FTS ile 2'şer katlı (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256) oranında sulandırıldı ve mikropleytinn çukurlarına 50'şer µl dağıtıldı. HU miktarları belirlenen dPLD ve rPLD enzimleri ilgili çukurlara 50'şer µl eklendikten sonra antikor varlığını ve titresini tayin edebilmek amacı ile üzerlerine % 2'lik koyun eritrositinden 50'şer µl eklenerek 37 °C'de 3 saat inkübe edildi (Çizelge 2.2.7). Hemoliz İnhibisyon (HI) üniteleri son düğme şeklinde eritrosit çökelmesinin görüldüğü çukur, serum titresi olarak belirlendi (Şekil 2.2.8). RPLD ve dPLD 'nin antijenik benzerliğini belirleyebilmek için çapraz antijenik test uygulaması yapıldı.

Çizelge 2.2.7. Hemoliz İnhibisyon testinin standardize edilmesi.

Serum No → Sul.↓	1 Eritrosit + FTS	2 Eritrosit + PLD	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A ¼	Kontrol	Kontrol										
B 1/8	Kontrol	Kontrol										
C 1/16	Kontrol	Kontrol										
D 1/32	Kontrol	Kontrol										
E 1/64	Kontrol	Kontrol										
F 1/128	Kontrol	Kontrol										
G /256	Kontrol	Kontrol										
H1/256	Kontrol	Kontrol										

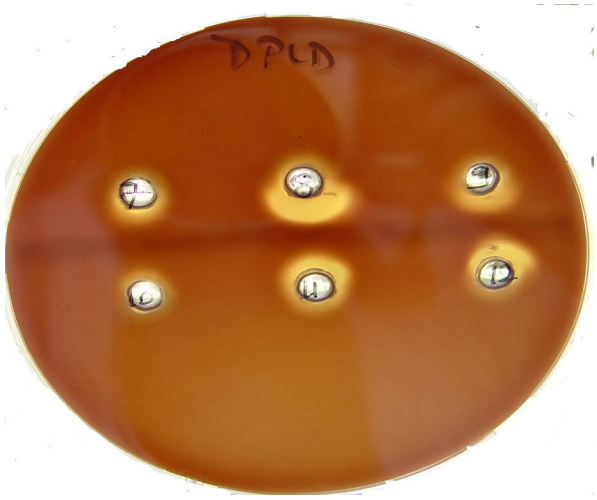


Şekil 2.2.8. Hemoliz inhibisyon test.

Agar serum nötralizasyon test

Çalışmada kullanılan 9 adet farklı aşı ile aşılanan ve kontrol grubu kuzularının 0. gün 21. gün ve 43. gün alınan kan serumları 2'şer katlı (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128) olacak şekilde sulandırıldıktan agar serum nötralizasyon testi için dPLD ve rPLD ile birebir oranında steril ependorf içerisinde karıştırılıp inkübe

edildi. Agarın orta hattına enzim etkinliğini görebilmek için *R. equi* ekildi ve agar yüzeyinde açılan çukurlara inkübe edilen serum-enzim karışımı dağıtıldı ve 37 °C'de 48 saat bekletildikten sonra sonuçlar değerlendirildi (Şekil 2.2.9). RPLD ve dPLD 'nin antijenik benzerliğini belirleyebilmek için çapraz antijenik test uygulaması yapıldı.



Şekil 2.2.9. Agar serum nötralizasyon test.

Enzim Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Kaplamada kullanılacak antijen miktarının belirlenmesi

ELISA'da mikropleyt gözlerinin kaplamasında kullanılacak olan dPLD ve rPLD antijenlerinin protein miktar tayinleri Pierce^{TM} BCA Protein Assay Kit ile belirlendi (Lowry ve ark 1951). Konsantrasyon sonrasında protein miktarı belirlenen rPLD ve dPLD antijenleri ayrı ayrı karbonat-bikarbonat solüsyonu ile sulandırılarak mikropleytin çukurları 1000 µg, 500 µg, 250 µg, 100 µg, 50 µg, 10 µg, 1 µg miktarında antijenle kaplandı. Pleytler 37ºC'de 1 saat, +4 ºC'de 1 gece inkübe edilerek antijenle kaplandı, süre sonunda PBS-T ile üç kez yıkandı. Özgül olmayan bağlanmaları engellemek için antijen yapışmayan polistiren yüzeylerin bloklanması amacı ile 100 µl, %1 BSA eklenerek, 37 ºC'de 1 saat inkübe edildi. Yıkama işlemi tekrarlandı (Şekil 2.4).

Ölçümde kullanılacak serum titresinin belirlenmesi

Laboratuarımızda kontrolü yapılan ve yüksek antikor titresine sahip olduğu ELISA ile doğrulanan pozitif serum kullanıldı (Erganiş ve ark 2014). PBS-T ile

pozitif serum 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/400, 1/800, 1/1600 oranında sulandırıldıktan sonra antijenle kaplanan mikropleytin çukurlarına sulandırmalardan 100'er µl dağıtıldı (Çizelge 2.2.8). Mikropleyt 37 ºC'de 1 saat inkübe edildikten sonra PBS-T ile 3 kez yıkandı. Çukurlara 1/ 8000 oranında sulandırılan 100 µl donkey anti-sheep Ig G horse radish peroksidaz konjugat (Sigma-Aldrich, S2763) ilave edilerek 37ºC'de 1 saat inkübe edildikten sonra PBS-T ile 3 kez yıkandı. Fosfat-sitrat çözeltisi (phosphate-citrate buffer with sodium perborate capsules, Sigma P4922, USA) ile taze olarak hazırlanan δ- fenildiamin dihidroklorid substrat (δ- phenylenediamine dihydrochloride tablet Sigma p8287, USA) tüm çukurlara 100 µl 0,4 mg/ml substrat eklendi. Pleytler oda ısısında 30 dk inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için 50 µl H_2SO_4 (0.5 M) eklenerek vakit geçirmeksizin ELISA okuyucuda (BIOTEK *EL* ×800, USA) 450 nm'de okutuldu.

Çizelge 2.2.8. ELISA testinin standardize edilmesi.

Serum Sul.→ Antijen Sul.↓	**1 1**	**2 1/10**	**3 1/20**	**4 1/40**	**5 1/80**	**6 1/160**	**7 1/320**	**8 1/400**	**9 1/800**	**10 1/1600**	**11**	**12**
A 1000 µg											Boş	Boş
B 500 µg											Boş	Boş
C 250 µg											Boş	Boş
D 100 µg											Boş	Boş
E 50 µg											Boş	Boş
F 10 µg											Boş	Boş
G 1 µg											Boş	Boş
H Boş											Boş	Boş

Negatif Eşik Değerinin (Cut off) Hesaplanması

Aday aşıların ve ticari aşıların etkinliğini belirlemek için çalışmada standardize edilerek geliştirilen ELISA yöntemi kullanıldı. Standardize edilen ELISA'nın negatif eşik değerinin belirlenmesinde, aşılama öncesi kuzulardan 0. gün alınan 20 adet kan serumu negatif kontrol olarak kullanıldı. Geliştirilen ELISA

yöntemi ile test edilen negatif kontrol serumlarının titresi, Erganiş ve ark (2014) tarafından geliştirilen ELISA yöntem ile de test edilerek serumların negatifliği teyit edildi.

Negatif eşik değeri; 20 adet kontrol serumun OD değerlerinin aritmetik ortalaması+ 3 kat standart sapma değeri (NK_{ORT} +3 SD) şeklinde hesaplandı.

DPLD ile aşılı grupların, dPLD ile işlenen ELISA için negatif eşik değer;

0,225+ 3×0,028=**0,309.**

DPLD ile aşılı grupların, rPLD ile işlenen ELISA için negatif eşik değer;

0,056+ 3×0,011=**0,101.**

RPLD ile aşılı grupların, rPLD ile işlenen ELISA için negatif eşik değer;

0,058+ 3×0,011=**0,091.**

RPLD ile aşılı grupların, dPLD ile işlenen ELISA için negatif eşik değer;

0,056+ 3×0,011=**0,089.**

2.2.16. Farelerde Çelınç ve Seropotens Guplarınının Değerlendirilmesi

Agar serum nötralizasyon test

Çelınç ve seropotens grubu farelerin serumlarında şekillenen anti-PLD antikor düzeyini tayin edebilmek amacı ile agar serum nötralizasyon testi yapıldı. Seropotens grubu farelerinden alınan 0. gün 21. gün ve 43. gün kan serumları ile çelınç grubu farelerinden 0. gün 21. gün 43. gün ve çelınç sonrası 10. günde alınan kan serumları kullanıldı. Testte kullanılan serumlar 2'şer katlı (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128) olacak şekilde sulandırıldıktan sonra dPLD ve rPLD ile birebir oranında steril ependorf içerisinde karıştırılıp inkübe edildikten sonra %5 defibrine koyun kanı içeren kanlı agarda belirli uzaklıkta çukurlar açıldı, çukurların dipleri agarla kapatıldıktan sonra orta hat boyunca *R. equi* çekildikten sonra çukurlara inkübe edilen serumlar dağıtıldı ve 37 °C'de 48 saat bekletildikten sonra sonuçlar değerlendirildi.

Çelınç gruplarının değerlendirilmesi

Çelınç ve seropotens deneme gruplarında süre sonunda ölmeyen farelere dekapitasyon ile ötenazi uygulandı. Çelınç denemelerinde ölen veya öldürülen farelerin iç organlarından (kalp, akciğer, karaciğer, dalak, böbrek) etken izolasyonu için ekim yapıldı. Aşı grubu farelerinden elde edilen çelınç deneme sonuçları, kontrol grubu ve ticari aşı fare grupları sonuçları ile karşılaştırıldı. Çelınç grubu etkinlik değerlendirmesi aşağıda belirtilen formüle göre yapıldı (Geoffrey ve ark 2010).

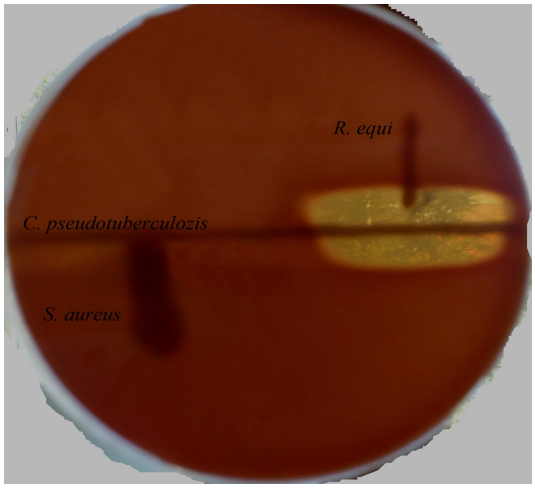
$$\textbf{Aşı Etkinliği} = \frac{\text{Aşılanmamış Grup} - \text{Aşılanmış Grup}}{\text{Aşılanmış Grup}} \times 100$$

3. BULGULAR

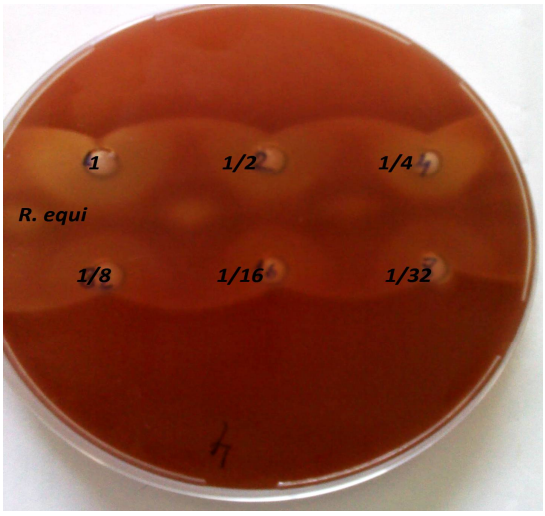
3.1. *C.pseudotuberculosis* ile İlgili Çalışma Sonuçları

3.1.1. Klonlamada Kullanılan *C. pseudotuberculosis* Seçimi ve Reverse CAMP Testi

Reverse CAMP test ile 60 adet suş içerisinden en etkili ve yüksek titrede PLD sentezleyen *C. pseudotuberculosis* suşu seçildi (Şekil 3.1). Klonlama çalışmasında SÜVF 323 nolu *C. pseudotuberculosis* suşu kullanıldı ve Reverse CAMP test ile de sentezlediği PLD enziminin titresinin 1/32 olduğu belirlendi (Şekil 3.2).



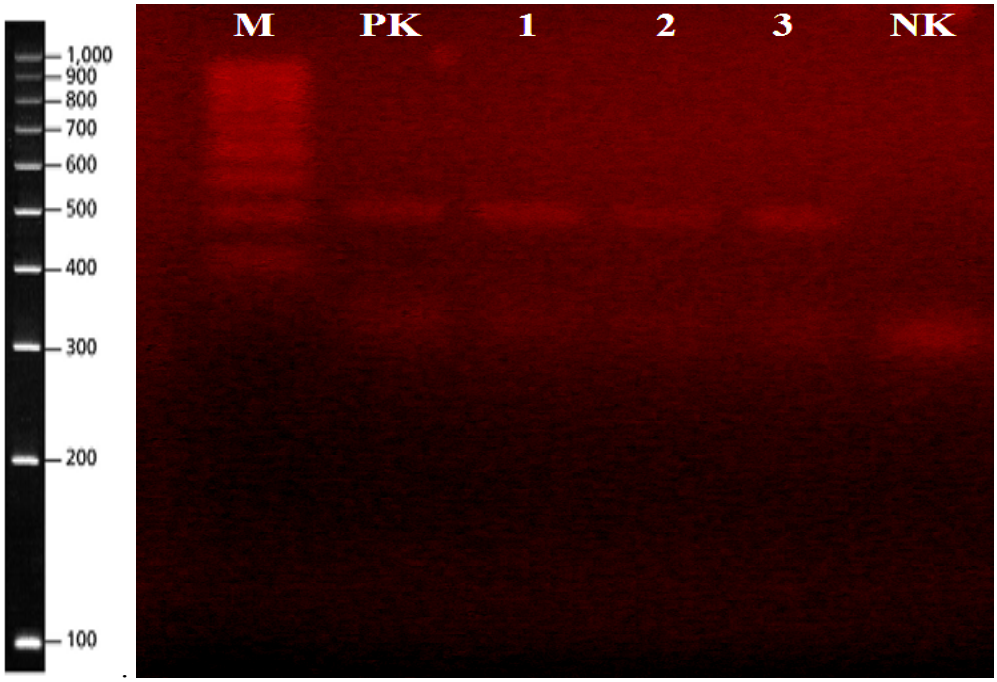
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan suş.



Şekil 3.2. Kullanılan suşun titresi.

3.1.2. *C. pseudotuberculosis*'te PLD Gen Varlığının PZR ile Doğrulanması

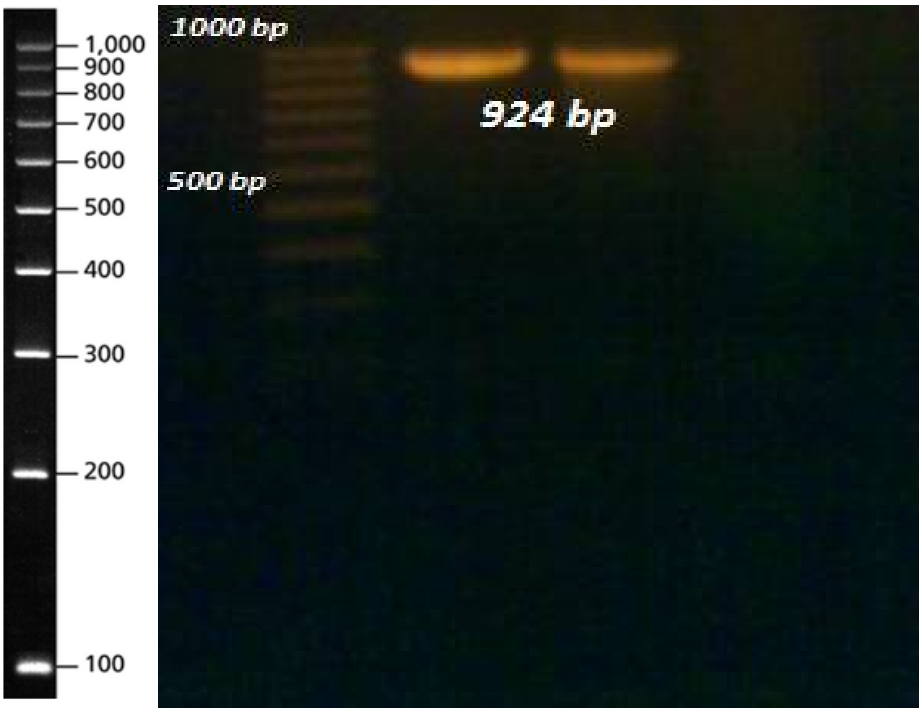
Tezde kullanılan *C. pseudotuberculosis*'in PLD geninin klonlama öncesinde varlığını tespit etmek amacıyla, PLD-F ve PLD R1 primerleri ile bakterinin genomik DNA'sı PZR ile çoğaltıldı. 203 bp büyüklüğünde DNA bandı görüntülendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. **M:** Marker, **PK:** Pozitif Kontrol, **NK:** Negatif kontrol, **1**, **2**, **3:** *C. pseudotuberculosis* suş PLD gen doğrulama.

3.1.3. *C. pseudotuberculosis* PLD Geninin PZR ile Çoğaltılması

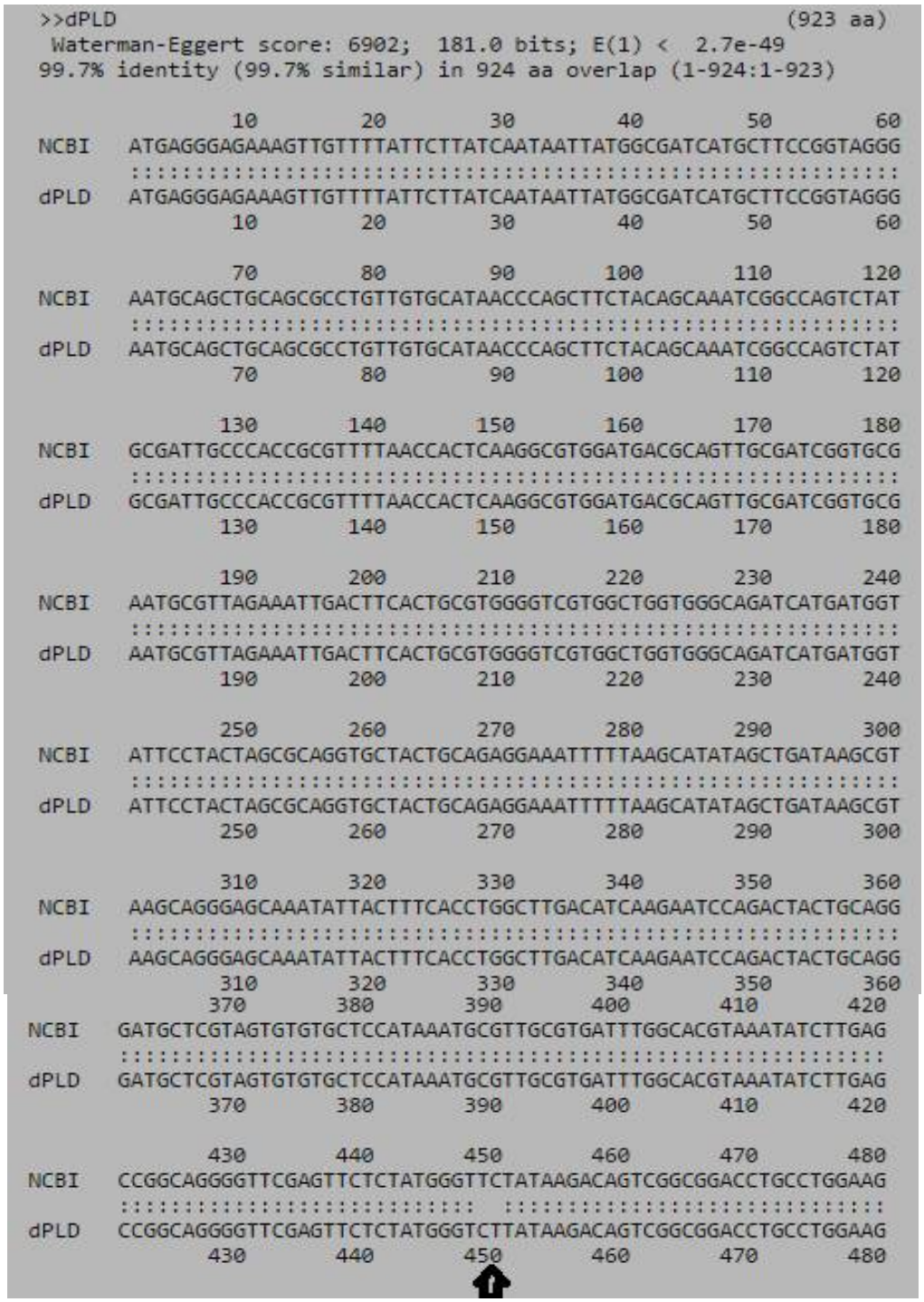
C. pseudotuberculosis PLD geninin klonlaması esnasında CLON-F1 ve CLON-R1 primerleri kullanılarak 924 bp büyüklüğünde DNA bandı görüntülendi (Şekil 3.4).



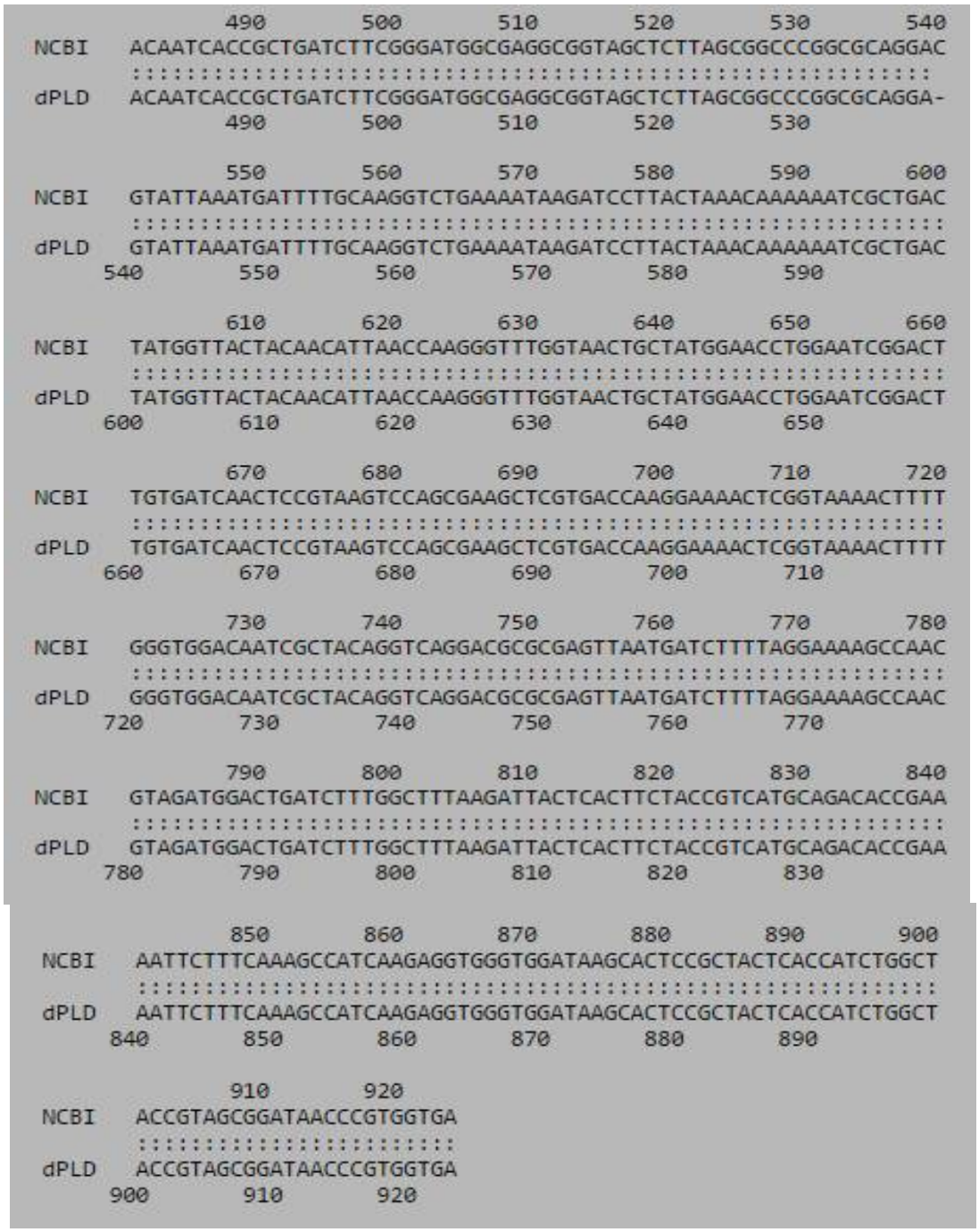
Şekil 3.4. PLD geninin tümünün agaroz jel görüntüsü. **M:** Marker, **1, 2:** *C. pseudotuberculosis* PLD geni.

3.1.4. PLD Geninin Baz Diziliminin Belirlenmesi

Tezde kullanılan SÜVF 323 nolu *C. pseudotuberculosis*'in saha suşu olması sebebi ile PLD genininde var olabilecek baz dizilim değişiklerini gözlemlemek amacı ile PLD CPF ve PLD CPR primer ile dizi analizi yaptırıldı (Metabion, Ankara). Sekans işlemi sonrasında elde edilen baz dizilimi, EMBL-EBI LALİGN (LALİGN Pairwise Sequence Alignment) internet programı aracılığı ile erişim no: L16587.1 olan *C. pseudotuberculosis*'e ait gen bankasındaki (NCBI, NIH, Washington, DC) veriler ve tezde kullanılan saha suşu verileri karşılaştırıldı ve %99.7 uyumlu bulundu (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Dizi analiz karşılaştırması.

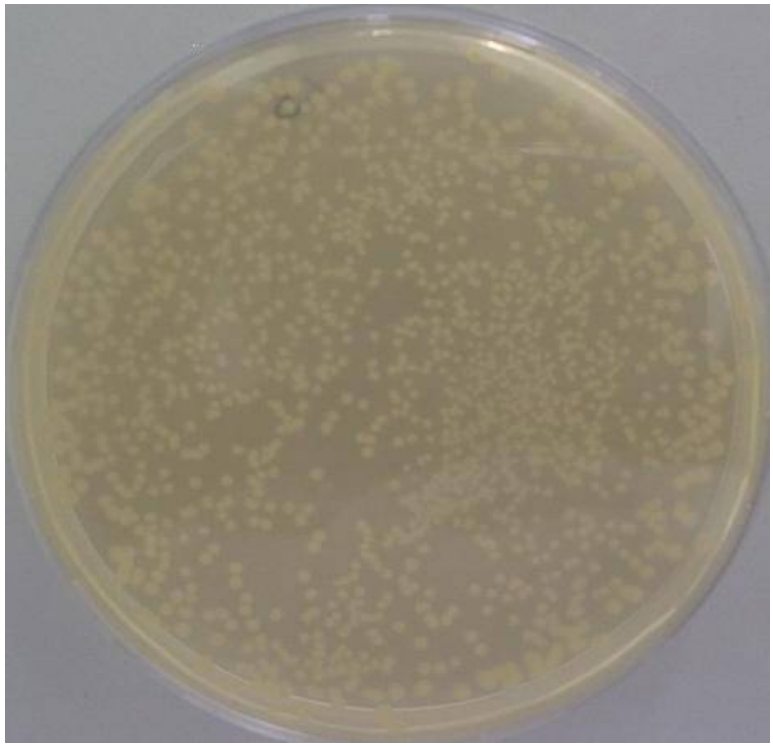


Şekil 3.5 (Devam). Dizi analiz karşılaştırması. DPLD: Tezde klonlamada kullanılan saha suşu *C. pseudotuberculosis* PLD'ye ait dizi, NCBI: Erişim No: L16587.1 *C. pseudotuberculosis* PLD'ye ait dizi. Ok ile gösterilen bazlar farklı bulundu.

3.2. Klonlama Çalışması Sonuçları

3.2.1. Transformasyon Çalışması

pET SUMO vektöre PLD geninin vektöre bağlanması sonrasında klon sayısını arttırmak için önce *E. coli* One Shot®Mach1™-T1^{R}'e transformasyon işlemi sonrasında 50 µg/ml kanamisin içeren besiyerinde koloni gelişimi belirlendi (Şekil 3.6).

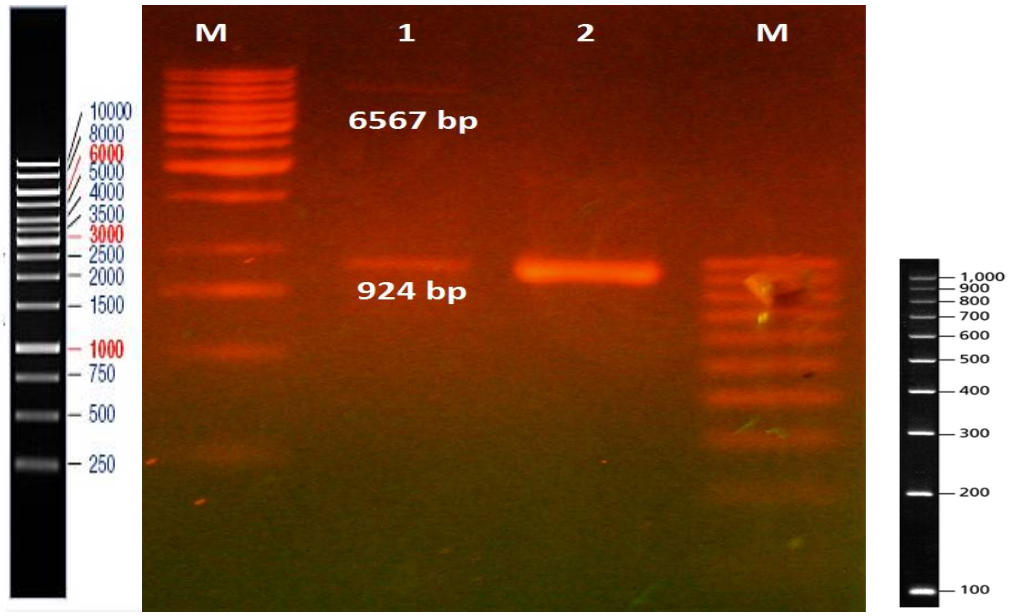


Şekil 3.6. PLD geni aktarılan One Shot®Mach1™-T1^{R} görünümü.

3.2.2. Klonlama İşlemi Yapılan Plazmid Varlığının Doğrulanması

PZR ile Doğrulanması

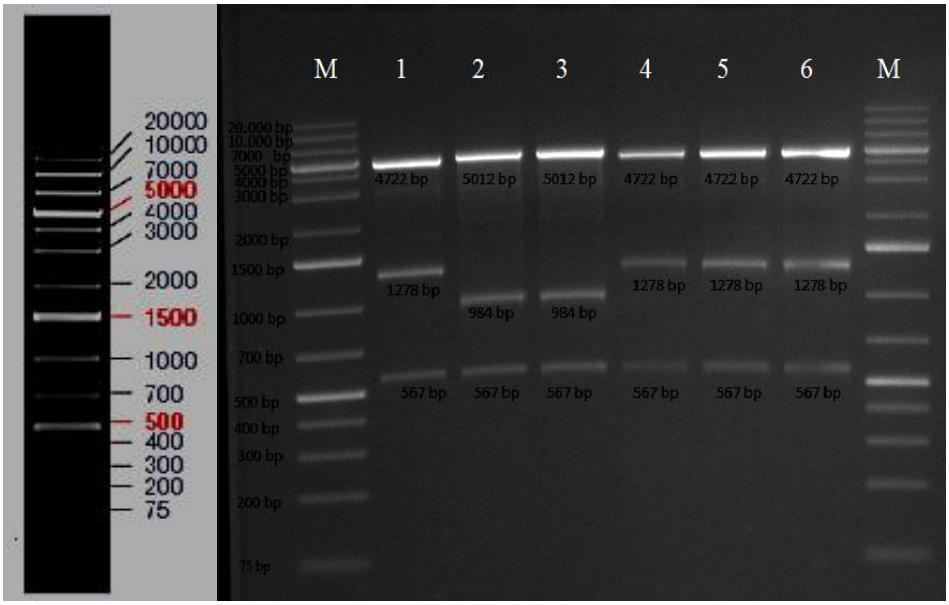
Transformasyon sonrası besiyerinde üreyen kolonilerden rastgele seçim yapılarak doğrulama işlemi yapıldı. PLD geninin çoğaltılmasında **CLON-F1** ve **CLON-R1** primerleri ile PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. PZR ürünü agaroz jelde beklenildiği gibi yaklaşık 6567 bp büyüklüğündeki pET SUMO vektörü ve yaklaşık 924 bp büyüklüğündeki PLD geni olmak üzere iki bant gözlendi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. PLD geninin vektöre bağlanmasının PZR ile doğrulanması
M: Marker, **1:** Bağlanmanın gerçekleştiği pET SUMO vektör (6567bp) ve PLD Geni (924 bp), **2:** Pozitif kontrol.

Restriksiyon Endonükleaz ile Doğrulanması

Transformasyon sonrası LB katı besiyerinde üreyen kolonilerden rastgele seçim yaparak koloniler numaralandı. Numaralandırılan kolonilerden PLD geninin pET SUMO vektöre ligasyonunu doğrulamak amacı ile Ssp I (Fermentas, SM1332) restriksiyon enzimi ile kesim işlemi yapıldı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Ligasyonu yapılan plazmidlerin Ssp I RE ile kesim işlemi sonrası agaroz jelde görünümü.

Dizi Analizi ile Doğrulanması ve Verilerin Bioinformatik Yöntemler ile Analizi

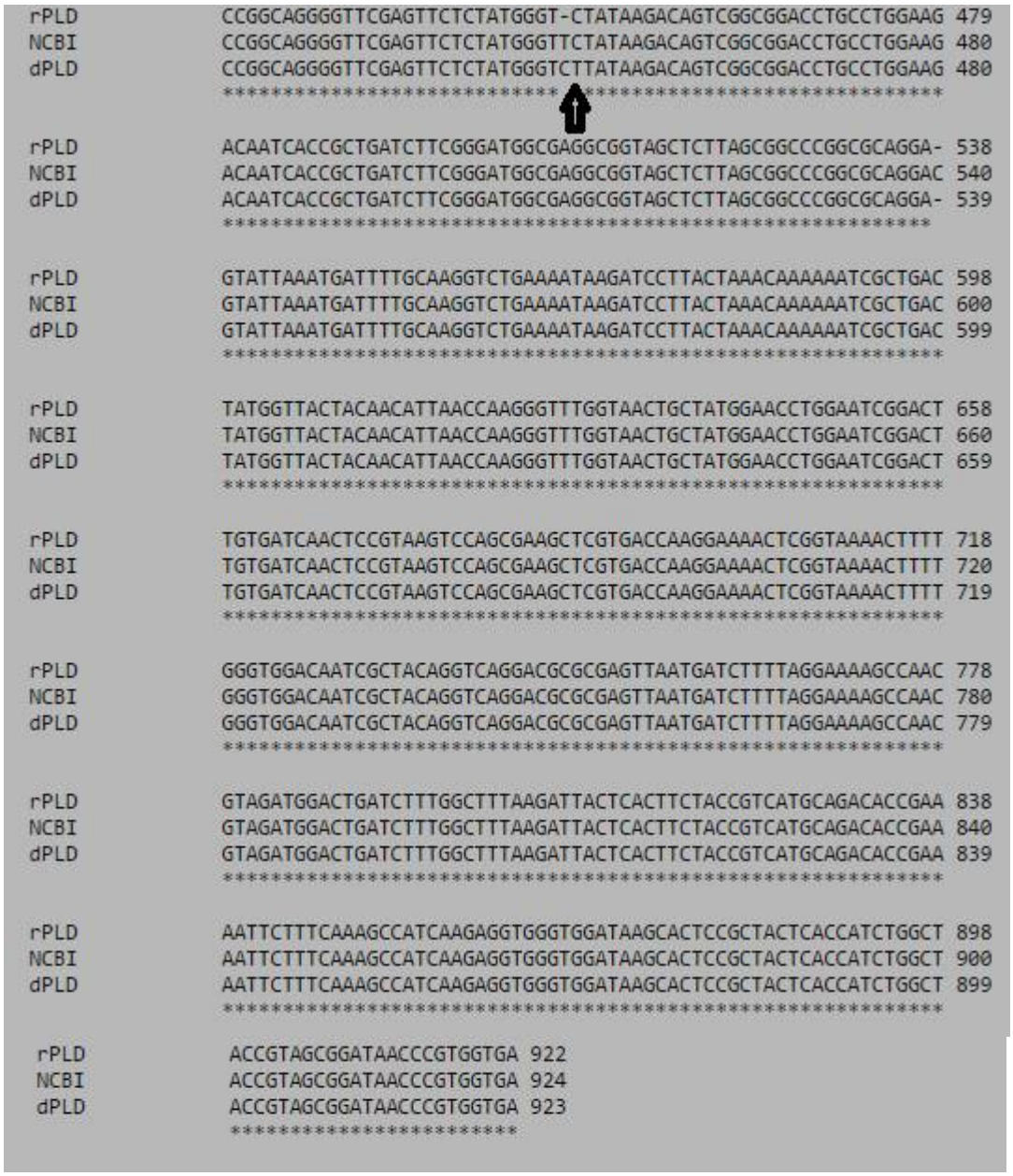
NCBI gen bankasındaki erişim no:L16587.1 olan *C. pseudotuberculosis*'e ait PLD gen (**NCBI**), klonlama işleminde kullanılan 323 nolu saha suşu *C. pseudotuberculosis*'in PLD geni (**dPLD)** ve pET SUMO vektöre PLD geninin klonlamasının sonrasında elde edilen PLD geninin (**rPLD)** baz dizilimleri Clustal 2.1 Çoklu Sekans Sıralama (Clustal 2.1 Multiple Sequence Alignment) programı ile karşılaştırıldı. DPLD, rPLD ve NCBI'nin dizi analizi karşılaştırmasından çıkan sonuca göre 448. ve 449. bazlarında farklılık gözlendi. NCBI 448'inci bazının Timin nükleotidi, dPLD 448'inci bazının Sitozin nükleotidi olduğu ve rPLD'nin 448'inci bazının sekans dizilimi ile okunamadığı, NCBI 449'uncu bazının Sitozin nükleotidi, dPLD 449'uncu bazının Timin nükleotidi olduğu ve rPLD'nin 448'uncu bazının Sitozin nükleotidi olduğu belirlendi (Şekil 3.9).

GenBank Erişim No:L16587.1 olan *C. pseudotuberculosis*'e ait PLD geninin (NCBI), klonlama işleminde kullanılan 323 nolu saha suşu *C. pseudotuberculosis*'in PLD geninin (dPLD) ve pET SUMO vektöre PLD geninin klonlamasının sonrasında elde edilen rPLD'nin baz dizilimleri ExPasy Translate Tool internet programı aracılığıyla aminoasit dizilimine dönüştürüldü (Anonim 8). Belirlenen amino asit dizilimleri Clustal 2.1 Çoklu Sekans Sıralama (Clustal 2.1 Multiple Sequence

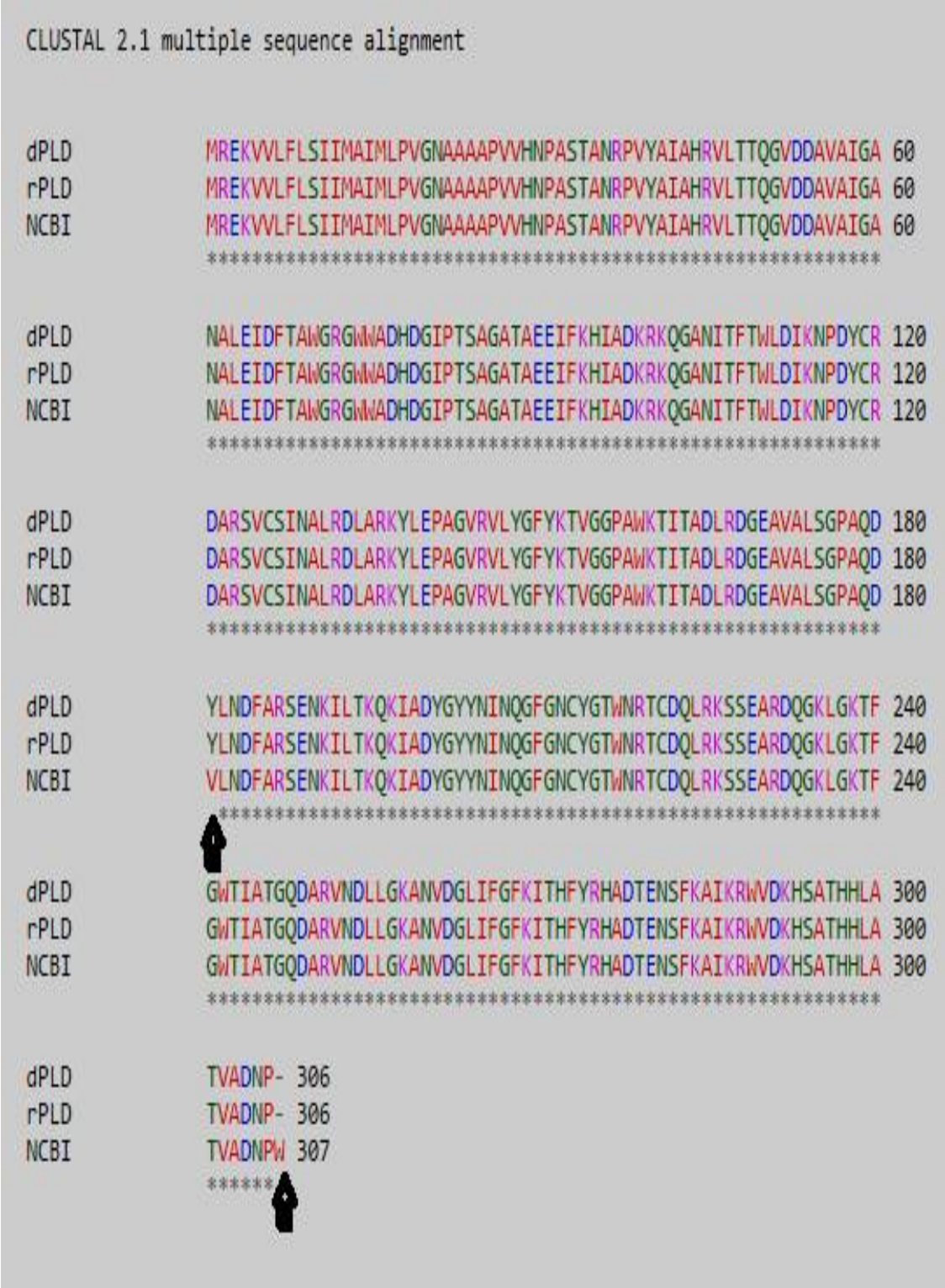
Alignment) programı aracılığı ile karşılaştırıldı. DPLD, rPLD ve NCBI'nin dizi analizi karşılaştırmasından çıkan sonuca göre 181. ve 307. amino asitlerinde farklılık gözlendi. NCBI 181. aminoasitinin Valin (V), dPLD ve rPLD'nin 181. amino asitinin, okunamadığı NCBI'nin 307. amino asitinin W (Triptofan) olduğu belirlendi (Şekil 3.10).



Şekil 3.9. Dizi analiz karşılaştırılması.



Şekil 3.9. (Devam). Dizi analiz karşılaştırılması. RPLD: Rekombinant PLD, SUVF: Tezde klonlamada kullanılan saha suşu *C. pseudotuberculosis* PLD'ye ait dizi, NCBI: Erişim No: L16587.1 *C. pseudotuberculosis* PLD'ye ait dizi. Ok ile gösterilen bazlar farklı bulundu.

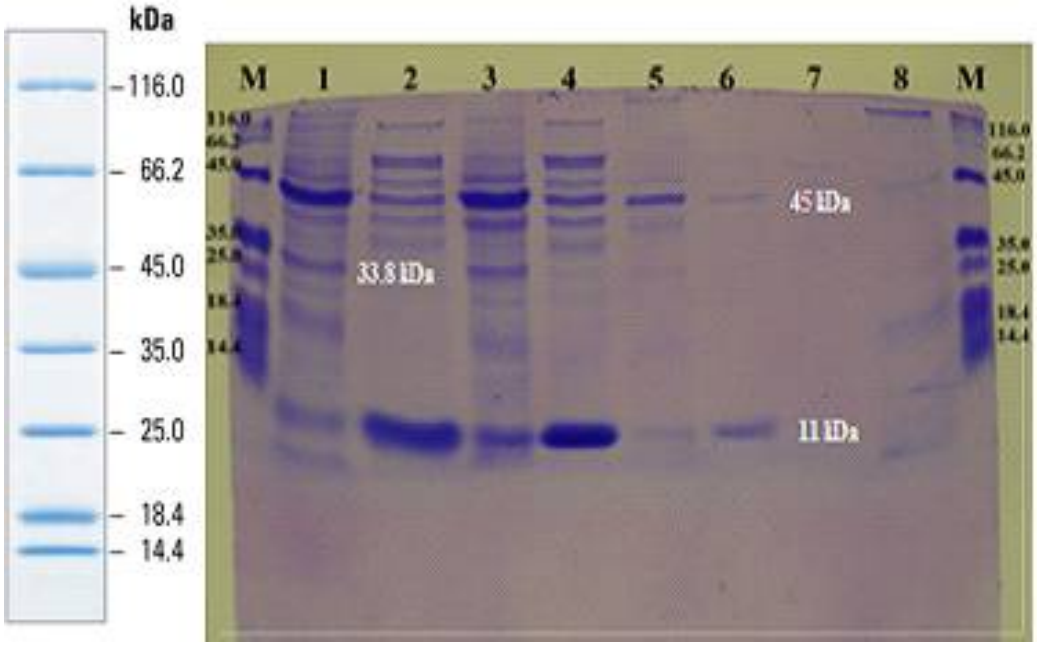


Şekil 3.10. Protein amino asit dizilim karşılaştırması. RPLD: Rekombinant PLD, dPLD: Tezde klonlamada kullanılan saha suşu C. pseudotuberculosis PLD'ye ait dizi, NCBI: Erişim No: L16587.1 C. pseudotuberculosis PLD'ye ait dizi. Ok ile gösterilen amino asitler farklı bulundu.

3.3. Çözünmeyen/Çözünebilir Protein Düzeyinin Belirlenme Sonuçları

3.3.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Gel Elektroforez (SDS-PAGE)

Transformasyon sonrası PLD geninin klonlandığının doğrulamasının yapıldığı *E. coli* BL21(DE3) kolonilerinden PLD enzim ekspresyonu sonrasında, rPLD enzimi ve diğer hücre dışındaki ve içindeki toplam proteinler SDS-PAGE ile gözlemlendi. SDS-PAGE ile besiyeri üst sıvısında çözünebilir rPLD bulunduğu ve 45 kDa ağırlığında olduğu gözlendi (Şekil 3.11).

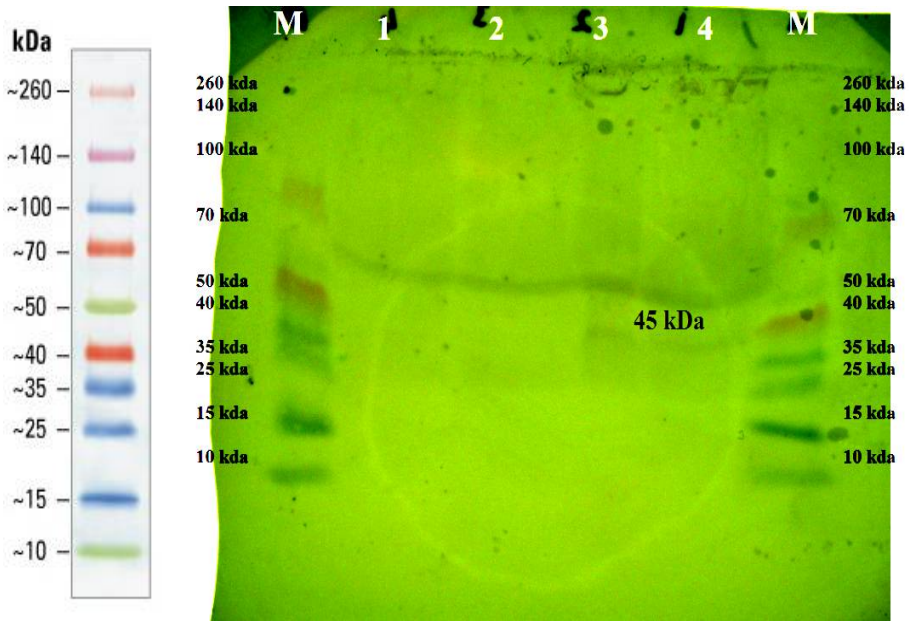


Şekil 3.11. 45 kDa ağırlığında olan rPLD'nin SDS-PAGE ile görüntülenmesi.

M: Marker, **1:** *C. pseudotuberculosis* pelet lizisi, **2, 4:** *E. coli* BL21(DE3) pelet lizisi, **3:** *C. pseudotuberculosis* üst sıvı, **5:** 100 kDa ve 10 kDa filtre sistemleri ile üst sıvıta bulunan rPLD toksininin konsantre hali, **6:** Konsantre edilmeyen rPLD'nin üretildiği besiyerine ait üst sıvı **7:** IPTG ile indüklenmeyen *E. coli* BL21(DE3)'nin inkübe edildiği besiyerine ait üst sıvı, **8:** *C. pseudotuberculosis'*in geliştiği %5 koyun serumu içermeyen BHI'ın üst sıvının protein profili.

3.3.2. Western Blot

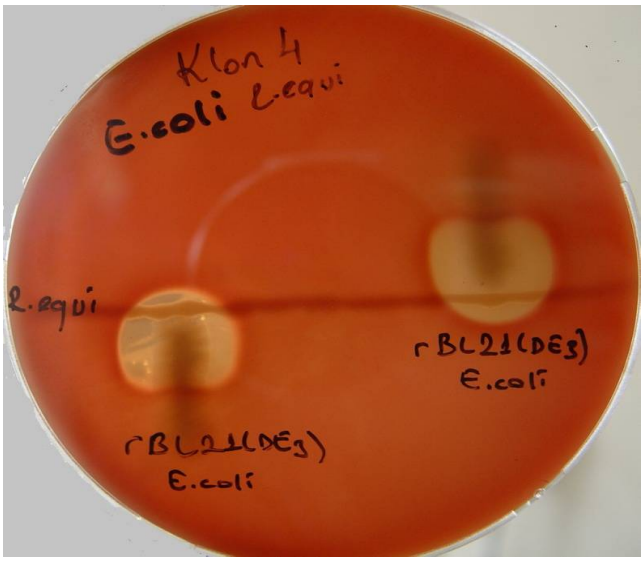
SDS-PAGE sonrası görüntülenen protein bantlarını doğrulamak için Western Blot uygulaması yapıdı. rPLD pozitif olan serum ile nitroselüloz membran üzerinde 45 kDa ağırlığında rPLD'ye ait bant olduğu gözlendi (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. rPLD proteinin Western Blot uygulaması ile gösterilmesi.
M: Marker, **1**, **2**, **3**, **4:** rPLD.

3.4. Rekombinant PLD Enzim Etkinliğinin Belirlenmesi

Transformasyon sonrası PLD geninin ligasyonun doğrulandığı *E. coli* One Shot BL21(DE3) bakterisi ile *R.equi*'nin sinerjistik ilişkisinden yararlanılarak Reverse CAMP testi yapılarak rPLD enziminin sentezlendiği doğrulandı (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Reverse CAMP testi.

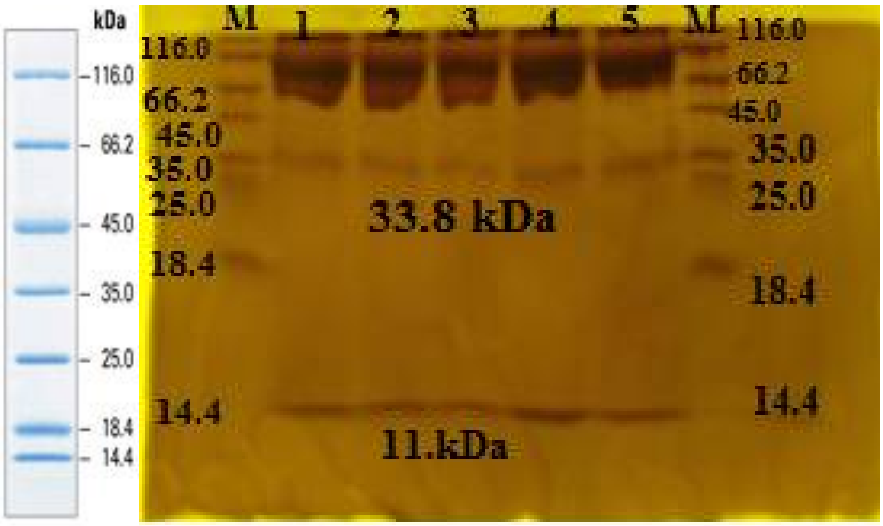
3.5. rPLD Enzim Saflaştırılması ve Konsantrasyonu Sonuçları

3.5.1. Ni-NTA kolon ile protein saflaştırılması

Ni-NTA Spin Kit (QIAGEN) ile saflaştırma işlemi sonrasında 45 kDa rPLD ağırlığında proteinin miktarı Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23227) ile ölçüldü ve saf rPLD enzimi 30 µg/ml miktarında olduğu belirlendi.

3.5.2. SUMO proteaz enzim ile kesim

Yaklaşık 45 kDa ağırlığında sentezlenen rekombinant PLD proteini, SUMO proteaz enzim ile kesim işlemi yapılarak 11 kDa ağırlığında olan SUMO proteininden ayrıldı. Kesim işlemi sonrası doğrulama SDS-PAGE ile yapıldı (Şekil 3.14). Ancak Ni-NTA ile saflaştırma işlemi sonrası elde edilen saf PLD enzim miktarı 30 µg/ml bulunması sebebi ile aşı çalışmasında kullanılmadı.



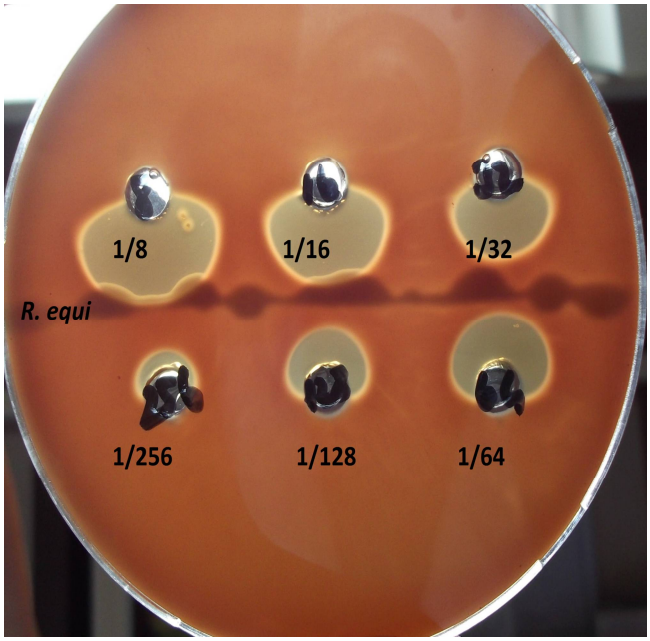
Şekil 3.14. rPLD proteinin SUMO proteaz ile kesim işlemi sonrası füzyon proteininin uzaklaştırılmasının SDS-PAGE ile görünümü.

3.6. Aşı Çalışması Sonuçları

3.6.1. Doğal PLD Enzimi ile Aşı Çalışması Sonuçları

DPLD enziminin değerleri

DPLD'nin ultra filtrasyon membran filtre sistemi ile konsantrasyonu sonrasında Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23227) ile ölçümü sonrasında protein miktarının 23.6 mg/ml olarak belirlendi. dPLD'nin LD50 değeri 2.95 mg/ml, Reverse CAMP testine göre son hemolitik titresi 1/256 olarak belirlendi (Şekil 3.15).

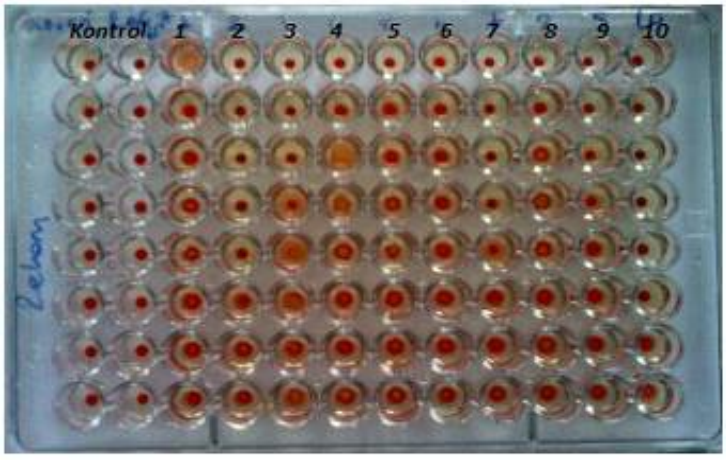


Şekil 3.15. Konsantre dPLD enzim titresi.

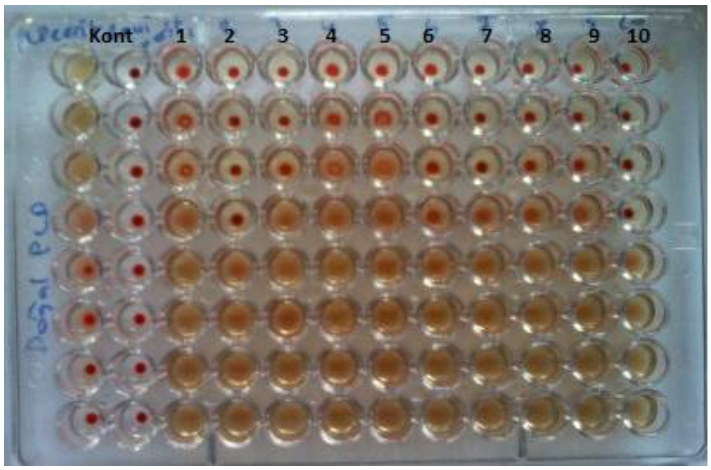
Hemoliz inhibisyon test

RPLD ve DPLD ile sonuç değerlendirmesi

DPLD enziminin HU ölçüm birimi 1/16 olarak belirlendikten sonra hemoliz inhibisyon testi yapıldı. Aşıların etkinliğini belirleyebilmek ve rPLD ve dPLD arasındaki yapısal benzerliği belirleyebilmek için, aynı serumlar kullanılarak hem rPLD ve hem de dPLD enzimleri ile hemoliz inhibisyon testi yapılarak sonuçlar karşılaştırıldı (Şekil 3.16), (Şekil 3.17), (Çizelge 3.1).



Şekil 3.16. rPLD ile titre ölçümü.



Şekil 3.17. dPLD ile titre ölçümü.

Çizelge 3.1. Hemoliz inhibisyon test ile ölçülen serum örneklerinin sonuçları.

Test Antijeni→	**dPLD**						**rPLD**					
Örnekleme günleri	**0. gün**		**21. gün**		**43. gün**		**0. gün**		**21. gün**		**43. gün**	
Kuzu No →	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
Aşı Tipi↓												
dPLD+CFA	1/2	1/2	1/2	1/2	1/16	1/16	0	0	1/2	1/2	1/16	1/16
dPLD+ISA 201 VG	1/2	1/2	1/2	1/2	1/16	1/16	0	0	1/2	1/2	1/16	1/16
dPLD+ISA 206 VG	1/2	1/2	1/2	1/2	1/16	1/16	0	0	1/2	1/2	1/16	1/8
dPLD+$Al(OH)_3$	1/2	1/2	1/2	1/2	1/16	1/16	0	0	1/2	1/2	1/8	1/4
Ticari Aşı	1/2	1/2	1/2	1/2	1/8	1/4	0	0	1/2	1/2	1/8	1/4
Kontrol grup	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	0	0	0	0	0	0

dPLD (doğal PLD), **rPLD** (rekombinant PLD). Kullanılan aşı tipleri; dPLD+Alüminyum hidroksit jel ($Al(OH)_3$), dPLD+Montanide ISA 206 VG, dPLD+Montanide ISA 201 VG, dPLD+Complete Freund Adjuvant (CFA).

Bu değerlendirmeye göre adjuvantın aşı üzerindeki etkisi, dPLD ve rPLD antijen benzerliği karşılaştırıldı. Hemoliz inhibisyon test sonuçlarına göre;

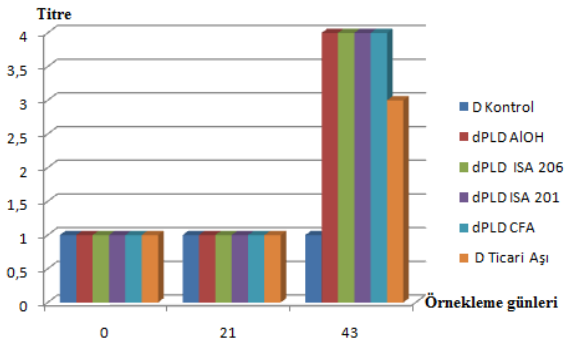
I- Farklı adjuvantlar ile hazırlanan 4 farklı dPLD aşısının, ticari aşıdan daha etkili şekilde immun yanıtı uyardığı,

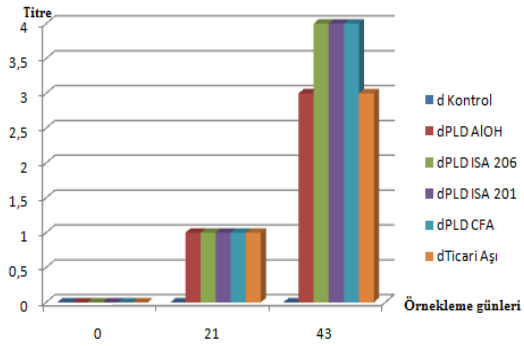
II- Adjuvantlar arasında karşılaştırma yapıldığında ise immun yanıtın uyarılması bakımından farkın olmadığı,

III- CFA, ISA 206 VG ve ISA 201 VG ile hazırlanan dPLD aşı grubuna ait serumların hemoliz inhibisyon titresinin rPLD ile ölçümde titrenin değişmediği,

IV- $Al(OH)_3$ ile hazırlanan dPLD aşı grubuna ait serumların hemoliz inhibisyon titresinin rPLD ile ölçümde titrenin düştüğü (Çizelge 3.3.2),

V- Kontrol grubuna ait serumların dPLD ile titresinin 1/2 iken rPLD ile titre vermediği gözlendi (Şekil 3.18.1), (Şekil 3.18.2).





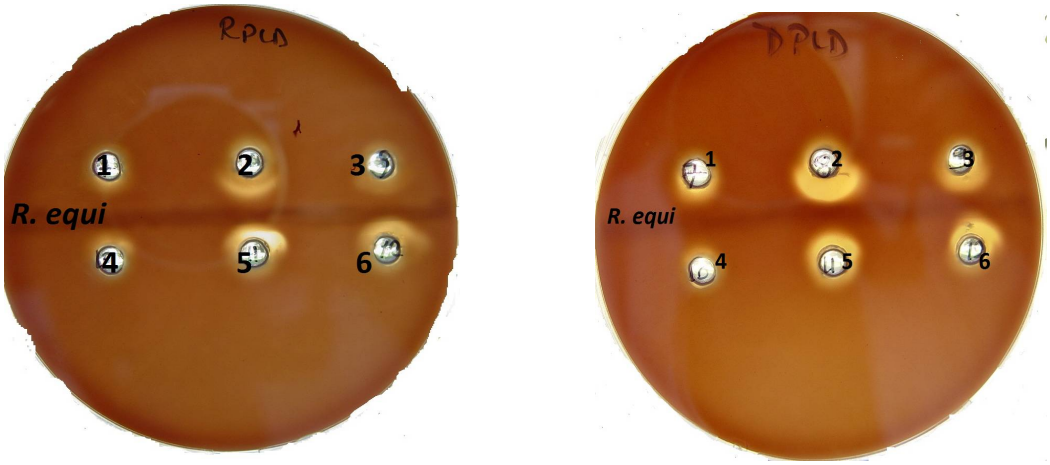
Şekil 3.18.1. DPLD ile titre ölçümü. **Şekil 3.18.2.** RPLD ile titre ölçüm.

dPLD (doğal PLD), **rPLD** (rekombinant PLD). Kullanılan aşı tipleri; dPLD+Alüminyum hidroksit jel ($Al(OH)_3$), dPLD+Montanide ISA 206 VG, dPLD+Montanide ISA 201 VG, dPLD+Complete Freund Adjuvant (CFA).

Agar serum nötralizasyon test

RPLD ve DPLD ile sonuç değerlendirmesi

Aşıların etkinliğini değerlendirebilmek ve rPLD ve dPLD arasındaki yapısal benzerliği belirleyebilmek için, aynı serumlar kullanılarak hem rPLD ve hem de dPLD enzimleri ile agar serum nötralizasyon testi yapılarak sonuçlar karşılaştırıldı (Şekil 3.19), (Çizelge 3.2).



Şekil 3.19. Agar serum nötralizasyon test ile rPLD ve dPLD antijenleri ile titre ölçümü.

Çizelge 3.2. Agar serum nötralizasyon test ile ölçülen serum örneklerinin sonuçları.

Test Antijeni →	**dPLD**						**rPLD**					
Örnekleme Günleri →	**0. gün**		**21. gün**		**43. gün**		**0. gün**		**21. gün**		**43. gün**	
Kuzu no →	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
Aşı Tipi ↓												
dPLD+CFA	0	0	1	1	3	3	0	0	1	1	3	3
dPLD+201 VG	0	0	1	1	3	3	0	0	1	1	3	3
dPLD+206 VG	0	0	1	1	3	3	0	0	1	1	3	3
dPLD+$Al(OH)_3$	0	0	1	1	3	3	0	0	1	1	3	3
Ticari Aşı	0	0	1	1	2	2	0	0	1	1	2	2
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

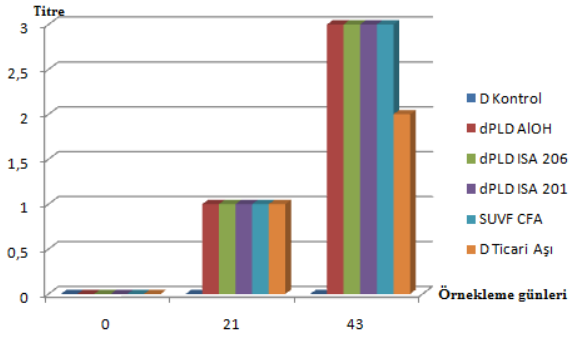
dPLD (doğal PLD), **rPLD** (rekombinant PLD). Kullanılan aşı tipleri; dPLD+Alüminyum hidroksit jel ($Al(OH)_3$), dPLD+Montanide ISA 206 VG, dPLD+Montanide ISA 201 VG, dPLD+Complete Freund Adjuvant (CFA).

Bu değerlendirmeye göre adjuvantın aşı üzerindeki etkisi, dPLD ve rPLD antijen benzerliği karşılaştırıldı. Agar Serum Nötralizasyon test sonuçlarına göre;

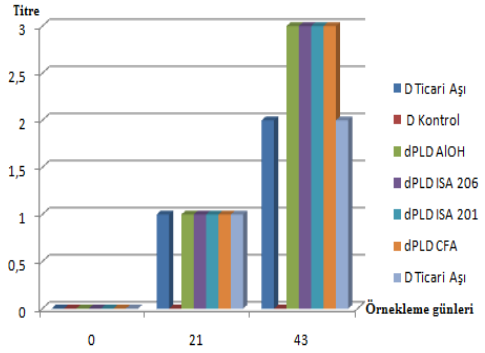
I Farklı adjuvantlar ile hazırlanan 4 farklı dPLD aşısının ve ticari aşıdan daha etkili şekilde immun yanıtı uyardığı

II Adjuvantlar arasında karşılaştırma yapıldığında ise immun yanıtın uyarılması bakımından farkın olmadığı

III rPLD ve dPLD toksinlerinin benzer olduğu düşünüldü (Şekil 3.20.1), (Şekil 3.20.2).



Şekil 3.20.1. dPLD ile titre ölçümü.



Şekil 3.20.2. rPLD ile titre ölçümü.

dPLD (doğal PLD), **rPLD** (rekombinant PLD). Kullanılan Adjuvant tipleri; $Al(OH)_3$, Montanide ISA 206 VG, Montanide ISA 201 VG, Complete Freund Adjuvant (CFA).

ELISA

RPLD ve DPLD ile sonuç değerlendirmesi

Çalışmada standardize edilerek geliştirilen ELISA'nın kaplamada kullanılan en uygun dPLD antijen konsantrasyonu 10 µg/ml çukur, serum sulandırması 1/ 400 olarak belirlendi. Aşıların etkinliğini değerlendirebilmek ve rPLD ve dPLD arasındaki yapısal benzerliği belirleyebilmek için, aynı serumlar kullanılarak hem rPLD ve hem de dPLD enzimleri ile ELISA yapılarak sonuçlar karşılaştırıldı. DPLD ile yapılan ELISA için Optik Dansite **(OD) 0.309**, rPLD ile yapılan ELISA için Optik Dansite **(OD) 0.101**'in yukarısında bulunan serum örnekleri pozitif olarak kabul edildi (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Aşılama sonrası ELISA ile ölçülen serum örnekleri sonuçları.

Test Antijeni →	**dPLD**						**rPLD**					
Örnekleme Günleri →	**0. gün**		**21. gün**		**43. gün**		**0. gün**		**21. gün**		**43. gün**	
Kuzu no →												
Aşı Tipi ↓	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
dPLD+CFA	0,212	0,22	**0,312**	0,307	**0,321**	**0,331**	0,075	0,09	**0,107**	**0,111**	**0,15**	**0,16**
dPLD+201 VG	0,208	0,21	**0,562**	**0,571**	**0,6**	**0,605**	0,063	0,72	0,075	0,085	**0,11**	**0,134**
dPLD+206 VG	0,223	0,241	**0,492**	**0,489**	**0,591**	**0,598**	0,046	0,04	0,058	0,072	0,06	0,083
dPLD+Al(OH)$_3$	0,199	0,211	0,298	0,301	0,3	0,305	0,041	0,06	0,043	0,044	0,04	0,061
Ticari Aşı	0,191	0,208	0,235	0,247	0,252	0,276	0,046	0,05	0,063	0,74	0,06	0,069
Kontrol	0,188	0,19	0,196	0,21	0,201	0,21	0,058	0,04	0,071	0,074	0,08	0,078

dPLD (doğal PLD), **rPLD** (rekombinant PLD). Kullanılan aşı tipleri; dPLD+Alüminyum hidroksit jel (Al(OH)$_3$), dPLD+Montanide ISA 206 VG, dPLD+Montanide ISA 201 VG, dPLD+Complete Freund Adjuvant (CFA).

Bu değerlendirmeye göre adjuvantın aşı üzerindeki etkisi, dPLD ve rPLD antijen benzerliği karşılaştırıldı. ELISA test sonuçlarına göre;

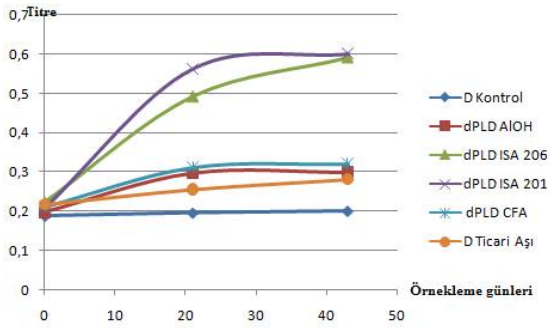
I ISA 201 VG, CFA ve ISA 206 VG ile hazırlanan dPLD aşı grubuna ait serumların, dPLD antijeni ile işlenmesi sonucuna göre cut off değerine göre pozitif olduğu, rPLD antijeni ile işlenmesi sonucunda ISA 206 VG aşı grubunun cut off değerine göre negatif olduğu,

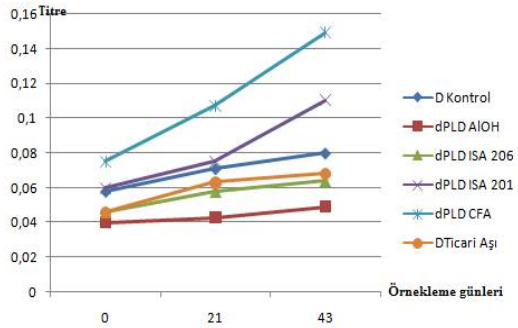
II ISA 201 VG ve ISA 206 VG ile hazırlanan dPLD aşısıyla aşılanan gruplara ait kuzularda serum titre değişiminin diğer gruplarla kıyaslandığında çok hızlı şekilde yükseldiği,

III Ticari aşı grubuna ait serum örneklerinin titre değişim grafiğine göre immun yanıtı uyarmadığı,

IV dPLD ile hazırlanan aşıların rPLD antijeni ile yapılan ELISA test sonucuna göre titrenin sağlıklı ölçülemediği,

V Ticari aşıyla aşılanan gruplara ait serum titre değişiminin, dPLD ve rPLD ile yapılan ELISA sonucuna göre immun yanıtın uyarılmadığı gözlendi (Şekil 3.21.1), (Şekil 3.21.2).





Şekil 3.21.1. dPLD ile titre ölçümü. **Şekil 3.21.2.** rPLD ile titre ölçümü.

dPLD (doğal PLD), **rPLD** (rekombinant PLD). Kullanılan aşı tipleri; dPLD+Alüminyum hidroksit jel ($Al(OH)_3$), dPLD+Montanide ISA 206 VG, dPLD+Montanide ISA 201 VG, dPLD+Complete Freund Adjuvant (CFA).

Her bir aşı grubunda 2 adet kuzu olması nedeniyle aşı grupları arasındaki fark belirlenemedi ve antijenik benzerliğin belirlenmesinde rPLD ve dPLD antijenleri kullanılarak çapraz deneme sonuçlarının ortalaması alınanarak istatistik analiz (Minitab) yapıldı ve **P= 0.000** (P<0,05) bulunarak gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu.

Paired T-Test and Confidence Interval

```
Paired T for  dPLD - rPLD

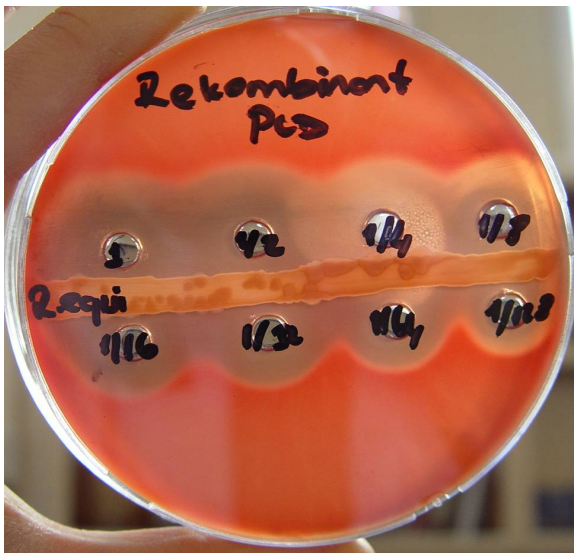
                N      Mean     StDev   SE Mean
dPLD           18    0,3209    0,1412    0,0333
rPLD           18    0,0684    0,0305    0,0072
Difference     18    0,2525    0,1394    0,0329

95% CI for mean difference: (0,1832; 0,3218)
T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 7,69  P-Value = 0,000
```

3.6.2. Rekombinant PLD Enzimi ile Aşı Çalışması Sonuçları

RPLD enziminin değerleri

Konsantrasyon sonrası protein miktarı Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23227) ile 23.1 mg/ml ölçüldü. rPLD ile aşılama öncesinde LD_{50} 2.89 mg/ml, Reverse CAMP testine göre son hemolitik titresi 1/256 olarak belirlendi (Şekil 3.22).

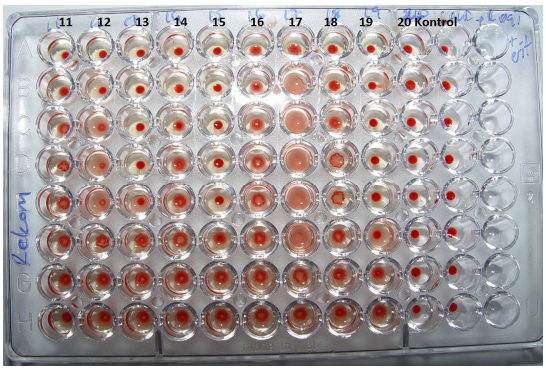


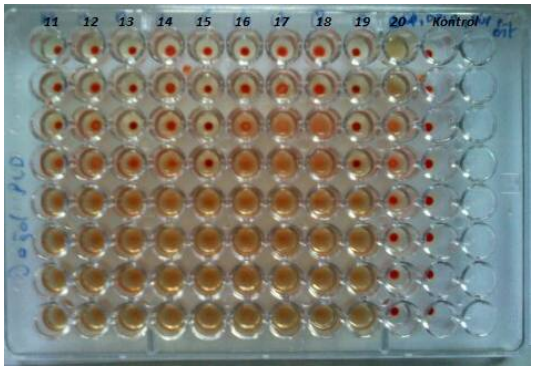
Şekil 3.22. Reverse CAMP test ile rPLD titresinin belirlenmesi.

Hemoliz inhibisyon test

RPLD ve DPLD ile sonuç değerlendirilmesi

RPLD enziminin HU ölçüm birimi 1/16 olarak belirlendikten sonra hemoliz inhibisyon testi yapıldı. Aşıların etkinliğini belirleyebilmek ve rPLD ve dPLD arasındaki yapısal benzerliği belirleyebilmek için, aynı serumlar kullanılarak hem rPLD ve hem de dPLD enzimleri ile hemoliz inhibisyon testi yapılarak sonuçlar karşılaştırıldı (Şekil 3.23) (Şekil 3.24) (Çizelge 3.4).





Şekil 3.23. rPLD ile test titre ölçümü.

Şekil 3.24. dPLD ile titre ölçümü.

Çizelge 3.4. Hemoliz inhibisyon test ile ölçülen serum örneklerinin sonuçları.

Test Antijeni →	**rPLD**						**dPLD**					
Örnekleme günleri →	**0. gün**		**21. gün**		**43. gün**		**0. gün**		**21. gün**		**43. gün**	
Kuzu Sayısı →												
Aşı Tipi ↓	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
rPLD+CFA	0	0	1/4	1/4	1/64	1/64	0	0	1/2	1/2	1/32	1/32
rPLD+ISA 201 VG	0	0	1/4	1/4	1/64	1/64	0	0	1/2	1/2	1/16	1/32
rPLD+ISA 206 VG	0	0	1/2	1/2	1/32	1/16	0	0	1/2	1/2	1/32	1/16
rPLD+Al(OH)$_3$	0	0	1/2	1/2	1/16	1/8	0	0	1/2	1/2	1/8	1/16
Ticari Aşı	0	0	1/2	1/2	1/8	1/8	0	0	1/2	1/2	1/16	1/16
Kontrol grup	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

dPLD (doğal PLD), **rPLD** (rekombinant PLD). Kullanılan aşı tipleri; rPLD+Alüminyum hidroksit jel (Al(OH)$_3$), rPLD+Montanide ISA 206 VG, rPLD+Montanide ISA 201 VG, rPLD+Complete Freund Adjuvant (CFA).

Bu değerlendirmeye göre adjuvantın aşı üzerindeki etkisi, dPLD ve rPLD antijen benzerliği karşılaştırıldı. Hemoliz İnhibisyon test sonuçlarına göre;

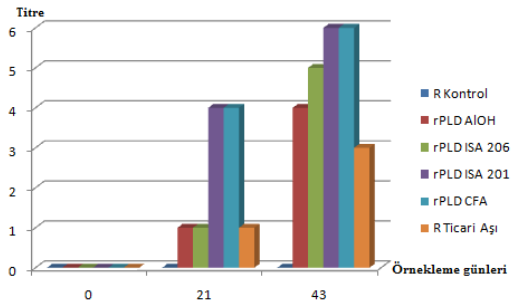
I rPLD ile hazırlanan 2 farklı CFA ve ISA 201 VG aşı grubunun uyarım gücünün aynı ve diğer aşılardan daha etkili olduğu

II ISA 206 VG ile hazırlanan rPLD aşısının immun sistemi uyarım gücünün ticari aşı ve Al(OH)$_3$ ile hazırlanan rPLD aşısından immun sistemi uyarım gücünün daha yüksek olduğu

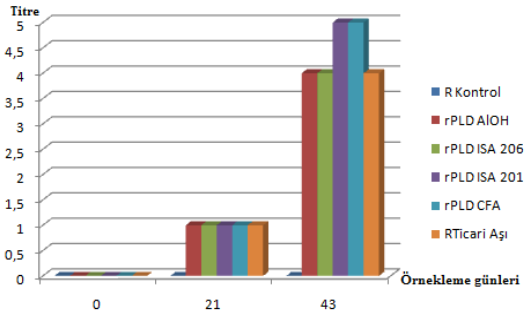
III Ticari aşıyla aşılı gruba ait veriler diğer aşı grupları ile karşılaştırıldığında daha düşük düzeyde immun yanıtı uyardığı

IV CFA ve ISA 206 VG ile hazırlanan rPLD aşılarının immun sistemi uyarım gücünün aynı olmasına karşın, dPLD ile hemoliz inhibisyon ölçümlerinde titrenin düştüğü ve diğer adjuvantlar ile hazırlanan aşılardan ve ticari aşıdan immun sistemi daha etkili şekilde uyardığı

V Kontrol grubu serumları titrelerinin rPLD ve dPLD ile hemoliz inhibisyon test sonuçlarının farklı olduğu gözlendi (Şekil 3.25.1) (Şekil 3.25.2)



Şekil 3.25.1. rPLD ile titre ölçümü.



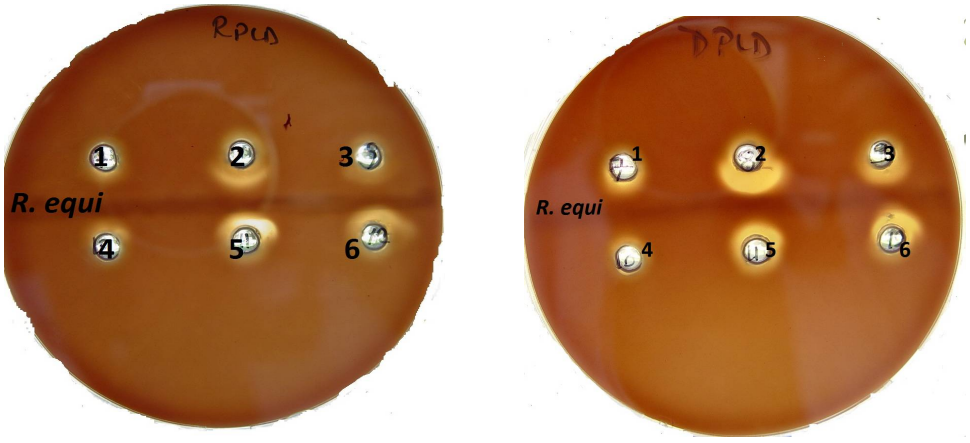
Şekil 3.25.2. dPLD ile titre ölçümü.

dPLD (doğal PLD), **rPLD** (rekombinant PLD). Kullanılan aşı tipleri; rPLD+Alüminyum hidroksit jel ($Al(OH)_3$), rPLD+Montanide ISA 206 VG, rPLD+Montanide ISA 201 VG, rPLD+Complete Freund Adjuvant (CFA).

Agar Serum Nötralizasyon Test

RPLD ve DPLD ile sonuç değerlendirmesi

Aşıların etkinliğini değerlendirebilmek ve rPLD ve dPLD arasındaki yapısal benzerliği belirleyebilmek için, aynı serumlar kullanılarak hem rPLD ve hem de dPLD enzimleri ile agar serum nötralizasyon testi yapılarak sonuçlar karşılaştırıldı (Şekil 3.26) (Çizelge 3.5).



Şekil 3.26. Agar serum nötralizasyon test sonuçları rPLD antijeni ve dPLD antijeni ile titre ölçümü.

Çizelge 3.5. Agar serum nötralizasyon test ile ölçülen serum örnekleri sonuçları.

Test antijeni →	**rPLD**						**dPLD**					
Örnekleme günleri →	**0. gün**		**21. gün**		**43. gün**		**0. gün**		**21. gün**		**43. gün**	
Kuzu No →	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
Aşı Tipi ↓												
rPLD+CFA	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	4	4
rPLD+ISA 201 VG	0	0	1	1	3	4	0	0	1	1	3	3
rPLD+ISA 206 VG	0	0	1	1	4	4	0	0	1	1	4	3
rPLD+Al(OH)$_3$	0	0	1	1	4	4	0	0	1	1	3	3
Ticari Aşı	0	0	1	1	3	3	0	0	1	1	2	2
Kontrol grup	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0

dPLD (doğal PLD), **rPLD** (rekombinant PLD). Kullanılan aşı tipleri; rPLD+Alüminyum hidroksit jel (Al(OH)$_3$), rPLD+Montanide ISA 206 VG, rPLD+Montanide ISA 201 VG, rPLD+Complete Freund Adjuvant (CFA).

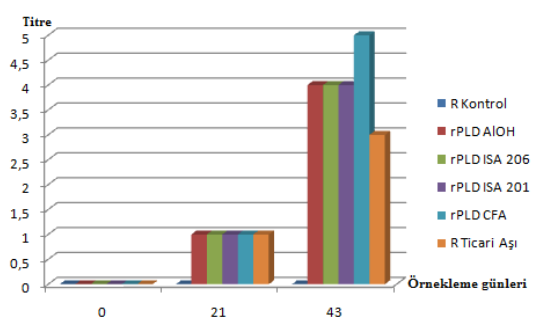
Bu değerlendirmeye göre adjuvantın aşı üzerindeki etkisi, dPLD ve rPLD antijen benzerliği karşılaştırıldı Agar Serum Nötralizasyon test sonuçlarına göre;

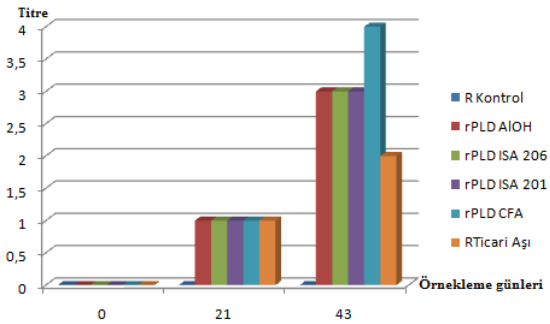
I CFA ile hazırlanan rPLD aşısının immun sistemi uyarım gücünün, diğer aşı gruplarına göre daha etkili olduğu

II ISA 206 VG, ISA 201 VG ve $Al(OH)_3$ ile hazırlanan rPLD aşılarının immun sistemi uyarabilidiği

III Ticari aşıyla aşılı gruba ait serumların titre değişimi değerlendirildiğinde, diğer adjuvantlar ile hazırlanan aşı gruplarına göre daha zayıf bağışıklık düzeyini uyardığı

V ISA 201 VG, ISA 206 VG ve $Al(OH)_3$ ile hazırlanan rPLD aşısının immun sistemi uyarım gücünün ticari aşıdan daha etkili olmasına karşın, dPLD ile agar serum nötralizasyon test ölçümlerinde titrenin düştüğü (Şekil 3.27.1) (Şekil 3.27.2).





Şekil 3.27.1 rPLD ile titre ölçümü **Şekil 3.27.2** dPLD ile titre ölçümü **dPLD** (doğal PLD), **rPLD** (rekombinant PLD). Kullanılan aşı tipleri; rPLD+Alüminyum hidroksit jel ($Al(OH)_3$), rPLD+Montanide ISA 206 VG, rPLD+Montanide ISA 201 VG, rPLD+Complete Freund Adjuvant (CFA).

ELISA

RPLD ve DPLD ile sonuç değerlendirmesi

Çalışmada standardize edilerek geliştirilen ELISA'nın kaplamada kullanılan en uygun rPLD antijen konsantrasyonu 10 µg/ml çukur, serum sulandırması 1/ 400 olarak belirlendi. Aşıların etkinliğini değerlendirebilmek ve rPLD ve dPLD arasındaki yapısal benzerliği belirleyebilmek için, aynı serumlar kullanılarak hem rPLD ve hem de dPLD enzimleri ile ELISA yapılarak sonuçlar karşılaştırıldı. rPLD ile yapılan ELISA için OD 0.091'in, dPLD ile yapılan ELISA için OD 0.089 yukarısında bulunan serum örnekleri pozitif olarak kabul edildi (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Aşılama sonrası ELISA ile ölçülen serum örnekleri sonuçları.

Test Antijeni →	**rPLD**						**dPLD**					
Örnekleme günleri →	**0. gün**		**21. gün**		**43. gün**		**0. gün**		**21. gün**		**43. gün**	
Kuzu no →	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
Aşı Tipi ↓												
rPLD+CFA	0,05	0,06	**0,177**	**0,183**	**0,201**	**0,212**	0,070	0,076	**0,143**	**0,148**	**0,150**	**0,162**
rPLD+201 VG	0,078	0,083	**0,148**	**0,155**	**0,245**	**0,250**	0,055	0,071	0,075	0,071	0,080	0,081
rPLD+206 VG	0,083	0,061	**0,164**	**0,163**	**0,183**	**0,194**	0,046	0,051	0,063	0,062	0,056	0,075
rPLD+Al(OH)$_3$	0,090	0,087	**0,102**	**0,111**	**0,122**	**0,129**	0,040	0,048	0,043	0,055	0,049	0,065
Ticari Aşı	0,075	0,088	0,072	0,081	0,072	0,080	0,067	0,073	0,063	0,076	0,057	0,053
Kontrol	0,068	0,072	0,071	0,076	0,080	0,078	0,050	0,060	0,071	0,072	0,053	0,055

dPLD (doğal PLD), **rPLD** (rekombinant PLD). Kullanılan aşı tipleri; rPLD+Alüminyum hidroksit jel (Al(OH)$_3$), rPLD+Montanide ISA 206 VG, rPLD+Montanide ISA 201 VG, rPLD+Complete Freund Adjuvant (CFA).

Bu değerlendirmeye göre adjuvantın aşı üzerindeki etkisi, dPLD ve rPLD antijen benzerliği karşılaştırıldı. ELISA testi sonuçlarına göre;

I CFA, ISA 201 VG, ISA 206 VG ve Al(OH)$_3$ ile hazırlanan rPLD aşısının immun sistemi etkili şekilde uyardığı ve ELISA sonucuna göre pozitif olduğu

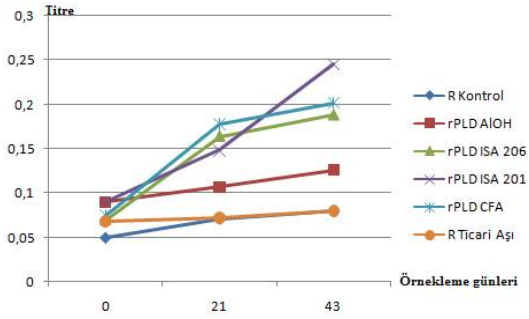
II ISA 201 VG ile hazırlanan rPLD aşısı ile aşılı gruplara ait serumlarda titre değişim grafiği değerlendirildiğinde, titrenin diğer aşı grupları örneklemelerine göre daha hızlı yükseldiği, immun yanıt uyarım düzeyini daha etkili uyardığı

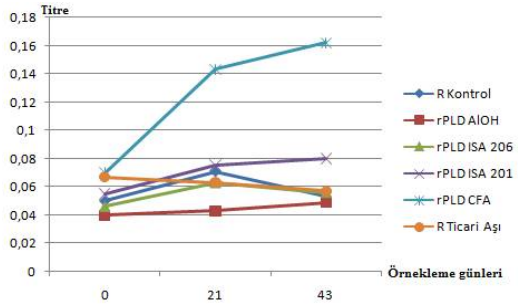
III ISA 206 VG ve CFA ile hazırlanan rPLD aşısıyla aşılı grupların titre değişimleri değerlendirildiğinde immun sistemi yakın düzeyde uyardığı

V Ticari aşıyla aşılı hayvanlarda immun yanıt uyarım düzeyinin etkili olmadığı ve hayvanlarda yeterli düzeyde bağışıklık sağlanamadığı

VI ISA 201 VG, ISA 206 VG ve $Al(OH)_3$ ile hazırlanan rPLD aşı grubu rPLD ile yapılan ELISA'da pozitif bulunmasına karşın, dPLD ile yapılan ELISA sonucuna göre negatif olduğu

VII rPLD ile hazırlanan aşıların dPLD ile yapılan ELISA test sonucuna göre titrenin sağlıklı ölçülemediği gözlendi (Şekil 3.28.1), (Şekil 3.28.2).





Şekil 3.28.1. rPLD ile titre ölçümü. **Şekil 3.28.2.** dPLD ile titre ölçümü.

dPLD (doğal PLD), **rPLD** (rekombinant PLD). Kullanılan aşı tipleri; rPLD+Alüminyum hidroksit jel ($Al(OH)_3$), rPLD+Montanide ISA 206 VG, rPLD+Montanide ISA 201 VG, rPLD+Complete Freund Adjuvant (CFA).

Her bir aşı grubunda 2 adet kuzu olması nedeniyle aşı grupları arasındaki fark belirlenemedi ve antijenik benzerliğin belirlenmesinde rPLD ve dPLD antijenleri kullanılarak çapraz deneme sonuçlarının ortalaması alınanarak istatistik analiz (Minitab) yapıldı ve **P= 0.000** (P<0,05) bulunarak gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu.

Paired T-Test and Confidence Interval

Paired T for rPLD - dPLD

	N	Mean	StDev	SE Mean
rPLD	18	0,0701	0,0277	0,0065
dPLD	18	0,1146	0,0576	0,0136
Difference	18	-0,0444	0,0454	0,0107

95% CI for mean difference: (-0,0670; -0,0219)
T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -4,15 P-Value = 0,001

3.8. Farelerde Çelınç ve Seropotens Guplarınının Değerlendirilmesi

3.8.1. Agar Serum Nötralizasyon Test

Seropotens grubu sonuçları

Çalışmada kullanılan 9 adet farklı aşı ile aşılanan seropotens grubu farelerinin aşıya karşı şekillenen anti-PLD IgG oluşumlarının agar serum nötralizasyon test ile değerlendirilme sonuçlarına göre; dPLD+CFA aşısı ile rPLD+CFA ve rPLD+ISA 201 VG aşı gruplarının diğer aşı gruplarına göre antikor oluşumunu daha hızlı ve etkili uyardığı belirlendi (Çizelge 3.7), (Şekil 3.29.1), (Çizelge 3.8), (Şekil 3.29.2).

Çizelge 3.7. dPLD ile titre ölçümü.

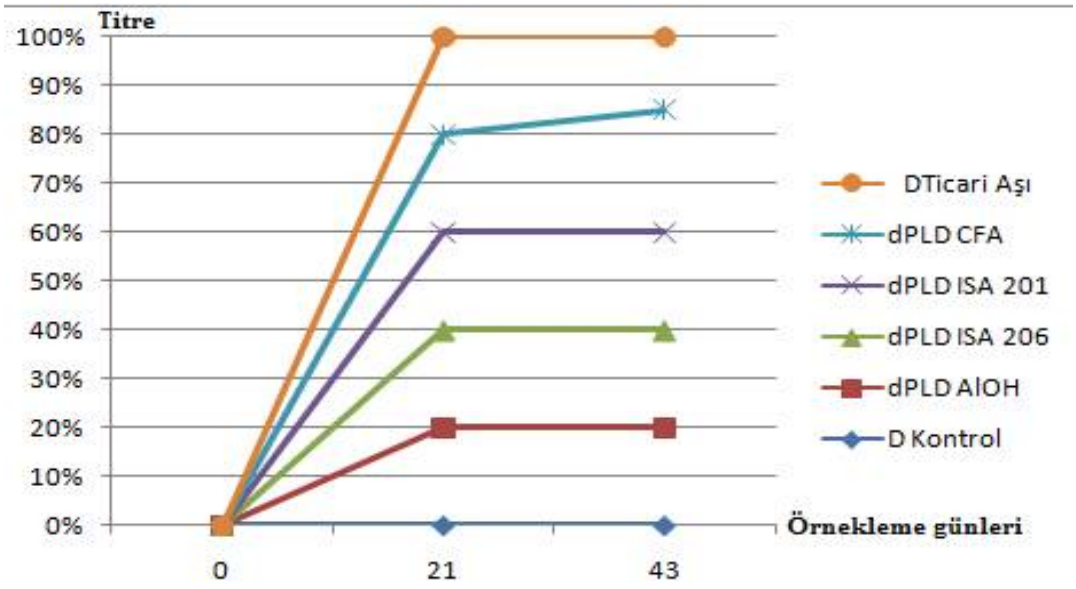
Test antijeni →	**dPLD**		
Örnekleme günleri →			
Aşı Tipi ↓	0	21	43
D Kontrol	0	0	0
dPLD+AlOH	0	1	4
dPLD+ISA 206	0	1	4
dPLD+ISA 201	0	1	4
dPLD+CFA	0	1	5
D Ticari Aşı	0	1	3

dPLD (doğal PLD). Kullanılan aşı tipleri;
dPLD+Alüminyum hidroksit jel ($Al(OH)_3$), dPLD+Montanide ISA 206 VG, dPLD+Montanide ISA 201 VG, dPLD+Complete Freund Adjuvant (CFA).

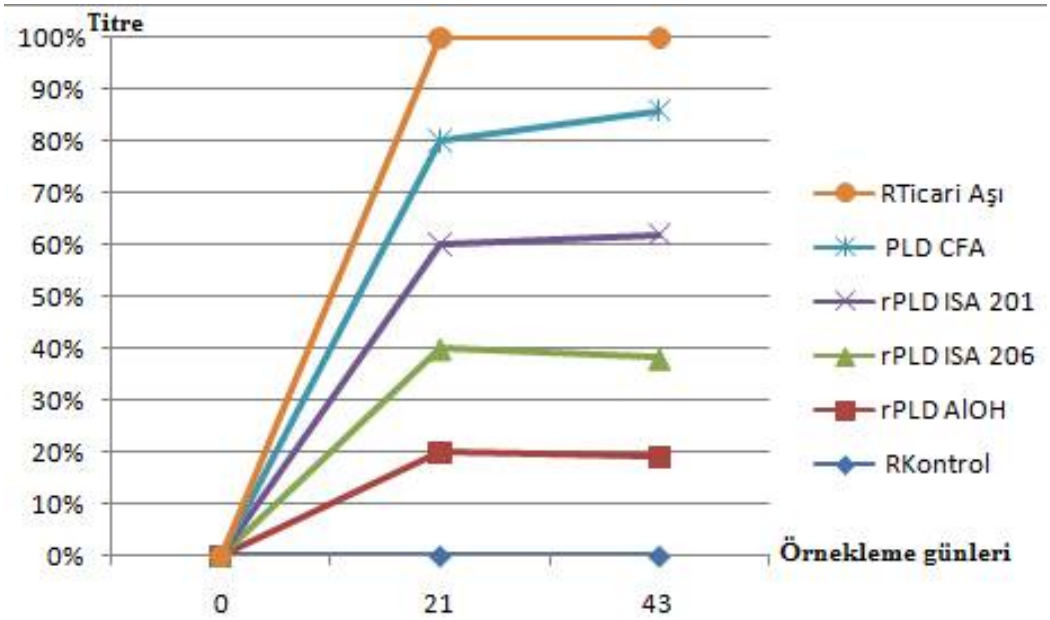
Çizelge 3.8: rPLD ile titre ölçümü.

Test antijeni →	**rPLD**		
Örnekleme günleri →			
Aşı Tipi ↓	0	21	43
R Kontrol	0	0	0
rPLD AlOH	0	1	4
rPLD ISA 206	0	1	4
rPLD ISA 201	0	1	5
rPLD CFA	0	1	5
R Ticari Aşı	0	1	3

rPLD (doğal PLD). Kullanılan aşı tipleri;
rPLD+Alüminyum hidroksit jel ($Al(OH)_3$), rPLD+Montanide ISA 206 VG, rPLD+Montanide ISA 201 VG, rPLD+Complete Freund Adjuvant (CFA).



Şekil 3.29.1. dPLD ile titre ölçümü. dPLD (doğal PLD). Kullanılan aşı tipleri; dPLD+Alüminyum hidroksit jel ($Al(OH)_3$), dPLD+Montanide ISA 206 VG, dPLD+Montanide ISA 201 VG, dPLD+Complete Freund Adjuvant (CFA).



Şekil 3.29.2. rPLD ile titre değişim grafiği. **rPLD** (doğal PLD). Kullanılan aşı tipleri; rPLD+Alüminyum hidroksit jel ($Al(OH)_3$), rPLD+Montanide ISA 206 VG, rPLD+Montanide ISA 201 VG, rPLD+Complete Freund Adjuvant (CFA).

Çelınç grubu sonuçları

Çelınç denemesinde canlı *C. pseudotuberculosis*'in LD_{50} değeri 3.6×10^5 bakteri/ml belirlendi. dPLD, rPLD, ticari aşı ile aşılanan ve sonrasında *C. pseudotuberculosis* ile çelıncı yapılan ve uyutulan farelerin iç organlarının

mikrobiyolojik yoklamasında; ticari aşı ile çelıncı yapılan ticari aşı grubunda 2 adet farenin akciğerinden ve 2 adet farenin karaciğerinden, $Al(OH)_3$ ile kombine edilen dPLD aşı grubundan 1 adet farenin böbreğinden, 1 adet farenin akciğerinden ve rPLD aşı grubundan 1 adet farenin karaciğerinden ve 1 adet farenin böbreğinden, CFA ile kombine edilen dPLD aşı grubunda 2 adet farenin enjeksiyon yerinde nekroz ve 1 adet farenin karaciğerinden, CFA ile kombine edilen rPLD aşı grubunda 1 adet farenin enjeksiyon yerinde nekroz ve 1 adet farenin böbreğinden, Montanide ISA 206 VG ile kombine edilen dPLD aşı grubunda 2 adet farenin enjeksiyon yerinde nekroz ve 1 adet farenin akciğerinden, rPLD aşı grubunda 1 adet farenin enjeksiyon yerinde nekroz ve 1 adet farenin böbreğinden, ticari aşı grubunda 2 adet farenin karaciğer ve böbreğinden etken izolasyonu yapıldı (Bkz. EK-B. 7.5). Montanide ISA 201 VG ile kombine edilen dPLD ve rPLD aşı grubundaki farelerin iç organlarından etken izolasyonu yapılmadı (Çizelge 3.9). Ticari aşı grubunda 2 adet farede ve $Al(OH)_3$ ile kombine edilen dPLD ve rPLD aşı gruplarında 1'er adet farede ve her aşı için ayrılan farelerin aşı kontrol grubundaki 4 adet farede hastalık ve ölüm belirlendi (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.9. *C. pseudotuberculosis* ile Çelınç Yapılan Aşılı Farelerde İç Organların Mikrobiyolojik Sonuçları

Aşı Tipleri	**dPLD+CFA**		**dPLD+ISA 201**		**dPLD+ISA 206**		**dPLD+Al(OH)$_3$**		**rPLD+ CFA**		**rPLD+ ISA 201**		**rPLD+ ISA 206**		**rPLD+ Al(OH)$_3$**		**Ticari Aşı**	
Grup → İç organlar↓	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**
Kalp	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Akciğer	0/4	3/4	0/4	3/4	1/4	3/4	1/4	3/4	0/4	3/4	0/4	3/4	0/4	3/4	0/4	3/4	0/4	3/4
Karaciğer	1/4	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4	1/4	4/4	2/4	4/4
Dalak	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Böbrek	0/4	3/4	0/4	3/4	0/4	3/4	1/4	3/4	1/4	3/4	0/4	3/4	1/4	3/4	1/4	3/4	2/4	3/4
Toplam	1/20	10/20	0/20	10/20	1/20	10/20	2/20	10/20	1/20	10/20	0/20	10/20	1/20	10/20	2/20	10/20	4/20	10/20

Aşı tipleri; dPLD+CFA, dPLD+ISA 201, dPLD+ISA 206, dPLD+Al(OH)$_3$, rPLD+CFA, rPLD+ISA 201, rPLD+ISA 206, rPLD+Al(OH)$_3$, Ticari Aşı (Glanvac3, Phizer)

Çizelge 3.10. Aşılı farelerde *C. pseudotuberculosis* ile Çelınç Sonrası Hastalık ve Ölüm Oranları

Aşı Tipleri	**dPLD+CFA**		**dPLD +ISA 201**		**dPLD +ISA 206**		**dPLD + Al(OH)$_3$**		**rPLD+CFA**		**rPLD+ ISA 201**		**rPLD+ ISA 206**		**rPLD+ Al(OH)$_3$**		**Ticari Aşı**	
Gruplar	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**	**Aşı**	**Kontrol**
Morbidite	1/4 %75	4/4 %0	0/4 %100	4/4 %0	1/4 %75	4/4 %0	1/4 %75	4/4 %0	1/4 %75	4/4 %0	0/4 %100	4/4 %0	1/4 %75	4/4 %0	1/4 %75	4/4 %0	2/4 %50	4/4 %0
Motalite	0/4 %100	4/4 %0	0/4 %100	4/4 %0	1/4 %75	4/4 %0	1/4 %75	4/4 %0	0/4 %100	4/4 %0	0/4 %100	4/4 %0	1/4 %75	4/4 %0	1/4 %75	4/4 %0	2/4 %50	4/4 %0

Aşı tipleri; dPLD+CFA, dPLD+ISA 201, dPLD+ISA 206, dPLD+Al(OH)$_3$, rPLD+CFA, rPLD+ISA 201, rPLD+ISA 206, rPLD+Al(OH)$_3$, Ticari Aşı

Bu sonuçlara göre; 9 farklı aşı içerisinde en etkili aşı formulasyonlarının rPLD+ ISA 201 VG ve dPLD+ ISA 201 VG olduğu ve bu aşıların **%100** koruyuculuk sağladığı belirlendi.

4. TARTIŞMA

C. pseudotuberculosis'in neden olduğu KLA, özellikle koyun ve keçilerde periferal lenf düğümleri, deri altı dokular ve iç organlarda apse oluşumu ile karakterize bir zoonoz, kronik bir enfeksiyondur. Etkenin hücre içi patojen olması ve konakçıya invazyonu sonrası, immün sistemin yok edici etkisinden kurtulmak için kapalı duvarlı kapsüller oluşturması sebebiyle hastalığın antibiyotik ile tedavisinde etkili yöntem bulunamamıştır (Freire ve ark 2008, Baird ve Fontaine 2007). Tedavi şansının düşük olmasından dolayı enfeksiyonun bir sürüdeki koyunların çoğunluğuna bulaşması söz konusu olmaktadır (Batey 1986, Paton ve ark 1988, Valli ve Parry 1993).

KLA kalitesiz yün oluşumu, süt ve et üretiminde düşme, üreme bozuklukları, erken doğum ve karkasların kullanılamamasına neden olmasından dolayı küçük ruminantlarda belirgin ekonomik kayıplar oluşturmaktadır (Paton ve ark 2003, O'Reilly ve ark 2008). Koyunculuğun yaygın olarak yapıldığı bölgelerde enfeksiyona sıklıkla rastlanılmaktadır. Bununla beraber insan, at, sığır ve develerde de enfeksiyona rastlanılmaktadır (Esterabadi ve ark 1975, Peel ve ark 1997, Doherr ve ark 1998). Çiftlik ve kesimhane çalışanlarında da enfeksiyon riski bulunmaktadır (Peel ve ark 1997). Etkenin süte geçmesinden dolayı, enfekte hayvanların işlem görmemiş süt ve süt ürünleri ile insanlara bulaşması bakımından hastalığın önemi fazladır (Yeruham ve ark 1997).

Ankara bölgesinde bulunan Saanen keçilerinde KLA enfeksiyonu ile ilgili yapılan klinik, bakteriyolojik, sitolojik, histopatolojik ve serolojik araştırmalar sonucunda Türkiye'de de KLA enfeksiyonuna yönelik kontrol programlarının uygulanmasının gerekliliği bildirilmiştir (Ural ve ark 2008).

Türkiye'de dahil olmak üzere bir çok ülkede hastalık tam olarak belirtilmediği için gerçek prevalansı daha düşük olarak bildirilmektedir. Hayvan sahiplerinin, KLA'nın ciddi ekonomik kayıplara sebep olmasının farkında olmamalarından dolayı enfeksiyonun kontrolüne gereken önem verilmemekte ve bu duruma paralel olarak gerekli kontrol programları uygulanmamaktadır. Bununla birlikte, tahmini olarak %8-90 arasında enfeksiyonun görüldüğü tahmin edilmektedir

(Erganiş ve ark 1990,Çetinkaya ve ark 2002, Al-Gaabary ve ark 2009, Guimaraes ve ark 2009, Seyffert ve ark 2010).

Ülkemizde bildirimi zorunlu hastalıklar listesinde bulunmamasının yanısıra Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün hastalığın azaltılmasına ve/veya eradikasyonuna yönelik çalışması da bulunmamaktadır.

PLD toksininin komplement sistemini aktive ettiği bilinmekle beraber tam mekanizması henüz anlaşılamamıştır (Muckle ve Gyles 1986). Düşük dozlarda fare ve tavşan gibi deney hayvanlarında dermonekrotik etkiye sahip olan PLD'nin, yüksek dozlarda deney hayvanlarının yanı sıra kuzu ve koyunlarda da letal etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Alansonve ark 1992, Hsu ark 1985). Hastalığın ileri dönemlerinde görülen anemi ve kaşeksi tablosunun oluşumunda ekzotoksinin önemli rolleri olduğu ifade edilmiştir (Hsu ve ark 1985). PLD ekzotoksininin yapısının ve karakterizasyonunun anlaşılması üzerine rekombinant PLD toksininin sentezi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Egen ve ark 1989, Hongson ve ark 1990, McNamara ve ark 1995).

4.1. Sekans Sonuç Değerlendirilmesi

Farklı *C. pseudotuberculosis* suşlarına ait ekzotoksin örneklerinin antijenik bakımdan benzer oldukları bildirilmiştir (Doty 1964). Bununla birlikte sentezlenen toksinin miktarı ve oluşan lezyonların büyüklükleri bakımından, suşlar arasında farklılıkların olduğu ifade edilmektedir (Sutherland ve ark 1989).

dPLD ve NCBI'nin dizi analizi karşılaştırmasından %99.7 oranında baz dizilimi benzer bulundu. Farklılık 449. ve 450. bazlarda olduğu ve baz değişiminin; saha suşu olan *C. pseudotuberculosis*'in PLD genine ait baz dizilim farkından; kullanılan taq polimeraz enzimine bağlı mutasyondan veya sekans açılımına yönelik kullanılan programlardan olabileceği düşünüldü. NCBI'ın 181. amino asitinin Valin, dPLD ve rPLD'nin Trozin olmasının ise, saha suşuna bağlı amino asit farklılığına bağlı yada klonlama esnasında kullanılan taq polimeraza bağlı bir durum olabileceği düşünüldü. Dizi analizi karşılaştırmaları sonucunda, rPLD ve dPLD enziminin %5 koyun kanı içeren kanlı agarda *R. equi* ile sinerjistik etkileşimle eritrositi hemolize ettiği, etkinliklerinin aynı seviyede olması, rPLD ve dPLD enzimlerinin hemolitik

etkinlikleri 1/256 olması, aşılama ve çelınç sonrası başarılı sonuç alınması ise; PLD proteinin işlevselliğini etkilemediği kanaatine varıldı.

4.2. Rekombinant PLD Sentezi

E.coli'de rekombinant protein sentezi esnasında en büyük problem yüksek oranda çözünmeyen protein sentezinin olmasıdır. Çözünmeyen protein oluşumunun engellenmesi için ısı, sentetik uyaran konsantrasyonu ve promotor gücünün uygun düzeyde ayarlanması çözünebilir protein sentezi yüzdesinin arttırılmasında önemli rol oynamaktadır. Hücresel toksisite ve inklüzyon form, rekombinant protein sentezinin çözünebilir formda supernatantta bulunma yüzdesini düşürdüğü ve verimi azalttığı bildirilmiştir (Jeffrey ve ark 1996). Rekombinant protein sentezindeki sorunları aşmak amacı ile birçok kompetan bakteri sistemi geliştirilmiştir (Baneyx 1999, Georgiou ve Valax 1996).

Farklı vektör tiplerinin, taşıyıcı bakteri olarak da *E. coli* alt tiplerinin ve rekombinant PLD sentezletilmesinde LB sıvıbesiyerinin kullanıldığı rekombinant PLD üretimine yönelik çalışmalarda; Songer ve ark (1990), çözünebilir formda rekombinant PLD enzimini düşük miktarda elde ettiklerini, Adrian ve ark (1990), hücre içerisinde sentezlenen çözünmeyen formda rekombinant PLD enzimini ürettiklerini, Fontaine ve ark (2006) çözünmeyen formda rekombinant PLD enzimini sentezlettiklerini bildirmişlerdir.

Çalışmada yüksek miktarda çözünebilir rPLD eldesinde; kullanılan besiyeri bileşiminin, son IPTG konsantrasyonunun, indükleme süresinin, inokülasyon miktarının, vektöre bağlı rPLD ile beraber sentezlenen SUMO proteinde olması etkili olduğu düşünüldü.

4.3. Antijen Farklılığına Göre Humoral Bağışıklığın Değerlendirilmesi

C. pseudotuberculosis'e karşı koyunlarda şekillenen antikorların teşhisinde hemoliz inhibisyon test, immunodifüzyon test (Burrell 1980), indirek hemaglütinasyon test, anti-hemoliz inhibisyon test, komplement fikzasyon test (Shigidi 1979), ELISA (Sutherland ve ark 1987, Binns ve ark 2007) gibi serolojik testler kullanılmıştır.

Binns ve ark (2007) tarafından, *C. pseudotuberculosis*'e karşı şekillenen IgG antikorlarının ELISA ile ölçümünde kullanılacak negatif serumların güvenilirliliği açısından, negatif serumların elde edileceği kuzuların 10 aylık olanlarının tercih edilmesinin gerektiği ve KLA enfeksiyonun subklinik olarak seyredebileceği ve yanlış negatiflikle karşılaşılabileceği bildirilmiştir.

Anti-PLD antikorlarının araştırılmasına yönelik ELİSA uygulamasında; Sutherland ve ark (1987) tüm hücre duvarı, ter Laak ve ark (1992) doğal PLD, Dercksen ve ark (2000) üst sıvıda bulunan PLD, Maki ve ark (1985) rekombinant ekzotoksin (Menzies ve ark 1994) antijenleri ile özel antikorların tespitine yönelik uygulama yapmışlardır (Binns ve ark 2007).

Menzies ve ark (1994) tarafından, *C. pseudotuberculosis*'e karşı şekillenen humoral bağışıklığın ölçülmesinde kullanılan testler içerisinde sonucu açısından en güvenilir yöntemin *E. coli*'de eksprese ettirilen rekombinant PLD antijenine dayalı ELISA olduğu belirtilmiştir.

Paton ve ark (2003) tarafından, ticari KLA aşısı ile yapılan araştırmaya göre; çiftlik hayvanlarının %43'üne uygulandığı ve bu uygulamalarında %12'sine doğru şekilde yapıldığı bildirilmiştir. Aşılama programına riayet edilmesi halinde KLA enfeksiyonunu prevalansının önemli oranda azaltıldığı belirtilmiştir (Dorella ve ark 2006).

Hodgson ve ark (1992) tarafından, KLA enfeksiyonuna karşı genomundan PLD geni çıkartılan *C. pseudotuberculosis* formu olan Toxminus (Rekombinant *C. pseudotuberculosis*) ve saha suşundan hazırlanan aşı ile aşılı 9 aylık kuzuların aşılanması elde edilen veriler sonucunda; Toxminus çelınç denemesinin başarısının, PLD genini barındıran *C. pseudotuberculosis* çelınç denemesi başarısından daha düşük olduğu ve PLD toksininin önemli bir virülens faktörü olduğu bildirilmiştir.

Hodgson ve ark (1994) tarafından, *C. pseudotuberculosis*'in PLD'si ile hazırlanan aşının koruyuculuğunun %100, Toxminus ile hazırlanan aşının koruyuculuğunun %50, aşılanmamış gruptaki koyunlarda %66 oranında KLA enfeksiyonu bulgularına rastlandığı bildirilmiştir. Hodgson ve ark (1999) tarafından, mutant PLD geni içeren Toxminus ile aşılı koyunlarda aşının % 44 koruyuculuğunun olduğu belirtilirken, formalinle inaktif farklı PLD aşısı ile aşılı koyunlarda aşının

%95 daha etkili koruma sağladığı bildirilmiştir. Dorella ve ark (2006) tarafından, Brezilya menşeili aşı üretim merkezi tarafından 2000 yılından itibaren, atenue canlı *C. pseudotuberculosis* 1002 suşu kullanılarak üretilen lisanslı aşı bulunmaktadır. Aşının keçiler üzerinde KLA enfeksiyonundan korumaya yönelik yapılan araştırmalar sonucunda %83 koruma sağladığı bildirilmiştir

Fontaine ve ark (2006) tarafından, rekombinant PLD (rPLD) ve inaktif tüm *C. pseudotuberculosis* antijenleri (WC) ile hazırlanan iki farklı aşı ve Glanvac^{TM} ile aşılanan 1 yaşında kuzu grupları üzerinde aşı etkinliklerinin belirlemek amacı ile çelınç denemesi yapılmıştır. Aşıların koruyuculuğunun olduğu ve saçılımın engellendiği ancak rPLD, WC, Glanvac^{TM} ile aşılı kuzuların serumlarındaki bağışıklık seviyesi karşılaştırıldığında ise; rPLD, WC karşı oluşan antikor seviyesinin Glanvac^{TM} karşı oluşan antikor seviyesinden daha yüksek olduğu ve hızlı seyir izlediği belirtilmiştir

Yapılan aşılama modellerinde 1972 yılından itibaren sıklıkla inaktif bakterin (Cp) lerin farklı adjuvantlar ile kombine edilerek kullanıldığı görülmektedir. Geliştirilmiş olan aşıların koruma gücünün değişkenlik gösterdiği enfeksiyona karşı %100 koruma sağlanamadığı ancak irinli lenf nodülü sayısını azalttığı belirtilmiştir (Bastos ve ark 2012). PLD toksini ile ilgili farklı aşı kombinasyonları yapılmış olup etkinlikleri karşılaştırılarak, koyun ve keçilerde kullanılabilinecek en etkili aşı kombinasyonunun bulunması hedeflenmiştir (Eggleton ve ark 1991). Özellikle, KLA enfeksiyonundan korunmaya yönelik aşı çalışmalarında PLD saf halde veya *E. coli*'de eksprese edilerek kullanılmıştır (Egen ve ark 1989, Hongson ve ark 1990, McNamara ve ark 1995). Bazı çalışmalarda ekzotoksin formalin ile inaktivasyonu sonrasında konsantrasyonu ile toksoid aşı formları geliştirilmiştir. Toksoid aşıya karşı gelişen antikor seviyesi ELISA ile ölçülerek bağışıklığın oluştuğu, koyunlarda saçılımın engellediği gözlemlenmiştir (Brown ve ark 1986, Eggleton ve ark 1991, Paton ve ark 1995, Alves ve Olander 1999).

Bastos ve ark (2012) tarafından, Avustralya'da 1983 yılından beri ticari formda aşı kullanılmasına rağmen, ülkede KLA enfeksiyonunun prevalansı 2002'de yaklaşık olarak %20 civarında görüldüğü bildirilmiştir. Günümüze kadar *C. pseudotuberculosis*'in neden olduğu KLA enfeksiyonuna karşı çeşitli aşı formları geliştirilmiş olup ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen %100 koruyan aşı formu

bulunamamıştır ve farklı denemeler yapılmaya devam edilmektedir. *C. pseudotuberculosis*'in fakültatif hücre içi patojen olması sebebiyle, KLA enfeksiyonuna karşı korumada INF-γ üretimi ve sitotoksik T hücrelerine bağlı bağışıklık temel rol oynamaktadır. Aşılama sonrası oluşan humoral immun yanıt oluşumunun enfeksiyondan korunmada yetersiz kaldığı belirtilmiştir

KLA'nın kontrolünde izlenilecek yol hala tartışmalı olmakla beraber, enfeksiyona bağlı ekonomik zararların ve bakteri saçılımınının azaltılmasında en etkili yolun aşılama olduğu bildirilmektedir (Baird ve Fontaine 2007, Erganiş 2010, Erganiş ve ark 2012). Aşılama sonrasında bağışıklık düzeyinin yükselmesi ile etken saçılımının azaltılması ve hastalığın prevalansının düşürülmesi amaçlanmaktadır. Ancak KLA enfeksiyonuna yönelik etkin aşının bulunmaması sebebiyle enfeksiyona hedef hayvanlarda sıklıkla rastlanmaya devam edilmektedir (Hodgson ve ark 1999, Fontaine ve ark 2006, O'Reiylle ve ark 2010).

Erganiş ve ark (2014) tarafından, KLA'li koyundan izole edilen *C. pseudotuberculosis* suşundan hazırlanan bakterin, PLD ve kombine aşıların farelerdeki ve koyunlardaki sonuçlarına göre; koyunlarda KLA enfeksiyonundan korunmada *C. pseudotuberculosis* aşısının faydalı olduğu bildirilmiştir.

Fontaine ve ark (2006) tarafından, KLA enfeksiyonuna sebep olan *C. pseudotuberculosis* suşunun, bölgeden bölgeye izolatları arasında farklılık olabileceği ve hazırlanacak olan aşının da hedef aşı bölgesinden izole edilen suş ile hazırlanması gerektiği bildirilmiştir.

Deneysel aşı çalışmalarında $Al(OH)_3$ ile kombine edilen aşıyla aşılı koyunlarda hedef enfeksiyona karşı koruma sağlandığı ancak antijene karşı gelişen antikor titresinin düşük olduğu ve 3 aydan daha az süre koruma sağladığı bildirilmiştir (Buonavoglia ve ark 1998, Tola ve ark 1999, Greco ve ark 2002). Bu duruma karşın mineral yağ bazlı adjuvantlar ile hazırlanan aşıların aşı yerinde granulom oluşumunu uyarmasına karşın, etkili antikor oluşumunu sağlayarak hedef enfeksiyondan korunma süresinin 11 aydan daha fazla olduğu belirtilmiştir (Buonavoglia ve ark 1998, Greco ve ark 2002, Buonavoglia ve ark 2010).

W/O/W formundaki adjuvanttlar, W/O adjuvanttlardan daha hızlı antijenik uyarım yapılmasını sağladıklarından acil aşılamalarda tercih edilmektedir. Bağışıklık

süresi bakımından/ antikor sentezi seyri bakımından W/O lardan biraz daha kısa süreli olmaktadırlar (Erganiş 2014).

W/O/W emülsiyonu ile beraber verilen antijenin, W/O emülsiyonu ile beraber verilen antijenin salınımına benzer şekilde yavaş salınımının olmasının yanı sıra, O/W emülsiyonunun antijen salınımına benzer şekilde de hızlı şekilde salınımına olanak sağlar. Koyunlarda şap hastalığı salgınlarına karşı geliştirilen aşıda kullanılan adjuvant W/O/W formundadır ve aşılama sonrasında etkene karşı immun cevap 4 gün sonra gelişmekte ve yaklaşık 1 sene etkisini devam ettirmektedir. W/O/W emülsiyonunun humoral bağışıklığı uyardığı bilinmekle beraber rekombinant adenovirus ile kombine edilerek aşılanan fareler üzerinde yapılan denemeler sonucunda; İnterlökin 6 (IL6) sentezini uyararak daha etkili ve yüksek seviyede immun yanıt sağladığı rapor edilmiştir. (Ganne ve ark 1994, Aucouturier ve ark 2001).

Bu çalışmada; dPLD ile CFA, ISA 201 VG, ISA 206 VG ve $Al(OH)_3$ adjuvanları ile kombine edilen aşıyla aşılı kuzu gruplarının serumlarının hemolitik titrelerinin 1/16, nötralizasyon titre skorunun 3 olduğu ve ELISA sonucunda belirlenen OD değerleri cut off (0.309) değerine göre değerlendirildiğinde; CFA grubunda 0.321, ISA 201 VG grubunda 0.605 ve ISA 206 VG grubunda 0.598 olduğu kuzularda immun yanıtın geliştiği, ISA 201 VG ve ISA 206 VG'nin immun yanıtı en etkili şekilde uyardığı ve CFA'dan çok daha etkili olduğu görüldü. Tüm testlerde ticari aşının etkinliğinin, diğer aşı gruplarından daha düşük olduğu belirlendi. RPLD ile CFA, ISA 201 VG, ISA 206 VG ve $Al(OH)_3$ adjuvantları ile kombine edilen aşıyla aşılı kuzu gruplarının serumlarının CFA ve ISA 201 VG grubu kuzularının hemolitik titrelerin 1/64**,** CFA nötralizasyon titre skorunun 5 olduğu ve ELISA sonucunda belirlenen OD değerleri cut off (0.091) değerine göre değerlendirildiğinde; CFA grubunda 0.207, ISA 201 VG 0.248, ISA 206 VG 0.189 ve $Al(OH)_3$ 0.126 ile aşılı kuzularda immun yanıtın geliştiği, ISA 201 VG'nin immun yanıtı CFA'dan çok daha etkili şekilde uyardığı görüldü. rPLD ve dPLD'nin aşı kombinasyonu etkinliklerine bakıldığında; rPLD aşı gruplarının immun sistemi fark edilebilir şekilde daha etkili uyardığı düşünüldü. Tüm testlerde ticari aşının etkinliğinin, diğer aşı gruplarından daha düşük olduğu belirlendi.

DPLD ve rPLD antijenik benzerliğini ve aşıdaki rolünü belirleyebilmek için yapılan çapraz antijen uygulaması ile 3 farklı serolojik testten farklı sonuçlar alındı. Bu durum kuzu serumlarında anti-PLD IgG haricinde diğer antikorların rol oynadığı ve aşı etkinliği için yapılan testlerde aşı antijeninin, test antijeni olarak kullanılmasının daha güvenilir sonuçlar vereceği düşünüldü.

RPLD ve dPLD toksinleri ile yapılan serolojik test sonuçları karşılaştırıldığında, rPLD ile hazırlanan aşılar ile aşılanan kuzularda oluşan anti-rPLD IgG antikorlarının oluşumu, dPLD ile hazırlanan aşılar ile aşılanan kuzularda oluşan anti-dPLD IgG antikorlarının oluşumundan daha hızlı yükseldiği ve ELİSA'nın kullanılan diğer serolojik testlerden daha güvenilir bir method olduğu belirlendi.

KLA enfeksiyonundan korunmaya yönelik geliştirilen 8 farklı aşı grubundan, aşılı kuzuların serum titre değerleri ve fare üzerinde çelınç ve seropotens deneme sonuçlarına göre etkili aşı formulasyonları; ISA 201 VG+ dPLD, ISA 206 VG+ dPLD, CFA+ dPLD, dPLD+ $Al(OH)_3$, ISA 201 VG +rPLD, ISA 206 VG+rPLD, CFA+rPLD, $Al(OH)_3$+rPLD olduğu ve aşıların koruyuculuğunun ticari aşıdan daha yüksek olduğu belirlendi. CFA'nın W/O fazına bağlı çok yoğun olmasına bağlı olarak aşının homojenizasyonunda zorluklar yaşanması ve özel çalkalayıcılara ihtiyaç duyulması, enjeksiyon esnasında zorluk yaşanması, ayrıca ekonomik olmamasıda aşı uygulamasına elverişli olmadığını düşündürdü. $Al(OH)_3$'in immun sistemi zayıf uyardığı ve diğer adjuvantlar ile karşılaştırıldığında etkinliğinin daha düşük olduğu belirlendi. ISA 201 VG ve ISA 206 VG'nin W/OW fazında olması aşı homojenizasyonunu kolaylaştırmakta ve enjeksiyonunda da sıkıntı yaşanmamaktadır. Ticari aşıyla aşılı kuzu ve fare serumlarındaki anti_PLD IgG oluşumu ve celınç denemeleri göz önünde bulundurulduğunda aşının koruyuculuğunun yeterli olmadığı ve yerel saha izolatı ile hazırlanan aşı etkinliğinin daha yüksek olduğu düşünüldü.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Saha izolatının PLD geni ile referans suşun PLD geni baz diziliminin %99.7 benzer olduğu, farklılığa bağlı Valin amino asit değişiminin de PLD enzimin karakteristik yapısını bozmayarak etkinliğini devam ettirebilmesine engel olmadığı,

2. rPLD ile dPLD antijenik yapısının benzer olduğu, dPLD toksininin yüksek hemolitik etkinliğe sahip olabilmesi için besiyeri ortamının zenginleştirilmesinin gerekliliği bulunurken, rPLD toksin sentezinde ekonomik açıdan daha elverişli besiyeri ortamına ihtiyaç duyulduğu,

3. Çözünebilir rekombinant toksin üretiminde kullanılan kompetanın etkisinin, besiyeri bileşiminin, IPTG miktarının, O_2 oranının, ortam ısısının, indükleme süresinin önemli rol oynadığı ve fazla miktarda üretilmesi hedeflendiğinde bu durumların kritik rol oynadığı,

4. Hemoliz İnhibisyon Test ve Agar Serum Nötralizasyon Test ile aşılama sonrası serum titresinin anti-PLD IgG ölçümlerinde elde edilen sonuçlar ELISA ile karşılaştırıldığında; ELISA'nın immun yanıt oluşum yükseliş grafiğini belirlemede daha güvenilir ve hassas olduğu,

5. rPLD ve dPLD ile yapılan ELISA sonuçları karşılaştırıldığında; rPLD ile hazırlanan aşılar ile aşılanan kuzularda oluşan anti-rPLD antikorlarının oluşumu, dPLD ile hazırlanan aşılar ile aşılanan kuzularda oluşan anti- dPLD antikorlarının oluşumundan daha hızlı ve yüksek seviyede olduğu,

6. Rekombinant antijen ile hazırlanan aşının etkinliğinin ölçülmesi sonucunda, aşının immun sistemi uyarım gücü hakkında elde edilen verilerin daha güvenilir olduğu,

7. rPLD ve dPLD antijenlerinin benzerliğinin belirlenmesine yönelik yapılan testlerde çıkan titre sonuçları karşılaştırıldığında; aşı antijeninin, test antijeni olarak kullanılmasının daha güvenilir sonuçlar vereceği,

8. dPLD toksini ile beraber başka proteinlerin besiyeri üst sıvıında olabileceği ve kuzu serumlarında bulunan anti-PLD IgG haricindeki antikorlarında test sonucuna etki edebileceği, bu duruma karşın rPLD toksininin daha saf olduğu ve kuzu serumlarında sadece anti-PLD IgG bulunduğu,

9. Kuzu aşı grupları ve fare üzerinde çelınç denemesi verilerine göre; dPLD + CFA, dPLD + ISA 206 VG, dPLD + ISA 201 VG, dPLD+ $Al(OH)_3$, rPLD+ CFA, rPLD ISA 206 VG, rPLD+ ISA 201 VG, rPLD+ $Al(OH)_3$ ile 7 farklı aşı formulasyonunun geliştirildiği,

10. FCA'ın W/O fazda olması sebebiyle homojenizasyonu esnasında özel çalkalayıcılara ihtiyaç duyulması, enjeksiyon da zorluk yaşanması, ayrıca ekonomik olmamasıda aşı uygulamasına elverişli olmadığını, ISA 201 VG ve ISA 206 VG'nin W/OW formunda olmasından dolayı homojenizasyonunun daha rahat yapıldığı ve enjeksiyonda sıkıntı yaşanmadığı,

11. $Al(OH)_3$ ile diğer adjuvantlar mukayese edildiğinde; immun sistemi uyarma bakımından yetersiz kaldığı,

12. Ticari aşıyla aşılı hayvanlarda immun yanıt uyarım düzeyinin diğer aşı grupları ile karşılaştırıldığında yeterince etkili olmadığı ve yeterli düzeyde bağışıklık sağlayamadığı,

13. KLA enfeksiyonun da INF-γ üretimi ve sitotoksik T hücrelerine bağlı bağışıklık temel rol oynaması sebebi ile aşı antijeni ile beraber kullanılan adjuvantın özellikle hücresel immun yanıtı uyarabilmesinin önem taşıdığı ve ileride yapılacak olan çalışmalarda hücresel immun yanıtın etkili şekilde uyarılmasına yönelik çalışmaların yapılmasının gerekliliğinin olduğu,

14. Bölgesel izolatlar ile hazırlanacak aşıların, enfeksiyondan koruması bakımından etkisinin önemli olduğu,

15. Rekombinant toksoid aşı ile enfeksiyona karşı başarı sağlanabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak; Ülkemizde yaygın olarak kullanılan ticari aşının içerisinde bulunan *C. pseudotuberculosis*'e ait PLD enziminin elde edildiği suşun yerel izolat olmaması, 2 farklı klostridial toksinle kombine olması ve aşı kombinasyonunda kullanılan adjuvantın $Al(OH)_3$ olması sebebi ile ülkemizde KLA enfeksiyonundan korunmada yeterince etkili olmadığı düşünüldü. dPLD ve rPLD ile yapılan aşı grubu ve çelınç çalışmalarından alınan sonuçlarına göre; rPLD aşı gruplarında antijene karşı immun yanıtın hızla yükseldiği, ELISA test sonuçlarından alınan sonuçların daha güvenilir ve koruyuculuğunun da **%100** olduğu göz önünde bulundurularak,

KLA'ya karşı önerilen aşılar içerisinden en etkilisinin ISA 201 VG+rPLD aday aşı olabileceği kanaatine varıldı.

6. KAYNAKLAR

Achal P, Nicholas MV, Jerr, BU, 2005. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. Nat Med, 11(4), 63–8.

Adrıan L, Hodgson M, Bırd TP, Nısbet IT, 1990. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression in *Escherichia coli* of the Phospholipase D Gene from Corynebacterium pseudotuberculosis. Journal of Bacterıology, 172(3), 1256-61.

Aguilar JC, Rodriguez EG, 2007. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine, 25, 3752–62.

Akman M, Gülmezoğlu E, 1980. Tıbbi Mikrobiyoloji. 3 baskı. Hacettepe Üniversiytesi Yayınları, s. 316-20

Alanson JL, Simon MC, Girones O, Muzquõz JL, Ortega C, Garcia J, 1992. The effect ofexperimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculozis* on reproduction in adult ewes. Res Vet Sci, 52, 267-72.

Al-Gaabary MH, Osman SA, Oreiby AF, 2009. Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. Small Ruminant Research, 87, 116–21.

Al-Gaabary MH, Osman SA, Oreiby AF, 2009. Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological nad preventive studies. Small Rum. Res, 87, 116-21.

.Alves FSF, Olander H, 1999. Uso de vacina toxóide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. Veterinária Notícias, 5, 69-75.

Anderson ML, Narin ME, 1984. Control of caseous lympadenitis in goats by vaccination. In: Les Maldies de la Chevre. Les colloques de l'INRA, 28, 605-9.

Angus WW, Lester RL, 1975. The regulated catabolism of endogenous and exogenous phosphatidylinositol by *Saccharomyces cerevisiae* leading to extracellular glycerophosphorylinositol and inositol. J Biol Chem, 250, 22–30.

Anonim 1, 2013. FAO. FAOSTAT. Live Animals, Erişim Tarihi 22.10.2013. Erişim Adresi, http://faostat.fao.org/site/573.

Anonim 2, 2012. TÜİK. Veritabanları, Erişim Tarihi 22.10.2013. Erişim Adresi, http://www.tuik.gov.tr/PreTabloArama.

Anonim 3. EMBL-EBI, Erişim Tarihi 20.10.2013. Erişim Adresi, http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes. .

Anonim 4, 2013. Genel İdentifikasyon testleri. Hemoliz Testi, Erişim Tarihi 14.10.2013. Erişim Adresi, http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/210013601.pdf. .

Anonim 5, 2013. Enzimler. Erişim Tarihi 31.08.2013. Erişim Adresi, http://www.balikesir.edu.tr/~osinan/enzimsaf.html.. .

Anonim 6, 2014. NCBI Gen Bank Referans. Erişim Tarihi: 10.01.2014. Erişim Adresi, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/L16587.1.

Anonim 7, 2013. ABIM. Erişim Tarihi: 25.10.2013. Erişim Adresi, (http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/cgi-w3bb/a-compo-p.pl).

Anonim 8, 2013. ExPasy Translate. Erişim Tarihi 24.10.2013. Erişim Adresi, http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa. .

Anonim 9, 2014. Seppic. Technical Bulletin. Erişim Tarihi 10.01.2014. Erişim Adresi, http://www.seppic.com/file/galleryelement/pj/54/56/17/56/3550-technical-bulletin-mtd-isa-206-vg.

Arda M, Mimbay A, Aydın N, Leloğlu N, Akay Ö. Özel Mikrobiyoloji. A.Ü. Vet. Fak. Atatürk Üniversitesi Erzurum, s. 1992; 74.

Arda M, 1992. Özel Mikrobiyoloji. Medisan, 258-77.

Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J, 2006. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. Protein Expression and Purification, 48, 1–13.

Arous JB, Deville S, Pal JK, Baksi S. Bertrand F, Dupuis L, 2013. Reduction of Newcastle disease vaccine dose using a novel adjuvant for cellular immune response in poultry. Procedia in Vaccinology, 7, 28– 33.

Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V, 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. Vaccine, 19, 2666–72.

Aydın N, 1977. *Corynebacterium pseudotuberculosis* Suşlarının ve Ekzotoksinlerinin Antijenik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar. A.Ü.Vet.Fak, Doktora Tezi.

Azevedo V, 2009. Immunization with Recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* Heat-Shock Protein (Hsp)-60 is Able to Induce an Immune Response in Mice, But Fails to Confer Protection Against Infection. The Open Veterinary Science Journal, 3, 22-7.

Baird GJ, Fontaine MC, 2007. *Corynebacterium pseudotuberculozis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. J Comp Pathol, 137, 179-210.

Baird GJ, 2003. Current perspectives on caseous lymphadenitis. In Practice: Journal of Postgraduate Clinical Study, 25, 62-68.

Baneyx F, 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol, 461, 45–61.

Barksdale LR, Linder IT, Pollice SM, 1981. Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculozis* (Corynebacterium ovis) and Corynebacterium ulcerans, distinctive marker within the genus Corynebacterium. J Clin Microbiol, 13, 335-43.

Barksdale LR, Linder IT, Sulea, Pollice M, 1981. Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculozis* (*Corynebacterium ovis*) and Corynebacterium ulcerans, distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. J Clin Microbiol,13, 335-43.

Bastos BL, Dias Portela RW, Dorella FA, Núbia RD, Castro TLP, Miyoshi A, OliveiraSC, Meyer R, Azevedo A, 2012. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models ve Zoonotic Potential. Bastos et al. J Clin Cell Immunol, 4 (5), 1-15.

Batey, RG, 1986. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. Aust Vet J, 63, 269–72.

Belloc C, Dupuis L, Deville S, Aucouturier J, Laval A, 2008. Evaluation of safety and immune response induced by several adjuvants included in Pasteurella multocida vaccines in chickens. Revue Méd. Vet, 159 (7), 371-75.

Berg A, Rodseth OM, Hansen T, 2007. Fish size at vaccination influence the development of side-effects in Atlantic salmon (Salmo salar L.). Aquaculture, 265, 9–15.

Bernheimer AW, Campbell BJ, Forrester LJ, 1985. Comparative toxinology of Loxosceles reclusa and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Science, 228, 590–91.

Bernheimer AW, Linder R, Avigad LS, 1980. Stepwise degradation of membrane sphingomyelin by corynebacterial phospholipases. Infect Immun, 29, 123-31.

Biberstein EL, Knight HD, Jang S, 1971. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculozis*. Vet Rec, 89, 691-2.

Billiau A, Matthys P, 2001. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. Journal of Leukocyte Biology, 70, 849-60.

Billington SJ, Esmay PA, Songer JG, Jost BH, 2002. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculozis*. FEMS Microbiol Lett, 208, 41-5.

Binns SH, Green LE, Bailey M, 2007. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. Veterinary Microbiology, 123, 169–79.

Bocckino SB, Wilson PB, Exton JH, 1991. Phosphatidate dependent protein phosphorylation. Proc Natl Acad Sci U.S.A, 88, 6210–13.

Bomford R, 1980. The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cellmediated immunity. Clin Exp Immunol, 39, 435–41.

Brown CC, Olander HJ, Biberstein EL, Morse SM, 1986. Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculozis.* Am J Vet Res, 47, 1116-19.

Brown CC, Olander HJ, 1987. Caseous lymhadenitis of goats and Sheep: A Review. Vet Bull, 57, 1-11.

Brown FD, Rozelle AL, Yin HL, Balla T, Donaldson JG, 2001. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and ARF6- regulated membrane traffic. J Cell Biol, 154, 1007–17.

Brown TA, 1995. Gene Cloning, An İntroduction. Third Ed. UMIST. Manchester. UK: Chapman & Hoall, p. 27-77.

Brown TA, 2001. Essential Molecular Biology. Second Ed. UMIST. Manchester. UK, p. 211-13.

Brogden KA, Cutlip RC; Lehmkuhl HD, 1985. Immunogenıcıty of Corynebacterıum

pseudotuberculosıs and the Effect of Adjuvants in mice. J. Comp. Path, 95, 167-173.

Buonavoglia D, Fasanella A, Sagazio P, Tempesta M, Iovane G, Buonavoglia C, 1998. Persistence of antibodies to *Mycoplasma agalactiae* in vaccinated sheep. New Microbiologica, 21, 209–12.

Buonavoglia D, Greco G, CorrenteM, Greco MF, D'Abramo M, Latronico F, Fasanella A, Decaro N, 2010. Long-term immunogenicity and protection against *Mycoplasma agalactiae* induced by an oil adjuvant vaccine in sheep. Research in Veterinary Science, 88, 16–19.

Burrell DH, 1980. A haemolysis inhibition testfor detection of antibody to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Res Vet Sci, 28, 190-94.

Burrell DH, 1980. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin. Res Vet Sci, 28, 234–37.

Burrell DH, 1978. Vaccination against caseous lymphadenitis in sheep. In: Proc 55th Ann Conf Aust Vet Assoc, 79–81.

Byars NE, Allison AC, 1990. Immunologic adjuvants: general properties, advantages, and limitations. In: Zola H (ed.) Laboratory Methods in Immunology. Boca Raton: CRC Press, 39–51.

Carlson P. A, 1995. haemolyticum infections. Academic Dissertation. Helsinki University Press, 1-34.

Carne HR, Wickham N, Kater JC. A toxic lipid from the surface of *Corynebacterium ovis*. Nature. 1956;178: 701-2.

Carne HRA, 1939. Bacteriological study of 134 strains of *Corynebacterium ovis.* J Pathol Bacteriol, 49, 313-28.

Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros JC, Zamorano PI, Sadir AM, GoÂmez N, Salinas J, Escribano JM, Borca MV*,* 1998. Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. J. Virol, 72, 1688-90.

Chaplin PJ, De Rose R, Boyle JS, 1999. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. Infect Immun, 67, 6434-8.

Chen H, Xu Z, Xu N, Cen P, 2005. Effcient production of a soluble fusion protein containing human beta-defensin-2 in *E. coli* cell-free system. J Biotechnol, 115, 307–15.

Claridge JE, Spiegel CA, 1995. *Corynebacterium* and miscellaneous irreguller Gram positive rods, Erysepelothrix and Gardnerella. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (eds). Manual of Clinical Microbiology. 6th edition. Washington D.C. American Society for Microbiology Press, 357-78.

Comoy EE, Capron A, Thyphronitis G, 1997. In vivo induction of types 1 and 2 immune responses against protein antigens. Int Immunol, 9, 523–31.

Conforti VA, de Avila DM, Cummings NS, Zanella R, Wells K.J, Ulker H, Reeves JJ, 2008. CpG motif-based adjuvant as a replacement for Freund's complete adjuvant in a recombinant LHRH vaccine. Vaccine, 26 (7), 907–13.

Connor KM, Quirie MM, Baird G, Donachie W, 2000. Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculozis* using pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol, 38, 2633–37.

Coyle MB, Lipsky BA, 1990. Coryneform bacteria in infectious diseases; clinical and laboratory aspects. Clin Microbiol Rev, 3, 227-46.

Cross M, Roberts S, Ridley AJ, Hodgkin M, Stewart A, Claesson-Welsh L, Wakelam MJO, 1996. Stimulation of actin stress fibre formation mediated by activation of phospholipase D. Curr Biol, 6, 588–97.

Cuevas WA, Songer JG, 1993. *Arcanobacterium haemolyticum* phospholipase D.is genetically and functionally similar to *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. Infect and Immun, 61 (10), 4310-16.

Cuevas WA, Songer JG, 1993. *Arcanobacterium haemolyticum* phospholipase D is genetically and functionally similar to *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. Infect Immun, 61, 4310–16.

Çetinkaya B, Karahan M, Atil E, Kalin R, De Baere T, Vaneechoutte M, 2002. İdentification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. Vet. Microbiol, 88, 75-83.

Day MJ. Schultz RD, 2011. Veterinary immunology: principles and practice. Manson Publishing, London, UK, 192-196.

Demicheli V, Barale A, Rivetti A, 2008. Vaccines for women to prevent neonatal tetanus. JohnWiley & Sons, 2, 1-24.

Dercksen DP, Brinkhof JMA, Dekker-Nooren T, van Maanen K., Bode CF, Baird G, Kamp EM, 2000. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. Vet. Microbiol, 75, 167–75.

Dhalla NS, Xu YJ, Sheu SS, Tappia PS, Panagia V, 1997. Phosphatidic acid: A potential signal transducer for cardiac hypertrophy. J Mol Cell Cardiol, 29, 2865–71.

Dharmalingham K, Jayaraman J, 1971. Mechanism of glucose repression of mitochondriogenesis: induction of phospholipases. Biochem. Biophys. Res. Commun, 45, 1115– 18.

Diker KS, 2005. İmmunoloji. Medisan. Ankara, 271-84.

Doherr MG, Carpenter TE, Wilson WD, Gardner IA, 1998. Application and evaluation of a mailed questionnaire for an epidemiologic study of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses. Prevent Vet Med, 35, 241-53.

Dorella FA, Pacheco LGC, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V, 2006. *Corynebacterium pseudotuberculozis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Vet Res, 37, 201-18.

Dorella FA, Pacheco LGC, Portela RW, Meyer R, Miyoshi A, Azevedo V, 2009. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. Expert Rev. Vaccines, 8(2), 205–13.

Doty RB, Dunne HW, Hokanson JF, Reid JJ, 1964. A comparison oftoxins produced by various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculozis* and the development of a diagnostic skin test for caseous lymphadenitis of sheep and goats. Am J Vet Res, 25, 1679-84.

Edelman R, 2000. An overview of adjuvant use. In: Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols. Edited by O'Hagan D.T. Humana Press, New Jersey, USA, 1-28.

Egen NB, Cuevas W, Mcnamara PJ, Sammons DW, Humphreys R, 1989. Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. Am J Vet Re, 50, 1319-22.

Eggleton DG, Doidge CV, Middleton HD, Minty DW, 1991. İmmunisation against ovine caseous lymphedanitis: efficacy of monocomponent *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid vaccine and ombined clostiridial-corynebacterial vaccines. Aust Bet J, 68, 320-1.

Eggleton DG, Haynes JA, Middleton HD, Cox JC, 2005. Immunisation against ovine caseous lymphadentitis: correlation between *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid content and protective efficacy in combined clostridial-corynebacterial vaccines. Aust Vet J, 68, 322–5.

Eggleton DG, Middleton HD, Doidge CV, 1991. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculozis* vaccines with and without bacterial cells. Aust Vet J, 68, 317-19.

Ella K, Dolan Qi CJW, Meier KE. Characterization of a regulated form of phospholipase D in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem J, 1995, 307, 799–805.

Ella KM, Dolan JW, QI C, Meıer KE, 1996. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in expression of phospholipase D. Biochem. J, 314, 15-19.

Ellis J A, Hawk DA, Mills KW, Pratt DL, 1991. Antigen specificity and activity of ovine anti-bodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. Vet İmmunol Immunopathol, 28, 303-16.

Erganis O, Kaya O, Ates M, Istanbulluoglu E, 1990. Microbiological studies on purulent lymph nodes of sheep slaughtered at the abattoir of the Konya meat and fish organisation and a serological survey. Veterinarium, 1, 8–11.

Erganiş O, Hadimli HH, Kav K, Sayın, Sakmanoğlu A, 2012. Koyunlarda Kazeöz Lenfadenitis'e Karşı İnaktif *Corynebacterium pseudotuberculosis* Aşı Geliştirme Çalışmaları. Araştırma Projesi.

Erganiş O, Kaya O, Ateş M, İstanbulluoğlu E, 1990. Konya EBK kombinasında kesilen koyunlardaki apseli lenf yumruları üzerine mikrobiyolojik ve serolojik incelemeler. Veterinarium, 1, 8-11.

Erganiş O, Kaya O, 1990. İmmunomodilataörler ve Kullanınım Alanları. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 6 (16), 147-72.

Erganiş O. İstanbulluoğlu E, 1993. İmmunoloji. Mimoza Yayınları, 137-513.

Erganiş O, Hadimli HH, Kav K, Sakmanoğlu A, Sayın Z, Pınarkara Y, 2014. Farelerde ve koyunlarda inaktif Corynebacterium pseudotuberculosis aşısının kazeöz lenfadenitise karşı etkinliği. Eurasian J Vet Sci, 30(2), 72-9.

Erganiş O, 2009. Sürü Sağlığında Biyogüvenlik Prensipleri ve Güvenli Et ve Süt Üretimi İçin Üretim Yöntemi. Atavet Tarım Hayvancılık Araştırma ve Geliştirme Hizmetleri LTD. ŞTİ Bilgi Bankası

Erganiş O, 2010. Koyunlarda Mikrobik Hastalıklardan Korunumada Aşı Kullanımının Önemi. Uzunyayla Dergisi sayı, 3, 16-19.

Erganiş O, Hadimli HH, Kav K, Sayın Z, Sakmanoğlu A, Pınarkara Y, 2012. Koyunlarda Kazeöz Lenfadenitis'e Karşı İnaktif *Corynebacterium pseudotuberculosis* Aşı Geliştirme Çalışmaları. X. Ulusal Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, Aydın, Türkiye, 24-27 Eylül.

Erganiş O, 2014. Koyun ve Keçilerde Sürü Sağlığı Yönetimi. International Participated Small Ruminant Congress, Konya, Türkiye, 16-18 Ekim.

Erganiş O, 2014. W/O/W ile W/O adjuvant kullanım alanları ve farkları. Kişisel Görüş.

Esterabadi AH, Entessar F, Hedayati H, Narimani AA, Sadri M, 1975. Isolation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from camel in Iran. Archivesde L'Institut Razi, 27, 61-6.

Feher A, Boross P, Sperka T, Oroszlan S, Tozser J, 2004. Expression of the murine leukemia virus protease in fusion with maltose-binding protein in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 35, 62–8.

Fell HWK, Nagington J, Naylor GRE, 1977. *Corynebacterium haemolyticum* infections in Cambridge shire. J Hyg Camb, 79, 269-74.

Fontaine MC, Baird GJ, Connor KM, Rudge K, Sales J, Donachie W, 2006. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis.* Vaccine, 24, 5986-96.

Fraser G, 1964. The effect on animal erythrocytes of combinations of diffusible substances produced by bacteria. J Pathol Bacteriol, 88, 43-58.

Freire SM, Nascimento I, Schaer R, Barreto LMS, Meyer, 2008 Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. Vet immunol immunopathol, 126, 131-41.

Freund J, 1956. The mode of action of immunologic adjuvants. Adv Tuberc Res, 7, 130–48.

Frohman MA, Morris AJ, 1999. Phospholipase D structure and regulation. Chem Phys Lipids, 98, 127–40.

Galloway CA, Sowden MP, Smith HC, 2003. Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in E. coli by induction during late log phase. Biotechniques, 34, 524- 30.

Ganne V, Eloit M, Laval A, Adam M, Trouve G, 1994. Enhancement of the efficacy of a replication-defective adenovirus-vectored vaccine by the addition of oil adjuvants. Vaccine, 12 (13), 1190–6.

Gates NL, Everson DO, Hulet CV, 1977. Effects of thin ewe syndrome on reproductive effciency. Journal of the American Veterinary Medical Association, 171, 1266-67.

Gavin SE, Leonard RB, Briselden, AM, Coyle MB, 1992. Evaluation of the rapid Coryne identification system for *Corynebacterium* species and other coryneforms. Journal of Clinical Microbiology, 30, 1692–695.

Geoffrey A, Weinberg Peter G. Szilagyi, 2010. Vaccine Epidemiology: Efficacy, Effectiveness, and the Translational Research Roadmap. JID, 201, 1607-10.

Georgiou G, Valax P, 1996. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol, 7, 190–97.

Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace U, 1926. Immunological notes. XXIII. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. J Pathol Bacteriol, 29, 31–40.

Goldberger AC, Lipsky BA, Plorde JJ, 1981. Suppurative granulomatous lymphadenitis caused by *Corynebacterium ovis (pseudotuberculosis)*. Am. J. Clin. Pathol, 76, 486–90.

Greco G, Corrente M, Buonavoglia D, Aliberti A, Fasanella A, 2002 Inactivated vaccine induces protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. New Microbiologica, 25, 17–20.

Grossman S, Cobley J, Hogue PK, Kearney EB, Singer TP, 1973. Relation of phospholipase D activity to the decay of succinate dehydrogenase and of covalently bound flavin in yeast cells undergoing glucose repression. Arch. Biochem. Biophys, 158, 744–53.

Guimaraes AS, Seyffert N, Bastos BL, Portela RWD, Meyer R, Carmo FB, Cruz JCM, McCulloch JA, Lage AP, Heinemann MB, Miyoshi A, Azevedo V, Gouveia AMG, 2009. Caseus lymphaneditis in sheep flocks of state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. Small RumnRes, 87, 86-91.

Gupta RK, Rost BE, Relyveld E, Siber GR, 1995. Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds. In: Powell MF, Newman MJ, editors. Vaccine design: The subunit and adjuvant approach. New York: Plenum Press, 229–48.

Gupta RK, 1998. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. Adv Drug Deliv Rev, 32, 155–72.

Hadimli HH, Erganiş O, Sayın Z, Yıldırım B, 2007. Fare ve Koyunlarda Ginseng Katılmış İnaktİf *Salmonella Typhımurıum* Aşılarının Etkinliği. Vet. Bil. Derg, 21 (2), 17;24.

Hammond SM, Altshuller YM, Sung T, Rudge SA, Rose K, Engebrecht J, Morris AJ, Frohman MA, 1995. Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholinespecific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. J Biol Chem, 270, 29640-43.

Hanahan DJ, Chaikoff IL, 1947. Phosphorus-containing lipides of the carrot. J Biol Chem, 168, 233–40.

Heimlich JM, Regnier FE, White JL, Hem SL, 1999. The in vitro displacement of adsorbed model antigens from aluminum-containing adjuvants by interstitial proteins. Vaccine, 17, 2873–81.

Hem SL, White JL, 1995. Structure and properties of aluminum-containing adjuvants. Pharm Biotechnol, 6, 249–76.

Hémond, V, 2009. Axillary lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculozis* in a 63-year-old patient. Med Mal Infect, 39 (2), 136-9.

Henry RA, Boyce SY, Kurz T, Wolf RA, 1995. Stimulation and binding of myocardial phospholipase C by phosphatidic acid. Am J Physiol Cell Physiol, 269, 349–58.

Hermann G, 1961. The laboratory recognition of *Corynebacterium haemolyticum*. Am J Med Tech, 27, 61-66.

Hodgson AL, Bird P, Nisbet IT, 1990. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. J Bacteriol, 172, 1256-61.

Hodgson AL, Carter K, Tachedjian M, Krywult J, Corner LA, McColl M, et al, 1999. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. Vaccine, 26 (17), 802–8.

Hodgson AL, Krywult L, Corner LA, 1992. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculozis:* potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. Infect Immun, 60, 2900-5.

Hodgson AL, Tachedjian M, Corner LA, Radford AJ, 1994. Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculozis*. Infect Immun, 62, 5275-80.

Hofmann RU, 2003. Enzyme-catalysed transphosphatidylation. Eur J Lipid Sci Technol, 105,

305–7.

HogenEsch H, 2002. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. Vaccine, 20 (3), 34-9.

Horne MT, Roberts, Tatner M, 1984. The effects of the use of potassium alum adjuvant in vaccines against vibriosis in rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. J Fish Dis, 7, 91–9.

Hsu TY, Renshaw HW, Livingston CW, Augustine JrJL, Zink DL, Gauer BB, 1985. *Corynebacterium pseudotuberculozis* exotoxin. Fatal hemolytic anemia induced by gnotobiotic neonatal small ruminants by parenteral administration of preparations containing exotoxin. Am J Vet Res, 46, 1206-11.

Huerta B, Gómez-Gascón L, Vela AI, Garayzábal JFF, Casamayor A, Tarradas C, Maldonado A. Comparison of two biochemical methods for identifying *Corynebacterium pseudotuberculozis* isolated from sheep and goats. The Veterinary Journal, 2013.

Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heyneker HL, Bolivar F, Boyer HW, 1977. Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. Science, 198, 1056-63.

Ivanović1 S, Žutić1 M, Pavlović1 I, Žujović2 M, 2009. Caseous Lymphadenitis in Goats. Biotechnology in Animal Husbandry, 25 (5-6), 999-1007.

Izgür M, Akan M, İlhan Z, l999. Koyunlarda kazeöz lenfadenitis olgularından izole edilen etkenler. Ankara Univ Vet Fak Derg, 46, 43-50.

İlhan Z, Akan A, İzgür M, Akay Ö, Keçeli H, 2001. Koyunlarda *Corynebacterium pseudotuberculosis'*e Karşı Oluşan Antikorların Hemoliz İnhibisyon Testi ile Saptanması. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Dergisi Elektronik Versiyonu, 1, 1-9.

İlhan Z, 2003. Koyunlarda *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in ELISA ve Dot-Blot ELISA ile teşhisi. Turk J Vet Anim Sci, 27, 1327-33.

Jackson, RL, Fox JC, 1995. Adjuvants and Antibody Production. ILAR Journal, 37 (3), 95.

Jeffrey M, Becker Guy A, Caldwell EAZ, 1996. Biotechnology (Second Edition) A Laboratory Course Copyright. Protein Expression, Purification and Analysis. Elsevier, 72-3.

Jiao X, Cheng S, Hu Y, Sun L, 2010. Comparative study of the effects of aluminum adjuvants and Freund's incomplete adjuvant on the immune response to an *Edwardsiella tarda* major antigen. Vaccine, 28, 1832–37.

Join-Lambert OF, 2006. *Corynebacterium pseudotuberculozis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. Pediatr Infect Dis J, 25 (9), 848-51.

Jolly RD, 1965. The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. N Z Vet J, 13, 141-47.

Jones D, Collins MD, 1986. Irregular, nonsporing Gram-positive rods, in: Smeath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G,. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, 1261–282.

Jones GL, 1990. Peptide vaccine derived from a malarial surface antigen: effect of dose and adjuvant on immunogenicity. Immunol. Lett, 24, 253–60.

Kampstrup S, Roensholt L, Jensen MH, Dalsgard K, 1999. Production of a highly iimunogenic subunit ISCOM vaccine aainst Bovine Viral Diarrhea Virus. Vaccine, 17, 1057-64.

Karakurt Y, Huber D, 2008. Wound Metabolism and Wound Signalling İn Fruits and Vegetables. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 24 (1-2), 401–13.

Karakus F, Yılmaz A, Hakan B, Stormo K, Ulker H, 2013. The Effectiveness of recombinant OL fusion protein (ovalbumin-LHRH-7) in suppressing reproductive functions when injected in single-dose vaccination protocols with different adjuvants. Animal Reproduction Science, 138, 228–32.

Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A, 2009. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of Candida albicans, Cryptococcus neoformans and Aspergillus fumigatus. Acta Biochi-mica Polonica, 56 (2), 211-24.

Kuria JK., Holstad G. A, 1989. Seroepidemiological investigation of *Corynebacterium pseudotuberculozis* infection in sheep flocks in southern Norway. Acta Vet Scand, 30, 107–8.

Kusner DJ, Hall CF, Schlesinger LS, 1996. Activation of phospholipase D is tightly coupled to the phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* or opsonized zymosan by human macrophages. J Exp Med, 184, 585–95.

Kuyucuoğlu Y, Erganiş O, 1999. Konya Bölgesindeki Koyunlardan İzole Edilen *Corynebacterium pseudotuberculosis* Suşların Bazı Biyokimyasal Özellikleri ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları. Veterinerium, 1 (10), 27-30.

Le Moignic Piony, 1916. Application to man of vaccines consisting of emulsions in fatty substances (lipo-vaccines). Compt Rend So Biol, 29, 352–58.

Eamaster BR, Shen DT, Gorham JR, 1987. Efficacy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin for the immunologic protection of sheep against development of caseous lymphadenitis. Am J Vet Res, 48, 869-72.

Lindblad EB, 2000. Freund's adjuvants. In: O'Hagan DT, editor. Methods in molecular medicine: Vaccine adjuvants—preparation methods and research protocols. Totowa. NJ: Humana Press, 49–63.

Lipsky BA, Goldberger AC, Tompkins LC, Plorde JJ, 1982. Infections caused by nondiphtheria corynebacteria. Rev. Infect Dis, 4, 1220–235.

Lorke D, 1975, Machemer L: Studies of embryo toxicity in rats and rabbits. Environ Qual Saf Suppl, 4, 223-9.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of biological chemistry, 193, 265–75.

Lund A, Almlid T, Larsen HJ, Steine T, 1982. Antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculozis* in adult goats from a naturally infected herd. Acta Vet Scand, 23, 473-82.

Magdy H. Al-Gaabarya, Salama A. Osmana, Mohamed S, Ahmedb, Atef F, 2010. Abattoir survey on caseous lymphadenitis in sheep and goats in Tanta, Egypt. Small Ruminant Research, 9, 117–24.

Mak TW, Saunders ME, 2008. Primer to the immune response. Academic Press, Elsevier Inc. UK, 228-233.

Maki LR, Shen, SH, Bergstrom RC, Stetzenbach LD, 1985. Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in sheep, using an enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Vet Res, 46 (1), 212–214.

McNamara PJ, Cuevas WA, Songer JG, 1995. Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculozis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: Cloning and sequence homology. Gene, 156, 113–18.

McNarmara PJ, Bradley GA, Songer JG, 1994. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Mol Microbiol, 12, 921-30.

Meldrum KC, 1990. Caseous lymphadenitis outbreak. Veterinary Record, 126, 369.

Menzies PI, Muckle CA, Hwang YT, Songer JG, 1994. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. Small Rumin Res, 13, 193–98.

Merchant IA, Packer RA, 1967. The Genus*Corynebacterium*, in: Merchant I.A. PackerR.A. (Eds.), Veterinary bacteriology andvirology, The Iowa State University Press,Iowa, 425–40.

Middleton MJ, Epstein WM, Gregory GG, 1991. Caseous lymphadenitis on Flinders Island: prevalence and management surveys. Aust Vet J, 68, 311–12.

Miers KC, Ley WB, 1980. *Corynebacteriumpseudotuberculosis* infection in the horse: study of 117 clinical cases and consideration of etiopathogenesis. Journal of the American Veterinary Medical Association, 177, 250-53.

Mohan P, Vathsala M, Jayaprakasan V, 2008. Comparative characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*from goats in Kerala, India and reference strain. Small Ruminant Research, 74, 1-3, 226-30**.**

Moore RJ, Rothel L, Krywult J, Radford AJ, Lund K, Hodgson ALM, 2000. Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. Vaccine, 18, 487-97.

Muckle CA. Gyles CL, 1986. Exotoxic activities of *Corynebacterium pseudotuberculozis*. Current Microbiology, 13, 57-60.

Mullis KB, 1990. Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology. Scientific American, 262 (36), 216-17.

O'Reilly KM, Green LE, Malone FE, Medley GF, 2008. Parameter estimation and stimulations of a mathemetical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmission in sheep. Prevent Vt Med, 83, 242-59.

O'Reilly KM, Medley GF, Green LE, 2010. The control of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks: A mathematical model of impact of vaccination, serological testing, clinical examination and lincing of abscesses. Prevent Vet Med, 95, 115-26.

OIE (World Organisation for Animal Healths). 2004. ''Principles of Veterinary Vaccine Production''. Chapter 1.6. ''Manual of Standarts Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals''. Erişim Tarihi: 21.06.2013. Erişim Adresi, http://www.oie.int/eng/normes/manual/A 00045.htm.

Okay S, 2011. Development of Recombınant Vaccınes Composed of PLPE and OMPH from *Pasteurella multocıda* A:3. Doktora Tezi. Ankara. ODTÜ.

Olson ME, Ceri H, Morck DW, 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can J Vet Res, 66, 86-92.

Onon EO, 1979. Purification and partial characterization of the exotoxin of *Corynebacterium ovis.* Biochem J, 177, 181-86.

Ott G, van Nest G, 2007**.** Development of vaccine adjuvants: a historical perspective. In: Vaccine adjuvants and delivery systems. Edited by Singh, M. Wiley-Interscience, New Jersey, USA, 1-32.

Pacheco LG, Pena RR, Castro TL, Dorella FA, Bahia RC, Carminati R, Frota MN, Oliveira SC, Meyer R, Alves FS, Miyoshi A, Azevedo V, 2007. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculozis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. Journal of Medical Microbiology, 56, 480–86.

Park JB, Kim JH, Kim Y, Ha SH, Kim JH, Yoo J, Du G, Frohman MA, Suh P, Ryu SH, 2000. Cardiac phospholipase D2 localizes to sarcolemmal membranes and is inhibited by Actininin an ADP-ribosylation factor-reversible manner. J Biol Chem, 275, 21295-301.

Pascual C, Lawson PA, Farrow JAE, Navarro Gimenez M, Collins MD, 1995. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol, 45, 724–28.

Paton MW, Collett MG, Pepin M, Bath GF, 2005. *Corynebacterium pseudotuberculozis* infections. In: Infectious Diseases of Livestock, 3rd Edit., J.A.W. Coetzer and R.C.Tustin, Eds, Oxford University Press Southern Africa, CapeTown, 1917-30.

Paton MW, Mercy AR, Sutherland SS, Ellis TM, 1988. The influence of shearing and age en the incidence of caseous lymphadenitis in Australian sheep flocks. Acta Vet. Scand, 84, 101-3.

Paton MW, Rose IR, Hart RA, Sutherland SS, Mercy AR, Ellis TM, Dhaliwal JA, 1994. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculozis* reduces wool production. Aust Vet J, 71, 47–49.

Paton MW, Sutherland SS, Rosa LR, Hart RA, Mercy AR, Ellis TM, 1995. The spread of *Corynebacterium pseudotuberculozis* infection to unvacci-nated and vaccinated sheep. Aust Vet J, 72, 266-69.

Paton MW, Walker SB, Rose IR, Watt GF, 2003. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. Aust Vet J, 81, 91–5.

Paton MW, 2000. Applying the experience of CLA in the Southern Hemisphere. In: Proceedings of the Moredun Research Institute/ScottishAgricultural CollegeWorkshop on Caseous Lymphadenitis, 3-15.

Paule BJA, Azevedo V, Moura-Costa LF, Freire SM, Regis LF, 2004. SDS-PAGE and Western blot analysis of somatic and extracellular antigens of *Corynebacterium pseudotuberculozis*. Med Biol Sci J, 3, 44-52.

Peel MM, Palmer GG, Stacpoole AM, Kerr TG, 1997. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. Clin Infect Dis, 24, 185–91.

Pennisi E, 2010. Synthetic Genome Brings New Life to Bacterium. Science, 328, 958-59.

Pépin M, Seow HF, Corner L, Rothel JS, Hodgson AL, et al. ,1997. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of Corynebacterium pseudotuberculosis differing in virulence. Vet Res, 28, 149-63.

Pepin M, Paton M, Hongson AL, 1994. Pathogenesis and epidemiology of Corynebacterium pseudotubeculosis infection in sheeep. Curr. Topics Vet Res, 1, 63-82.

Petrovsky N, Aguılar JC, 2004. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. Immunology and Cell Biology, 82, 488–96.

Pinho JMR, Dorella FA Coelho KS, Fonseca CT Cardoso FC, Meyer R, Portela RWD, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V, 2009. Immunization with Recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* Heat-Shock Protein (Hsp)-60 is Able to Induce an Immune Response in Mice, But Fails to Confer Protection Against Infection. The Open Veterinary Science Journal, 3, 22-7.

Piontkowski MD, Shivvers DW, 1998. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. J Am Vet Med Assoc, 212, 1765–68.

Purves WK. Sadava D. Orians GH, 2004. Life: The Science of Biology. 7th ed. W H Freeman, 52.

Reich R, Blumenthal M, Liscovitch M, 1995. Role of phospholipase D in laminin-induced production of gelatinase A (MMP-2) in metastatic cells. Clin Exp Metastasis, 13, 134–40.

Riegel P, Ruimy R, De Briel D, Prevost G, Jehl F, Christen R, Monteil H, 1995. Taxonomy of Corynebacterium diphtheriae and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov, nom. rev. FEMS Microbiol Lett, 126, 271–76.

Rigdon RH, Schadewald T, 1972. Bacteriological and pathological study of animals given Freund adjuvant. Appl Microbiol, 24, 634–37.

Romero-Pérez, Luglio JC, 2004. *Corynebacterium pseudotuberculozis* lymphadenitis in a young patient. Rev Clin Esp, 204 (7), 388-9.

Routzahn KM, Waugh DS, 2002. Differential effects of supplementary affinity tags on the solubility of MBP fusion proteins. J Struct Funct Genomics, 2, 83–92.

Ruimy R, Riegel P, Boiron P, Monteil H, Christen R, 1995. Phylogeny of the genus *Corynebacterium* deduced from analyses of small-subunit ribosomal DNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol, 45, 740–46.

Ruiz JC, D'Afonseca V, Silva A, Ali A, Pinto AC, 2011. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculozis* strains. PLoS ONE, 6, 18551.

Saygı Ş, 2003. Deneysel Toksikolojide Toksisite Testleri ve Test Sonuçlarının Önemi. Gülhane Tıp Dergisi, 45(3), 291-98.

Saygı Ş. Deniz G, Kutsal O, 1997. Concomitant Usage of High Dose of Acetaminophen with Therapeutic Dose of Ketorolac, and Their Toxic Effects in Rats. ACTA Pharmaceutica Turcica, 39 (4), 149-153.

Seddik I, Timawy El, El-Amrousi AA, Zaki S, El-Allawy MM, Aziz TCK, 1983. Some studies on caseous lymphadenitis of sheep in Upper Egypt. Assiut Vet Med J, 11, 99–106.

Selim SA, 2001. Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 48, 241-58.

Y Komiya, Iwaki M, 2008. Properties of corynephage attachment site and molecular epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* isolated from humans and animals in Japan. Jpn J Infect Dis, 61, 116-22.

Seyffert N, Guimaraes AS, Pacheco LGC, Portela RWD, Bastos BL, Dorella FA, Heinemann MB, LAge AP, Gouveia AMG, Meyer R, Miyoshi A, Azevedo V, 2010. High seroprevalenceof caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins- based ELISA. Res Vet Sci, 88, 50-5.

Shigidi MTA, 1979. A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. Br Vet J, 135, 172–77.

Shuman S, 1994. Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. J. Biol. Chem, 26, 32678-84.

Siddhanta A, Backer J.M, Shields D, 2000. Inhibition of phosphatidic acid synthesis alters the structure of the golgi apparatus and inhibits secretion in endocrine cells. J Biol Chem, 275, 12023-031.

Sivakumar SM, Mohammed M, Safhia M, Sukumaran NK., 2011. Vaccine adjuvants – Current status and prospect on controlled release adjuvantcity. Saudi Pharmaceutical Journal, 19, 197–206.

Soares SC, Trost E, Ramos RTJ, Carneiro AR, Santos AR, Pinto AC, Barbosa E, Aburjaile E, Ali A, Diniz CAA, Hassan SS, Fiaux K, Guimarães LC, Bakhtiar SM, Pereira U, Almeida SS, Abreu VAC, Rocha FS, Dorella FA, Miyoshi A, Silva A, Azevedo V, Tauch A, 2013. Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi* strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production. Journal of Biotechnology, 167 (2), 135–41.

Songer JG, Lıbby SJ, Iandolo JJ, Cuevaswa WA, 1990. Cloning and Expression of the Phospholipase D Gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. Infectıon and Immunıty, 58 (1), 131-36.

Songer JG, Olson GB, Beckenbach K, Marshall MM, Keiley L, 1987. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculozis*. Am J Vet Res, 49, 223-26.

Songer JG, 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. Trends Microbiol, 5, 156-160.

Sorensen HP; Mortensen KK, 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 115, 113-128.

Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL, 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. Int J Syst Bacteriol, 47, 479–91.

Stanford K, Brogden KA, McClelland LA, Kozub GC, Audibert F, 1998. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. Can J Vet Res, 62, 38–43.

Stefańska I, Gieryńska M, Rzewuska M, Binek M, 2010. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. Pol J Vet Sci, 13, 143-49.

Stills Jr HF, 2005. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. ILAR J, 46, 280–93.

Sutherland S.S. Ellis T.M, Mercy AR, Paton MW, Middleton H, 1987. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. Aust Vet J, 64 (9), 263–66.

Sutherland SS, Ellis TM, Paton MJ, Mercy AR, 1992. Serological response of vaccinated sheep after challenge with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Aust Vet J, 69, 168–9.

Sutherland SS, Speõjers EJ, Andres B, 1989. Comparison of the exotoxins of four strains *Corynebacterium pseudotuberculozis*. Res Vet Sci, 47, 190-94.

Takahashi TY, Mori H, Kobayashi M, Ochi N, Hiramune TK, 1997. Phylogenetic positions and assignment of swine and ovine corynebacterial isolates based on the 16 rDNA sequence. Microbiol Immunol, 41, 649–55.

Tambourgı DV, Sılva MS, Bıllıngton SJ, Gonc RM, Andrade A, Magnolı C, Songer J, Glenn BCW, 2002. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. Immunology, 107, 93–101.

Tashjian JJ, Campbell SG, 1983. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculozis:* an electron microscopy study. Am J Vet Res, 44, 690-93.

Ter Laak EA, Bosch J, Bijl GC, Screuder BEC, 1992. Doubleantibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. Am J Vet Res, 53 (7), 1125–32.

Tola S, Manunta D, Rocca S, Rocchigiani AM, Idini G, Angioi PP, Leori G, 1999. Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. Vaccine, 17, 2764–68.

Ural K, Alic D, Haydardedeoglu A.E, Cedden F, Guzel M, Ozyıldız Z, Cantekin Z, 2008. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Saanen×Kilis crossbred (White) goats in Ankara, Turkey and effective kanamycin treatment: A prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. Small Ruminant Research,77, 84–8.

Valli VEO, Parry BW, 1993. Caseous lymphadenitis. In: Pathology of Domestic Animals. Vol 3. 4th Edit. K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer, Eds, Academic Press, San Diego, 238-40.

Van den Bosch H, 1980. Intracellular phospholipases A. Biochim Biophys Acta, 604, 191–246.

Van Dijk, MCM, Postom F, Hilkmann H, Jalink K, Van Blitterswijk WJ, Moolenaar W.H, 1998. Exogenous phospholipase D generates lysophosphatidic acid and activates Ras, Rho and Ca2+ signalling pathways. Curr Biol, 8, 386–92.

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D, 2007. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. Microbiol Mol Biol Rev, 71, 495-548.

Waagner D, 1991. A.haemolyticum: Biology of the organism and diseases in man. Pediatr Infect Dis J, 10, 991-99.

Waite KA, Wallin R, Qualliotine-Mann D, McPhail LC, 1997. Phosphatidic acid-mediated phosphorylation of the NADPH oxidase component p47-phox. Evidence that phosphatidic acid may activate a novel protein kinase. J Biol Chem, 272, 15 569–78.

Walker J, Jackson HJ, Eggleton DG, Meeusen EN, Wilson MJ, Brandon MR, 1994. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculozis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. Infect. Immun, 62, 2562–67.

Walker JM, Rapley R, 2009. Molecular Biology and Biotechnology. Fifth Edition. Cambridge, Royal Society of Chemistry, 1-5.

Wanstrup J, Christensen HE, 1965. Granulomatous lesions in mice produced by Freund's adjuvant. Acta Path. Microbiol Scand, 63, 340–54.

Waters RV, Terrell TG, Jones GH, 1986. Uveitis induction in the rabbitby muramyl dipeptides. Infect Immunol, 51, 816–25.

Watts JL, Lowery DE, Teel JF, Rossbach S, 2000. Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. J Dairy Sci, 83, 2373–79.

Weissburg RP, Berman PW, Cleland JL, Eastman D, Farina F, Frie S, 1995. Characterization of the MN gp120 HIV-1 vaccine: antigen binding to alum. Pharm Res, 12, 1439–46.

Welsh CJ, Yeh GC, Phang JM, 1994. Increased phospholipase D activity in multidrug resistant breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun, 202, 211–17.

Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus Santos M, Trono JK, Peralta A, GoÂmez MC, RõÂos RD, Franzone PM, Sadir AM, Escribano JM, Borca MV, 1999. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice either orally or parenterally immunized with alfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. Virology, 25, 347-53.

Williamson LH, 2001. Caseous lymphadenitis in small ruminants. Vet Clin North Am. Food Anim Pract, 17, 359–71.

Wilson MJ, Brandon MR, Walker J, 1995. Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculozis*. Infect. Immun, 63, 206–11.

Xu YJ, Botsford MW, Panagia V, Dhalla NS, 1996,. Responses of heart function and intracellular free Ca2+ to phosphatidic acid in chronic diabetes. Can J Cardiol12, 1092–98.

Xu YJ, Panagia V, Shao Q, Wang X, Dhalla NS, 1996. Phosphatidic-acid increases intracellular free Ca2+ and cardiac contractile-force. Am J Physiol, 271, 651–59.

Yeruham I, Elad D, Van Ham M, Shpigel NY, Perl S, 1997. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli cattle: clinical and epidemiological studies. Vet Rec, 140, 423-27.

Yin J, Li G, Herrler RXG. Select What You Need: A Comparative Evaluation of the Advantages and Limitations of Frequently Used Expression Systems for Foreign Genes. Journal of Biotechnology. 2007;127: 335.

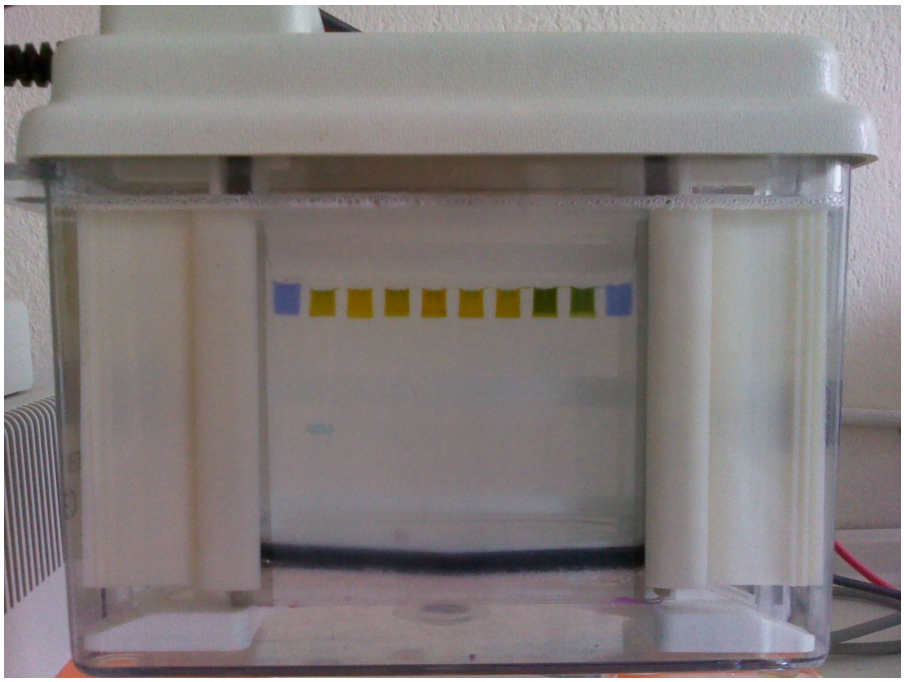
Zaitoun AM, Bayoumi AH, 1994. Some epidemiological studies on ovine pseudotuberculosis. Assiut Vet Med J, 31, 238–50.

Zhou MY, Gomez-Sanchez CE, 2000. Universal TA cloning. Curr Issues Mol Biol, 2 (1), 1-7.

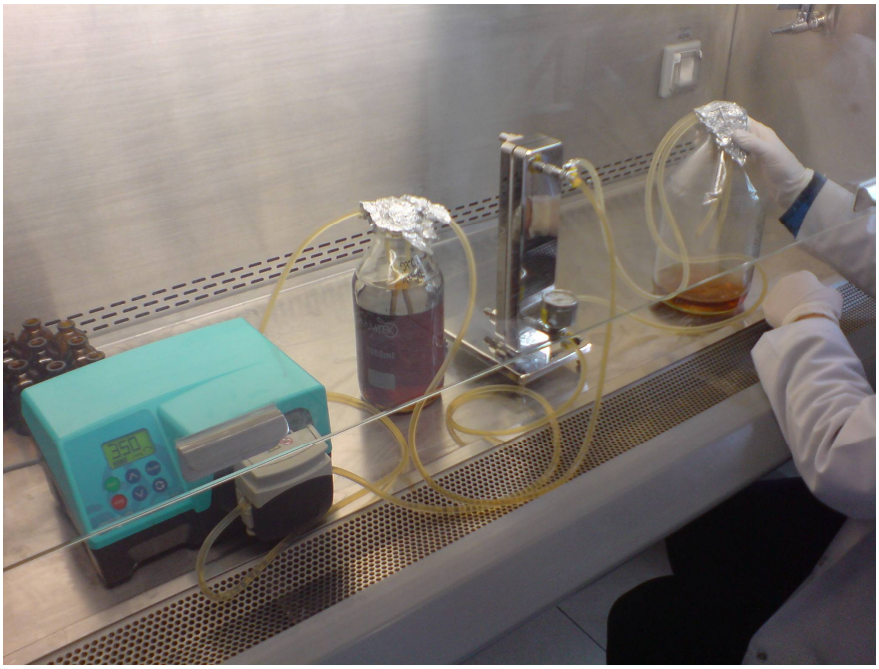
7. EKLER

EK-A: Etik Kurul Kararı

EK- B: Şekiller



EK-B 7.1. SDS-PAGE sistemi görünümü.



EK-B 7.2. Ultra filtrasyon sistemi.



EK-B 7.3. Kanlı agarda *E. coli* BL21(DE3)'ten RPLD toksin sentezi görünümü.



EK-B 7.4. Farede LD50 Belirleme Denemesi.



EK-B 7.5. Çelınç denemesinde apse görünümü.



EK-B 7.6. Aşılama çalışmasında kullanılan aşılar.



EK-B 7.7. Kuzuların bakım ve beslemesinin yapıldığı alan ve aşı çalışması.

8. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Konya'da tamamladı. 2003 yılında S. Ü. Veteriner Fakültesi'ne yerleştirildi, 2008 yılında mezun oldu. 2008 yılında S. Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında doktora öğremine başladı ve aynı yıl Araştırma Görevlisi olarak atandı. Halen S. Ü Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında görev yapmaya devam etmektedir.