T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİMDALI

Brucella melitensis Rev.1 ΔOmp 19
MARKER AŞI GELİŞTİRİLMESİ

Ali USLU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

KONYA-2020

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİMDALI

Brucella melitensis Rev.1 ΔOmp 19
MARKER AŞI GELİŞTİRİLMESİ

Ali USLU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

Bu Araştırma Selçuk Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Kordinatörlüğü tarafından 2015-ÖYP-116 proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA-2020

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmam sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Osman Erganiş'e, S.Ü Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD Öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. U. Sait Uçan, Prof. Dr. H. Hüseyin Hadimli, Doç. Dr. Zafer Sayın ve Dr. Öğr. Üyesi Aslı Sakmanoğlu'na, Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Gökçenur Sanioğlu Gölen'e, S.Ü Veteriner Fakültesi Parazitoloji ABD Öğretim üyeleri Prof. Dr. Ferda Sevinç, Araş. Gör. Dr. Onur Ceylan'a ve Araş. Gör. Ceylan Ceylan'a, Çalışma sırasında vektör dizaynı ve aktarım konusunda verdiği desteklerden ötürü Karatay Üniversitesi Tıp Fakültesi Tibbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araş.Gör Tuğçe Duran'a, Pendik Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsünde görevli Dr. Tuncay Çökülgen'e ve Vet.Hek. Cumhur Adıay'a, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Mühendisliği Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Bitkisel Biyoteknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nedim Mutlu'ya, Adnan Mendres Üniversitesi Tibbi Mikrobiyoloji Öğretim Üyesi Prof. Dr. Bülent Bozdoğana, Boston Children Hastanesi Doktora sonrası çalışanı Michael Gebhardt'a, Elektroporasyon Cihazında verdikleri destekten ötürü Konya Gıda Tarım Üniversitesi KİTARGEM bölümü Prof.Dr. Veli Cengiz Özalp'e ve ARGE sorumlusu Mert Sudağıdan'a tez projemin yürütülebilmesi için gerekli desteği sağlayan Selçuk Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim. Varlıkları ile destek olan değerli arkadaşlarım Araş. Gör.Sedat Aydoğdu ve Araş. Gör. Burak Mat'ayrıca teşekkür ederim.

Hayatı sıfırdan öğrenmemden meslektaşı olarak yetişmeme kadar desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Abim Vet. Hek. Ahmet Acar'a, süreç içerisinde veteriner hekimliğe başka bir ufuk ile bakmamı sağlayan Vet. Hek. Birhan Başak'a, uluslar arası alanda gerçekten bilim adamı olmama mihenk taşı olan Viyana Veteriner Üniversitesi At Dahiliye emekli bölüm başkanı Prof. Dr. Rene Van Den Hoven'a ve en önemlisi gerek hekim olarak gerek doktoramda her bilgi kırıntısından yararlandığım Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni Bölümü Prof. Dr. Mehmet Çalıcıoğlu'na şükranlarımı sunarım.

Farelerden nefret etmesine rağmen doktora sürecinde yaşadığım problemlerin farkında olarak "Farelerin bugün nasıl?" diye bile sorabilen yarı Veteriner Hekim

diplomasını hak eden annem Öznur Uslu'ya, yaptığın işi düzgün yap gerisini başaracağına şüphem yok diyerek çalışmanın en umutsuz anında yanımda olan Babam Mustafa Ali Uslu'ya ve başardığı işlerle her zaman gurur duyduğum kardeşim Vet.Hek. Muhittin Uslu'ya bu çalışmayı armağan ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISATLMALAR ix

ÖZET x

SUMMARY xi

1.GİRİŞ 1

1.1.Tarihçe 2

1.2. Etiyoloji 3

1.3.Epidemiyoloji 4

1.3.1.Brusellozis'in Dünyadaki durumu 4

1.4. Brucella aşıları 13

1.4.1. *B. abortus* S19 14

1.4.2.B. abortus RB51 14

1.4.3. *B. abortus* 82 aşısı 15

1.4.4. *B. melitensis* bv.1 Rev.1 aşısı 15

1.5.Antijenik bölgeleri 18

1.7.İmmun sistem ile olan ilişkisi 21

1.9. *B.melitensis* Omp 19 gen bölgesi 23

1.10.Brucella intihar plazmid ile in vitro mutasyonlar 24

1.11.Elektroporasyon 26

2. GEREÇ VE YÖNTEM 30

2.1. Gereç 30

2.1.1. Bakteriyel suşlar ve plazmid 30

2.1.2. OMP19 geni, *open reading frame* bölgesi biyoinformatik verilere göre değerlendirilmesi 30

2.1.3. Besiyerleri 30

2.1.4. Kullanılan kitler 32

2.1.5. Stok Solüsyonlar 34

2.1.6. DNA amplifikasyonu 35

2.1.7. Kullanılan cihazlar 37

2.1.8 Agar jel elektroforezi 37

2.1.7. Adjuvan 38

2.1.8. Fare materyali 38

2.1.9. Enzim linked immunosorbent assay (ELISA) 38

2.1.10. Rose Bengal Pleyt Test (RBPT) Antijeni 39

2.1.11. Serum Aglütinasyon Test (SAT) Antijeni 39

2.2 Yöntem 40

2.2.1. *B. melitensis* bv.1. Rev.1 Suş Seçimi 40

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon 40

2.2.3. PZR ürünlerinin jelden ekstraksiyonu 44

2.2.4. PZR ürünlerinin kesim enzimleri ile uç kısımlarından arındırılması 45

2.2.5. Kesilmiş 5'homoloji bölgesi ve 3' homoloji bölgesinin Not I bölgesinden ligasyonu 46

2.2.6. 5' ve 3'Homoloji bölgelerinin tek bir *insert* haline getirilmesi 46

2.2.7. pJQ200KS vektörünün çoğaltılması 47

2.2.8. Vektör izolasyonu 47

2.2.9. Vektör ve 5'+3' homoloji bölgesinin Sal I- Xho I kesim enzimleri ile muamelesi 48

2.2.10. Kesilmiş vektör ve kesilmiş *insert* 5'+3' homoloji bölgesinin ligasyonu 48

2.2.11.Ligasyon ürünün *E. coli* DH5α'ya ısı yoluyla transformasyonu 49

2.2.12. Mutant pJQ200KS taşıyan kolonilerin tespiti 50

2.2.13. Mutant vektör elde edilmesi 53

2.2.14. Kompetent Brucella hazırlanması 58

2.2.15. Elektroporasyon 59

2.2.16. Allelik değişim 64

2.2.17. Elde edilen mutantta gen delesyonunun doğrulanması 66

2.2.18. Aşı çalışması 68

2.2.19.Aşılı farelerin serumlarında antikor miktarının belirlenmesi 73

2.2.20. Mutantların pasaj stabilitesi 75

2.2.21. Etik kurul kararı 76

3.BULGULAR 77

3.1.*B.melitensis* bv.1 Rev.1 doğrulanması 77

3.1.1. Dye Test 77

3.1.2. Polimeraz zincir reaksiyonu 78

3.2. Omp19 5' ve 3'homoloji bölgelerinin PZR ile amplifikasyonu 79

3.3. Omp 19 5' ve 3'Homoloji bölgelerinin tek bir insert haline getirilmesi 81

3.4. Vektör ve 5'+3' homoloji bölgesi Sal I- Xho I kesim enzimleri ile muamelesi ve ligasyonu 82

3.5.Mutant Koloni Doğrulama Sonuçları 83

3.5.1. Mavi beyaz tarama 83
3.5.2. Mutant kolonilerin PZR ile doğrulanması 84
3.5.3. Vektörün aynı kesim enzimiyle kesilmesi 85
3.5.4. Sekans analizi 86
3.6. Gen Aktarımı 89
3.6.1. Mutant vektör elde edilmesi 89
3.6.2. Kompetent Brucella hazırlanma sonuçları 91
3.6.3. Elektroporasyon sonuçları 93
3.7.Allel değişimi 97
3.7.1. B.melitensis Rev.1 ΔOmp19 gen delesyonunun doğrulanması 97
3.7.3. Delesyonun dizi analizi ile doğrulanması 100
3.8. Hayvan Deneyleri Sonuçları 104
3.8.1. Seropotens sonuçları 104
3.9. Mutantların pasaj stabilitesi 112
4.TARTIŞMA 115
4.1.Refarans *B.melitensis* Rev.1'lerinin doğrulanması 116
4.2.Mavi-Beyaz koloni doğrulanması 116
4.3. Yoğun plazmid eldesinin değerlendirilmesi 117
4.4. Kompetent Brucella gen aktarımı değerlendirilmesi 117
4.5. Delesyon mutantlarının potensi 120
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 127
6.KAYNAKLAR 128
7.EKLER 138

EK-A:Etik Kurul Kararı 138

EK-B: Tez Sürecindeki Diğer Resimler 139

EK-C: Brucella ve Gen Delesyonu Tez/Yayın Listeleri 142

8.ÖZGEÇMİŞ 145

SİMGELER VE KISATLMALAR

AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	American Type Culture colection
BCV	Brucella Vakuolu
BSA	Bovine Serum Albumin
CFT	Komplement Fikzasyon Testi
CFU	Koloni oluşturan Birim
DIVA	Differentiating infected from vaccinated animals
DNA	Deoksiribonükleik asit
ELISA	Enzim Linked İmmunosorbent Assay
FAO	Gıda Tarım Örgütü
GMP	İyi Üretim Uygulamaları
HRP	Horse Radish Peroksidaz
IFA	Incomplete Fraund Adjuvan
Ig	İmmunglobulin
Kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolisakkarit
MCS	Çoklu Klonlama Bölgesi
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Teskilatı
Omp	Outer Mmembran Proteini
O-PS	Oligo-polisakkarit
ORF	Open Reading Frame
PBS	tamponlu fosfat çözeltisi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyon
R	Rough
RBPT	Rose bengal Plate Testi
S	Smooth
SAT	Serum Aglütination Testi
SÜVF	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
TLR	Toll-like reseptör
TNF	Tümor Nekrozis Faktör
TOB	Tarım ve Orman Bakanlığı
USDA	Amerika Tarım Departmanı
V	Volt
WHAIS	Dünya Hayvan Sağlığı Bilgi Sistemi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Δ	Delesyon
Ω	Ohm

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Brucella melitensis Rev.1 ΔOmp 19 Marker Aşı Geliştirilmesi

Ali USLU

Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/KONYA-2020

Brusella, birçok konak üzerinde etkili hücre içi zoonoz bir patojendir. Canlı attenüe suş olan *B. melitensis* Rev.1aşı suşu, piyasada koyun-keçi brusellozisine karşı en etkin aşı suşudur. Koruma gücü açısından koyun-keçilerde hatta sığırlarda güvenle kullanılabilmektedir. Ancak koyun-keçilerde saha enfeksiyonlarından/aşılamaya bağlı oluşan antikorları ayırt edebilmesine yönelik etkin bir aşı suşu olmamakla ile birlikte birçok çalışma mevcuttur. Brusella dış membranında bulunan Omp19 proteini hem virulans hem de koruma ile ilişkili bir antijendir.

Bu çalışmada 534 bp uzunluğunda Omp19 ORF silinmesi için 5've 3' homoloji bölgesini bulunduran pJQ200KS isimli intihar plazmidi elektroporasyon ile penisilin, ampisilin ve glisin ile sferoplast haline getirilen *B. melitensis* Rev.1'lere aktarımı sağladı. Delesyonu doğrulanan mutant suştan (*B. melitensis* Rev.1 ΔOmp19) aşı hazırlandı. Fare modellerinde *B. melitensis* Rev.1 aşısı ile etkinlik, immün temizlenme ve Omp19 bölge delesyonunun yarattığı enfeksiyonlardan ayrımının kıyaslanması amaçlandı.

Gen aktarım sürecinde *E.coli*'de mutant vektör oluşturmak için ışı şok transformasyon metodu X-gal'lı besi yerinde mavi beyaz koloni ayrımı, Brusella'ya gen aktarımı için elektroporasyon kullanıldı. Sferoplast dönüşümünü gözlemlemek için S.E.M. elektron mikroskobundan yararlanıldı. Mutant vektör ve delesyon mutantlar PZR ve dizi analizleri ile doğrulandı. Fare model denemeleri bireysel havalandırmalı kafes sistemi içerisinden yürütüldü.

Elektroporasyon sonucunda 17, 43, 44, 45 (glisin sferoplast) ve 19, 46 (ampisilin sferoplast) isimli denemelerde gentamisine dirençli *B. melitensis* Rev.1'ler tespit edildi. Fare modeli etkinlik denemelerinde, 3 ticari aşı OIE standartlarına uygun uyarım sağladığı tespit edildi. Delesyon mutantlarından 19 ve 44-10'nun uyarım gücü açısında ticari aşılarla benzer etkiliğe sahip olmasına karşın Omp19 proteini ile yapılan ELISA testinde negatif kontrolden farksız sonuç tespit edildi.

Çalışmada elde edilen 2 adet Rev.1 Omp 19 delesyon mutantı fare modelinde en az ticari aşılar kadar yeterli rezidüel virülans ve protektif immunite oluşmaktadır. Omp19 geni silinmiş *B. melitensis* Rev.1 ΔOmp19 suşundan aşı hazırlanılması ve kullanılması durumunda serolojik olarak Omp19 proteini taranmasına yönelik ELISA testleri ile aşılı/enfekte ayrımı (DIVA) yapılabileceği tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Brucella melitensis*, İntihar Plazmid, Gen Delesyonu, Marker Aşı, Fare Modeli

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY

SELCUK UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCE

Obtaining *Brucella melitensis* Rev 1 ΔOmp 19 as a marker vaccine

Ali USLU

Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology

Ph.D. THESIS / KONYA-2020

Brucella is an intracellular zoonotic pathogen that acts on many hosts. *B. melitensis* Rev.1, a live attenuated strain, is the most effective vaccine strain against sheep-goat brucellosis in the market. It can be used safely in sheep-goats and even cattle against antibody titer and challenge. However, there is not an effective vaccine strain in sheep-goats to distinguish antibody titer from field infections/vaccination, but there are many studies. The Omp19 region on the brucella outer membrane is both virulence and a protective antigen.

In this study, the suicide plasmid pJQ200KS, which contains 5 and 3 'homology region for the removal of 534 bp Omp19 ORF, was transferred to *B. melitensis* Rev.1, which was transformed into spheroplasts with penicillin, ampicillin, and glycine in electroporation. Vaccines verified deletion mutant mouse models in fields inTurkey *B. melitensis* Rev. 1 vaccines with activity aimed to infection by comparison of the distinction of the immune clearance of deletions and Omp19.In the gene, the transfer process, the blue and white colony separation was used in breeding the site with X-gal in the light shock transformation method to create a mutant a vector in E.coli, and electroporation was used for gene transfer to Brucella.S.E.M. to observe the spheroplast transformation. the electron microscope was used. Mutant vector and deletion mutants were confirmed by PCR and sequence analysis. Mouse model trials were conducted through the IVS cage system.

As a result of electroporation, gentamicin resistant *B. melitensis* Rev.1 was detected in trials named 17, 43, 44, 45 (glycine spheroplast) and 19, 46 (ampicillin spheroplast). In mouse model efficacy trials, 3 commercial vaccines were found to comply with OIE standards. Although the deletion mutants had similar efficacy with commercial vaccines in terms of stimulation power of 19 and44-10, the ELISA test with Omp19 protein showed no different results from the negative control.

The 2 Rev.1 Omp19 deletion mutants obtained in the study consisted of sufficient residual virulence and protective immunity as at least as commercial vaccines. With this study, it has been determined that if the vaccine is prepared and used from *B.melitensis* Rev.1 strain whose ΔOmp19 gene has been deleted, the vaccine / infected separation (DIVA) can be performed by ELISA tests for screening Omp19 protein.

Keywords: *Brucella melitensis*, Suicide Plasmid, Gene Deletion, Marker Vaccine, Mouse Model

1.GİRİŞ

Bruselloz, Dünya Sağlık Örgütü (WHO: World Health Organization), Gıda Tarım Örgütü (FAO: Food and Agriculture Organization) ve Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE: World Organisation for Animal Health) tarafından zoonoz bir hastalık olarak kabul edilmiştir (Spink ve ark 1962, Robinson ve Production 2003). Hastalık, Türkiye, Portekiz, İspanya, Yunanistan, İtalya ve Kuzey Afrika ülkelerinin de içinde bulunduğu Akdeniz havzası ile Arap yarımadasında, Hindistan, Rusya, Moğolistan, Kırgızistan gibi Asya ülkelerinde ve Meksika, Kolombiya, Brezilya gibi Amerika'nın orta ve güney kesimlerinde gözlenmektedir (Garin-Bastuji ve ark 1998, Goodwin ve Pascual 2016, OIE 2019).

Hayvanlar arasındaki enfeksiyon dağılımı ile insanlarda görülen enfeksiyon dağılımı paralellik göstermektedir. Türkiye'de 2012 yılında konjuktival aşıya geçiş ile tedricen azalan, enfekte çiftlik sayısına paralel olarak insan vakalarının azalması bu duruma en iyi örnektir (GTHB 2012, HSGM 2017). Enfeksiyonun kırsal kesimde hastalığın kentte yaşayan nüfusa göre daha sık ortaya çıkması, hastalığın ülkemiz için sorun olmaya devam ettiğini göstermektedir (Yumuk ve O'Callaghan 2012). Brusellozis, ağırlıklı olarak hayvancılığın yaygın yapıldığı ve hayvan hareketlerinin yoğun olduğu Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve İç Anadolu Bölgelerinde görülmekle birlikte, Türkiye'nin hemen her bölgesinden vaka bildirilmektedir (OIE 2019). Brusellozis'i Sağlık Bakanlığının "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirimi Sisteminde A Grubu Bildirimi Zorunlu Hastalıklar" listesinde, Tarım ve Orman Bakanlığı (TOB) "İhbari Mecburi Hastalıklar" listesinde sığır Brusellozu ikinci sırada, koyun keçi Brusellozu sekizinci sırada yer almaktadır (HSGM 2017, TOB 2019).

Brusellozis tüm memelilerde özellikle ruminantlarda, testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek, kronik, bulaşıcı, yangısal olarak seyreden infertilite ve süt verim kayıplarına sebep olan, zoonoz karakterde bir enfeksiyondur (Xavier ve ark 2009). Enfekte hayvan materyalleri ile temas riski olan veteriner hekimler, çobanlar, hayvan bakıcıları, mezbaha çalışanları, gıda sektöründe görev alan personel ve laboratuvar çalışanları Brusellozis açısından riskli grubu oluşturmaktadır (Doganay ve Aygen 2003).

Enfeksiyon Türkiye'de, mal hastalığı, peynir hastalığı ve akdeniz ateşi olarak isimlendirilmekte, dünyada ise genelde malta ateşi, dalgalı ateş ve Bang humması olarak bilinse de günümüzde tüm Dünya'da "Brusellozis" olarak kabul görmüştür (Zammit ve Scicluna 1905, Yumuk ve O'Callaghan 2012).

Konumu gereği, geleneksel tarım uygulamaları, hayvan hareketleri ve mücadele yönetmeliklerinde zaman içerisinde farklılıklara bağlı olarak Türkiye'de enfeksiyon yüzyıllardır gözlenmektedir.

1.1.Tarihçe

Milattan önce 76 yılı Ağustos ayında Herculaneum/İtalya'da volkan patlaması sonucu yanan antik şehirde kömürleşen peynir kalıntılarında Brucella etkenlerine rastlanmıştır (Godfroid ve ark 2005). Etken 1850'li yıllarda Kırım savaşı sonrası Malta adasında kalan İngiliz askeri sıhhiye servisi tarafından İngiliz askerler arasında hızlıca yayılması sonucu dikkat çekmiş, 1861 yılında Dr. Marston dalgalı ateşe sebep olan tifoid ateşi olarak tanımlamıştır. İlk defa Sir David Bruce tarafından 1887 yılında İngiliz bir askerin dalağından izole edilmiş ve *Micrococcus melitensis* isimlendirilmiştir (Bruce ve ark 1887). Ancak insanların nasıl enfekte oldukları gizem olarak kalmış, havanın bulaşma yolu olabileceği belirtilmiştir. Bu süreçte Profesör Almoth Wright bakteri kültürünü kullanarak Widal aglütinasyon tekniği ile hastalığı teşhis etmiştir (Wyatt 2005). Dr. Caruana Scicluna keçi sütlerinde etkenin bulunabildiğini belirtmiştir. Dr. Themistocles Zammit 1904 yılında keçilerden 6'sından 5'inin seropozitif olduğunu tespit etmiştir. Dr. Zammit; seronegatif olan keçiyi 18 Eylül-3 Aralık 1904 tarihleri arasında *Micrococcus melitensis* kültürü ile beslemiş sonrasında 23 Aralık 1904 yılında ve 29 Nisan 1905 yılında yaptığı testlerde seropozitif olduğunu tespit etmiştir. Enfekte hayvanın sütünü yavru maymuna verdiğinde, yavru ateşlenerek yaşamını kaybetmiş, tüm organlarında etkene rastlanmıştır (Zammit ve Scicluna 1905). Yapılan deneylerde, Malta keçilerinin enfeksiyona dirençli olduğu ve herhangi bir şekilde semptom şekillenmeden etkene spesifik antikorların oluştuğu gözlenmiştir. Ancak bu hayvanların sütleri ile yoğun bir şekilde etken saçtıkları ve hijyenik olmayan tüketilen sütlerin askerler için enfeksiyon kaynağı oluşturdukları tespit edilmiştir. Bakterinin ismi Mayer ve Shaw tarafından 1920 yılında Dr. Bruce onuruna *B. melitensis* olarak değiştirilmiştir (Mayer 1920). Danimarkalı Dr. Bernhard Bang

1897 yılında sığır abort vakalarından etkeni izole etmiş ve bu patojenin koyun keçi ve atları enfekte edebildiğini gözlemlemiştir (Simms ve Muth 1934, Williams ve ark 1954). Dr. Jacob Traum 1914 yılında yavru domuzlardan etkeni izole etmiştir (Graham ve Michael 1935). Evans 1918 yılında insan abort vakasından izole ettiği etken ile Brucella'nın hayvan ve insanlar arasında aynı etkiyi yaptığı ve zoonoz olduğunu göstermiştir (Vassallo 1992). Hayvanlarda 1938 yılına gelindiğinde etken koyunlarda *B. melitensis*, sığırlarda *B. abortus*, domuzlarda *B. suis* olarak tanımlanmıştır (El-Sayed ve Awad 2018). Hastalık tarih boyunca Cebelitarık ateşi, Girit ateşi, Malta humması, Dalgalı ateş, Tifoid ateşi, Akdeniz ateşi, Müfreze hastalığı, Gang hastalığı, Traum ateşi gibi isimler ile anılsa da günümüzde Brucellozis olarak isimlendirilmektedir (Wyatt 2016).

Türkiye'de hastalık, konumu gereği uzun yıllardır bulunsa da kayıtlı veriler sınırlıdır. Kırım savaşı sırasında Osmanlı sınırları içinde yer alan bölgede bulunarak Brucella enfeksiyonu geçiren hemşire Florence Nightingale veri oluştursa da Türkiye'de insanlarda kayıtlı ilk Brucella izolasyonu, kuleli askeri hastanesinde tedavi gören bir askerden, Dr. Hüsamettin Kural ve Dr. Mahmut Sabit Akalın tarafından 1915 yılında yapılmıştır (Young 1995, Yumuk ve O'Callaghan 2012). Dr. Berke tarafından 1931 yılında Türkiye'de sığırlarda ki ilk Brucella vakası tespit edilmiştir (Celik 1937). Koyunlarda ilk Brucella vakası ise Köylübağ ve Aktan tarafından 1944 yılında kayıtlara geçmiştir (Doğuer ve Yılmaz 1963, Aydın ve ark 2006). Dr. Golem 1949 yılında 22 hastanın 21'inden *B. melitensis* birinden *B. abortus* izole etmiştir (Golem 1949).

1.2. Etiyoloji

Küçük, hareketsiz, spor oluşturmayan, mikroskobik olarak Gram-negatif, kokobasil (0.5-0.7µm X 0.5-1.5 µm boyutlarında), makroskobik olarak ise kanlı agar ve Brucella agar üzerinde parlak renkli koloni görünümüne sahiptir. Genellikle aerobik ortamda ürer ancak *B. abortus* ilk izalosyonda %5-10 CO_2 ihtiyaç duyar. *Brucella* spp. *α-2* Proteobacter ailesi üyesi olup, konakçı spesifitesi ve antijenik yapısına göre 6 farklı türe ayrılır. *B. melitensis* koyun ve keçilerde, *B. abortus* sığırlarda, *B. suis* domuzlarda, *B. ovis* koçlarda, *B. canis* köpeklerde, *B. neotomae* çöl ağaç ratlarında enfeksiyona sebep olmaktadırlar. Deniz memelilerinde enfeksiyona sebep olan Brucella türlerinin (*B. pinnipediae* ve *B. cetaceae*) taksonomik

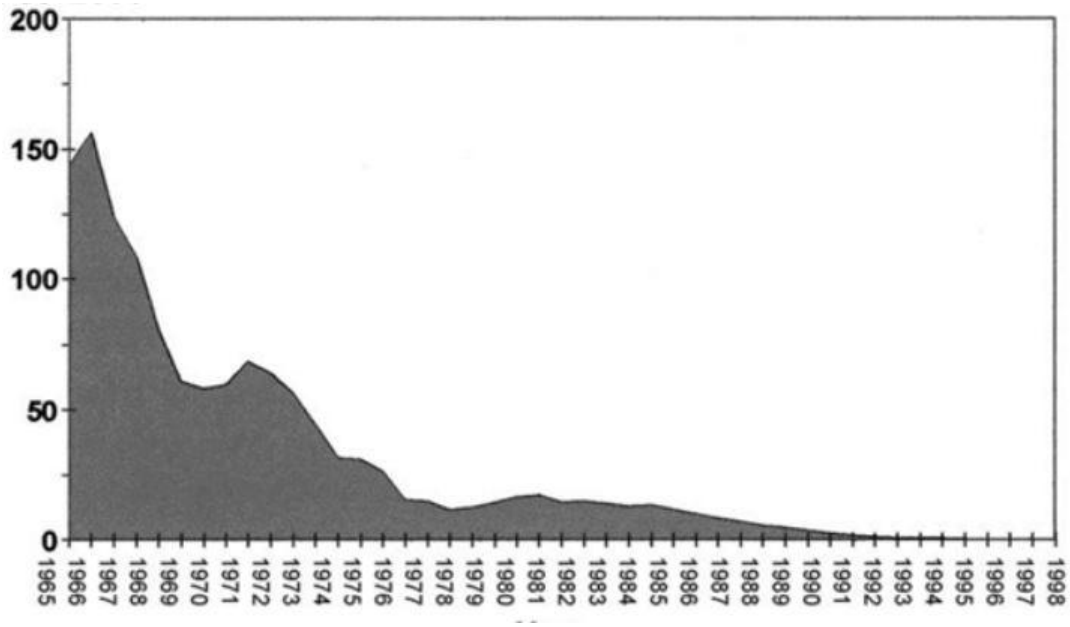
sınıflandırma çalışmaları devam etmektedir. Tarla farelerinden, *B. microti* izole edilmiştir (Markey ve ark 2013). Yeni bir tür olan *B. inopinata* kadınlarda meme implatından izole edildiği bildirilmiştir (Scholz ve ark 2010). *B. papionis* isimli etken baboonlardan izole edilmiştir (Whatmore ve ark 2014). *B. vulpis* isimli etken kızıl tilkiden izole edilmiştir (Scholz ve ark 2016). Brucella türlerinin, *Ochrobactrum* spp., *Agrobacterium* spp. *ve Rhizobium* spp. ile yakın genetik akrabalığı bulunmaktadır (OIE 2009, Markey ve ark 2013, Hasanjani-Roushan ve ark 2014). Manchester sınıflandırmasına göre, *B. abortus* 7, *B. melitensis* 3, *B. suis* 5 biyovara ayrılmıştır (Gargani ve Lopez-Merino 2006). *B. suis* biyovar 3, 3100 kb büyüklüğünde tek kromozoma sahip iken, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. suis* biyovar 1 türleri 2100 kb ve 1150 kb büyüklüğünde 2 kromozoma sahiptir (Cole ve Saint-Girons 1999, Hasanjani-Roushan ve ark 2014).

1.3.Epidemiyoloji

1.3.1.Brusellozis'in Dünyadaki durumu

Brusellozis Avrupa, Asya, Afrika, Orta ve Güney Amerika'da ruminantlarda yaygın olup, Avustralya, Kanada, Kıbrıs, Danimarka, Finlandiya, Hollanda, Norveç, İsveç, Yeni Zelanda ve İngiltere gibi ülkeler sığır Brusellozisinden aridir. Koyun keçi Brusellozisinde ise Amerika, Yeni Zelanda, Avustralya, İngiltere ve Kuzey Avrupa ülkeleri ari durumdadır (Robinson 2003, OIE 2009).

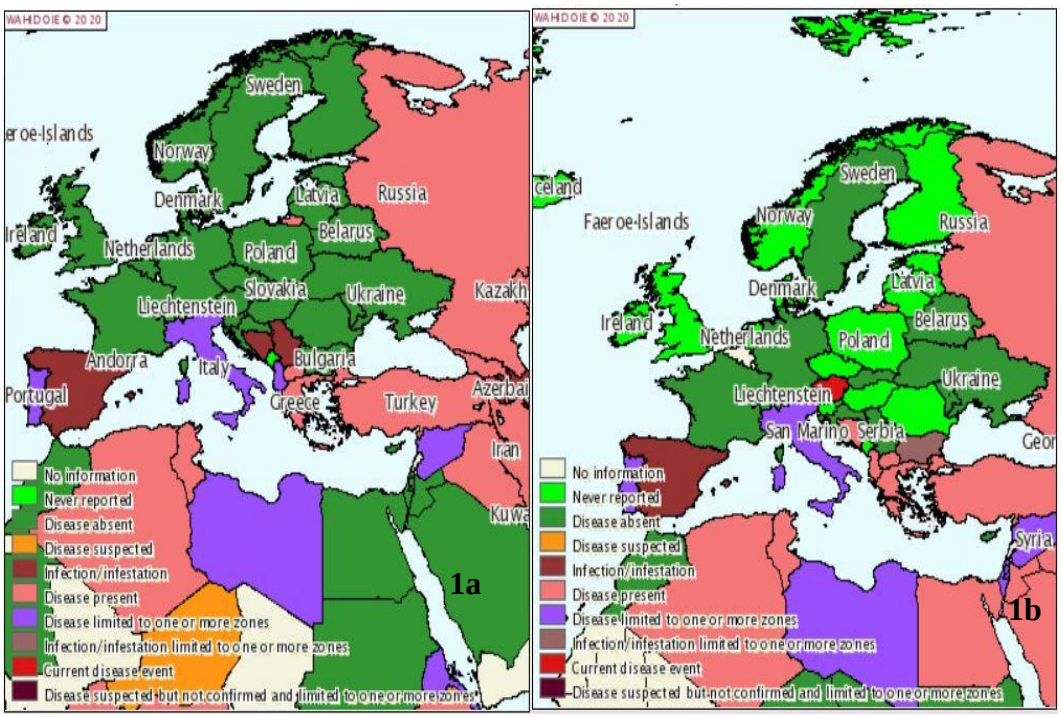
Amerika Tarım Depertmanı (USDA) ve Amerika Hayvan ve Bitki sağlığı servisi 1934 yılında ilk taramayı gerçekleştirmiş ve toplam hayvan varlığının %11,5'inde Brusellozis tespit edilmiştir. Ulusal Eradikasyon Programı 1956 yılında başlayan bünyesinde 124 000 işletmenin enfeksiyona sahip oluğunu bildirilmiştir. Enfekte sürü sayısı 1992 yılında yapılan taramalarda 700'e inmiş ve 1 Mart 2002 tarihinde 50 eyalette çiftlik hayvanlarında Brusellozu eradike etmişlerdir. Program hala aktif olarak devam etmektedir. Program çerçevesinde yılda 2 milyon hayvan serosurvey ile taranmaktadır. Güven aralığı %95 olacak şekilde 2002 yılı değerlendirmesinde prevelansın %0,002 olduğu belirlenmiştir. Ancak halen Yellowstone tabiat parkında bizon ve geyiklerde görüldüğü bildirilmiştir (Ragan 2002)(Şekil 1.1).



Şekil.1. 1. Amerika Birleşik Devletlerinde 1995-2000 yılları arasında sığırlarda Brusellozis seyri (Ragan 2002)

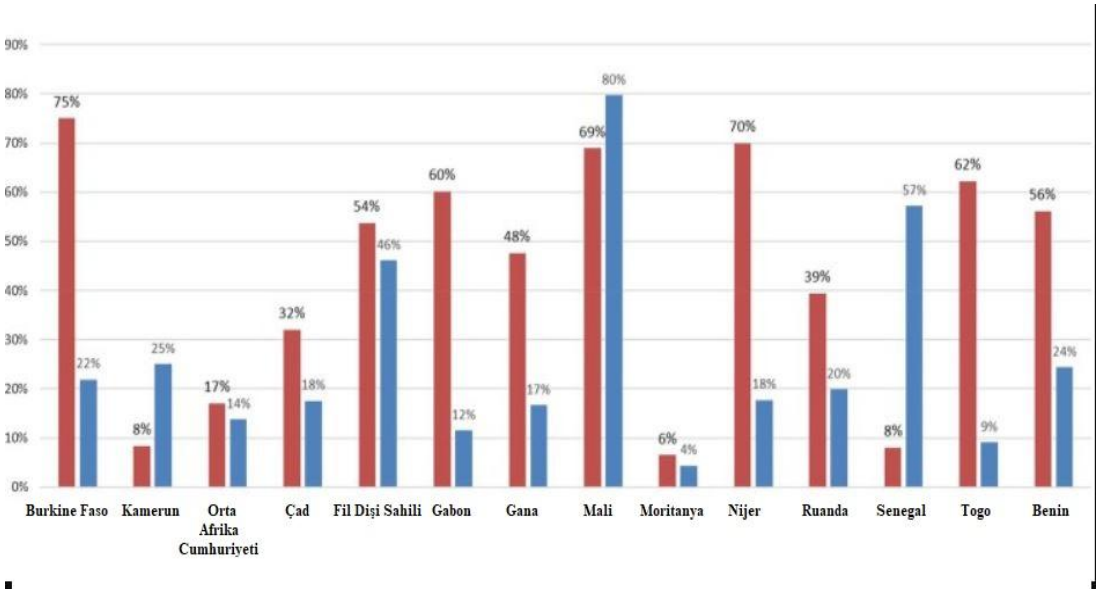
Avrupa Birliği (AB) Brusellozis ile mücadele için kurdukları heyet sığır, koyun ve keçi Brusellozunun Avrupadan eradikasyonu için SANCO/6095/2009 numaralı eradikasyon tüzüğünü hazırlamıştır. İzlenen yol OIE tüzükleri temel alınarak hazırlanmış, AB Veteriner işleri tüzüğü kapsamlı olarak salgın anından eradikasyona kadar basamak basamak ifade edilmiştir. Avrupa ülkelerinin çoğu Brusellozis'ten aridir. Tüzüğe göre İtalya, Kıbrıs, Portekiz, İspanya ve Malta hastalıkla mücadele için 2009 yılında fon ile desteklenmiştir (EUAC 2009). İrlanda 2009 yılında arilik statüsü kazanmış bir AB ülkesidir. Brusellozis ile mücadeleye 1965 yılında başlanmış, 1980'li yıllarda programın aksatılmasına bağlı olarak enfeksiyon tekrar artmış, 1998 yılında tekrar sıkı kurallar zinciri takip edilerek arilik statüsü kazanmıştır (Erganis 2013, Stanley 2013). AB tarafından desteklenen eradikasyon programı ile 2007-2011 yılları arasında süren serosurveyde Hırvatistan hayvan varlığı kontrol edilmiş ve yıllar içerisinde prevalans %0 bulunmuştur. Tüm analizler AB tarafından fonlanmış ve sadece 250 000 hayvanın serolojik izleme için 200 bin Euro harcanmıştır (EUHCD 2013). OIE 2018 verilerine göre Avrupa'da Fransa hariç Akdeniz havzası ülkelerinde hastalık bildirilmiştir (Şekil 1.2). Avusturya'da 2018 yılında sığırlarda *B. melitensis* vakası görülmüş, tüm sürü kesime tabi tutulmuştur. Tüm bölge enfeksiyon yönünden taranmış, aynı Veterinerin Hekimin hizmet verdiği başka bir işletmede bir sığır seropozitif bulunmuştur. Kültür sonucunda etken izole edilememiş, 4 aylık yavrusu seronegatif bulunmuştur. İki

işletme arasındaki bulaşma sebebinin Veteriner Hekim eliyle iatrojen yolla olduğu tespit edilmiş olup ilk odağın çıkış noktası ise hala belirlenememiştir. Bölgede, enfeksiyon kaynaklı bir Veteriner Hekim olmak üzere 5 insan vakası tespit edilmiş ve izole edilen etkenlerin aynı genetik yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Veteriner hekimin çalıştığı 164 işletme serosurvey sonucu negatif bulunmuştur (Herzog 2018).



Şekil.1. 2. OIE 2018 yılı itibariyle Avrupa'da ki Brusellozis enfeksiyon durumu *B. abortus* (1a), *B. melitensis* (1b); açık yeşil hiç hastalığın görülmediği, yeşil; hastalığın artık o ülkede bulunmadığı, turuncu; hastalık şüphesi bulunduğu, bordo; enfeksiyonun bulunduğu, pembe hastalığı, mor; hastalığın belirli zonlarda sınırlandırıldığını, kırmızı mevcut şartlarda hastalığın bulunduğunu bildirmektedir

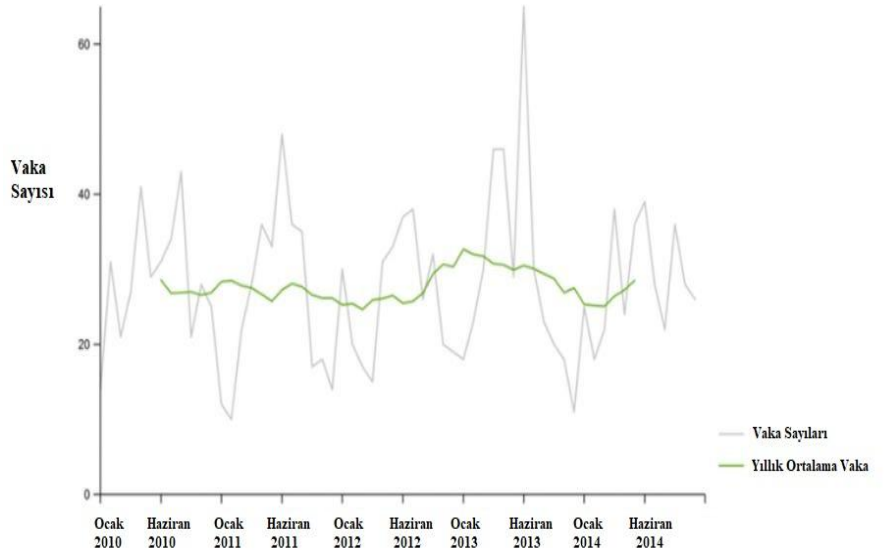
FAO, Türkiye'nin de arasında olduğu ortak proje ile Orta Doğu'da koyun keçilerde Brucella eradikasyon programı başlatmıştır. Tacikistan genelinde prevalansı %9'dan %2'nin altına indirmeyi başarmıştır (El Idrissia 2014). Suriye, Irak ve İran'da yaşanan iç karışıklık ve düzenli veri akışının sağlanamaması sebebi ile veriler bulunmamakta ve bulunan verilerde gerçeği yansıtmamaktadır. Afrika'da hastalığın yaygın olarak seyretmesinde koyun keçi yetiştiriciliğinin geleneksel yollarla yapılıyor olması koruma ve kontrol önlemlerinin alınmaması ana etkendir (Ducrotoy ve ark 2017).



Şekil.1. 3. Afrika ülkelerinde Brusellozis prevalans oranları (1993-2013 yılları)

Tüm Asya ülkelerinde çiftlik hayvanlarında Brusellozis yaygın olarak gözlenmesine karşın Avusturalya, Yeni Zellanda, Japonya ve diğer Pasifik ada ülkelerinin enfeksiyondan ari olduğu bildirilmektedir (OIE 2019).

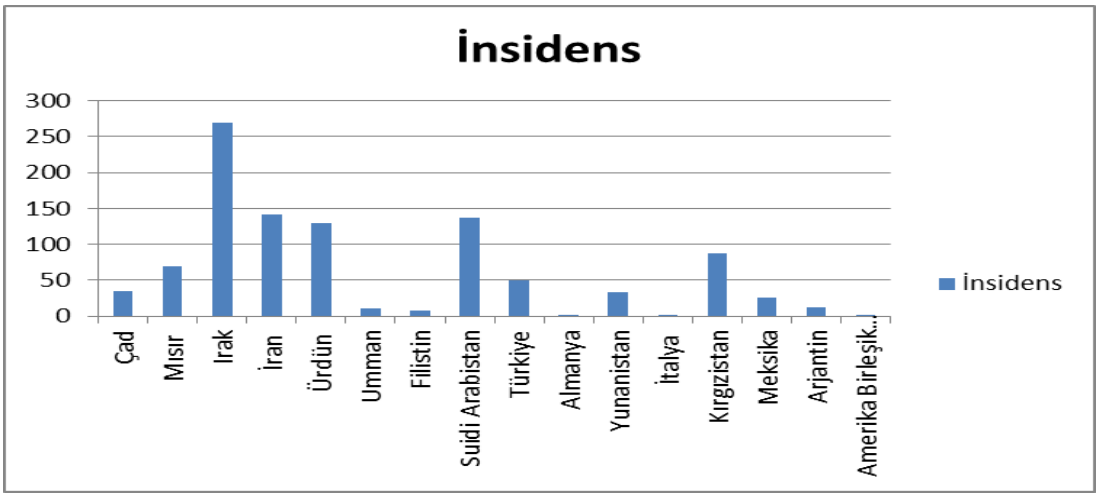
ABD'de insanlarda yıllık yaklaşık 100 Brusellozis vakası görülmektedir (CDC 2018). AB'de 2014 yılında geriye dönük yapılan epidemiyolojik bir çalışmada 18 AB üyesi ülkenin yıllık verileri göze alınarak toplam 354 doğrulanmış vaka tespit edilmiştir. Vakalar İspanya, Portekiz ve Yunanistan gibi ülkelerde yoğunluk kazanmaktadır ki, bu veri 100 000 populasyonunda %0,1'dir. Almanya'da ise 2014 yılında oluşan vaka sayısı (47 vaka) bir önceki yılın iki katıdır. Almanya'daki vaka sayısının bir kısmının Türkiye kökenli olduğu ve insanların tatil sırasında enfeksiyona yakalandıkları bildirilmiştir (Team 2013, Gilsdorf 2015).



Şekil.1. 4. AB üye ülkeleri arasında 2010-2014 yıllarında bildirilen Brusellozis vaka sayıları

Hastalığın endemik olduğu bölgelerde, hastalığın insanlardaki insidansı %0,2 seviyelerindedir. *B. melitensis* kaynaklı koyun ve keçi Bruselloz'unun meydana geldiği yerlerde İnsan Bruselloz'unun insidansı, daha yüksek oranlarda seyir etmektedir (Yumuk ve O'Callaghan 2012).

WHO 1990-2010 verileri temel alınarak sağlıklı veri gönderen ülkelerin sistematik tarama sonucuna göre popülasyon içerisinde 100 000 insanda görülme insidensi şekil 1.5'de verilmiştir (Dean ve ark 2012).

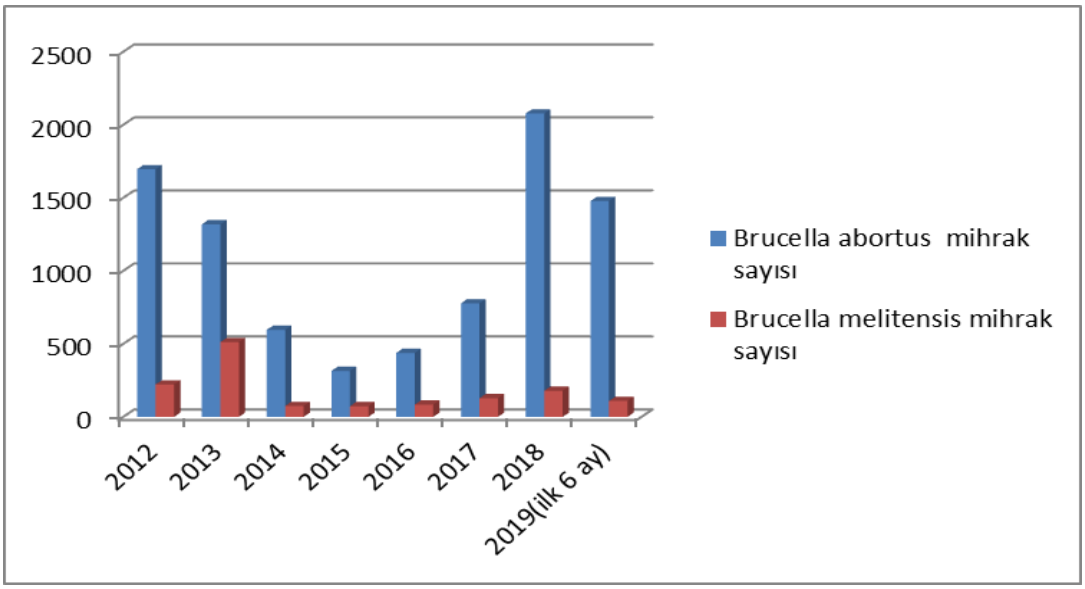


Şekil.1. 5. Bazı ülkelerde Brusellozisin insanlarda görülme oranları

1.3.2.Brusellozis'in Türkiye'de ki durumu

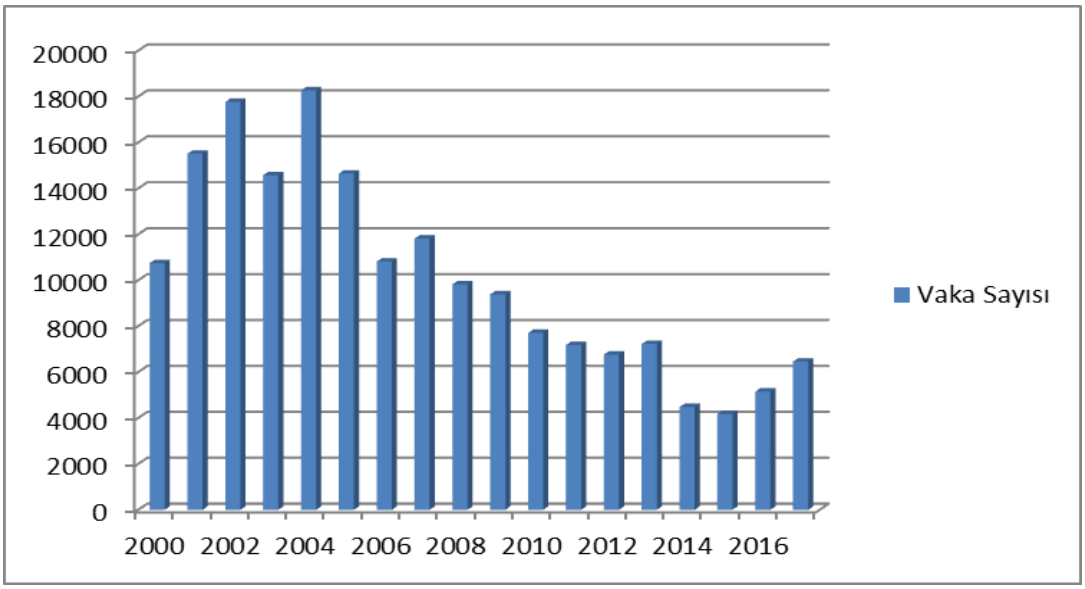
Türkiye'de özellikle hayvancılıkla uğraşanlarda ve Veteriner Hekimlerde görülme oranı (%1,3-%26,7 prevalans) yüksektir (Erganis 2012). Sağlık Bakanlığı verilerine göre; 2002 yılında 17 553, 2003 yılında 14 572 ve 2004 yılında 18 264 bireyde enfeksiyon tespit edilmiştir (HSGM 2017).

Bruselozis için 1984 yılında Ulusal Eradikasyon Planı uygulanmaya başlanmıştır. Beş yıl sonra (1989) yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre; sığırlarda enfeksiyon prevalansı %3,56, koyun-keçilerde ise prevalans %1,26 olarak tespit edilmiştir (Iyisan ve ark 2000). Enfeksiyonun prevalansı 1990 yılında yapılan serosurveyde %1,2 ve %2,02, 1991 yılında yapılan serosurveyde %1,01 ve %1,83, 1998 yılında yapılan serosurveyde %1,43 ve %1,97, 2011 yılında yapılan serosurveyde ise %2,7 ve %3,4 olarak tespit edilmiştir. Konjuktival aşıya 2012 yılında geçiş sonrasında OIE resmi sitesinde Dünya Hayvan Sağlığı Bilgi Sistemi (WAHIS; World Animal Health Information System) ara yüz programında sadece bildirimi yapılan mihrak sayılarına erişilmektedir. Bu tahmini prevalans hesaplanmasına olanak tanımamaktadır. Elde edilen veriler ışığında hem *B. abortus* hem de *B. melitensis* görülen mihrak sayısı 2015 yılına kadar tutarlı bir şekilde azalmasına karşın yapılan 2016 yılından itibaren mihrak sayısı tekrar artmaya başlamıştır. Hastalık 2019 yılı ilk 6 ayı itibariyle *B. abortus* olarak 1478 mihraka, *B. melitensis*'te 109 mihraka ulaşmıştır. Son yarıyıl ve 2020 yılına ait veri bulunmamaktadır (Şekil 1.6) (OIE 2019).



Şekil.1. 6. Tarım ve Orman Bakanlığı konjuktival aşıya geçiş sonrası bildirilen mihrak sayıları (OIE 2019)

Türkiye'de Brucella prevalansı insanlarda tam olarak bilinmemekle birlikte, 1995-2005 yılları arasında yapılan serosurveye göre; Afyon'da (%15,7), Malatya'da (%2,9), Denizli'de (%6,5), Kayseri'de (%3,4), Bolu'da (%1,3) ve Van'da (%26,7) düzeyinde seyrettiği bildirilmiştir (Yumuk ve O'Callaghan 2012). Türkiye'nin farklı kırsal kesiminde yaşayan sağlıklı görünen 832 kişide yapılan serosurveyde, prevalans %3 bulunmuştur (Kose ve ark 2006). Türkiye'de Brusellozis, hastalığın zoonoz karakteri ve çiftlik hayvanlarını hedef alması sebebi ile kırsal kesimde en sık rastlanan enfeksiyonlardan biridir (Bodur ve ark 2003). Hastalığın görülme sıklığı bölgelere göre Güneydoğu Anadolu, Doğu Anadolu, İç Anadolu, Ege, Akdeniz, Karadeniz ve Marmara bölgeleri olarak sıralanmaktadır (Selçuk 2006). Konjuktival aşı uygulamalarının yürürlüğe girmesi ile birlikte azalan hayvan Brusellozis vakaları paralelinde insan vakalarında da azalma olmuştur. Ancak 2016 yılından itibaren hayvanlar arasında hastalığın artması ile birlikte insanlarda da Brusellozis artış gösterdiği gözlenmiştir (HSGM 2017).



Şekil.1. 7. Türkiye'de insan Brusellozis vakalarının yıllara göre seyri (2000-2017)

1.3.3.Hastalık ile mücadele

Türkiye'de Brusellozisin kontrol ve eradikasyonu için çalışmalar 1930 yılında başlamıştır. İlk resmi Brusella teşhis laboratuvarı 1951 yılında FAO/WHO Ortadoğu Brusellozis adı ile Merkezi Etlik Veteriner Kontrol Enstitüsü (Etlik VKE) bünyesinde kurulmuş, ve daha sonra 1957 yılında Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsüne (Pendik VKE) taşınmıştır. 1960 yılında enstitü bünyesinde devlet destekli olarak S19 aşısı üretilmeye başlanmıştır. FAO bünyesinde 1965 yılında koyun hastalıkları teşhis birimi kurulmuş ve 1969 yılında *B. melitensis* Rev.1 aşısı üretimine başlanmıştır (Karagül 2017). Rev.1 aşısı Elberg tarafından etkinliği belirlendikten 12 yıl sonra Türkiye'de kullanılmaya başlanmış ve halen de kullanılmaktadır. Türkiye'de özel sektör bazlı Brusella aşısı üretimi yapan iki adet kuruluş bulunmaktadır; Vetal A.Ş 1991 yılında kurulmuş, 2004 yılında ruhsatlı Brucella aşısı üretimine başlamış ve 2018 yılında GMP sertifikasyon aşamalarını tamamlamıştır. Dollvet 2003 yılında kurulmuş, 2009 yılında ruhsatlı Brucella aşısı üretimine başlamış ve GMP sertifikalı aşı üretimi sertifikasına sahiptir (Erganiş 2013). Bakanlık, gerekli gördüğü hallerde bu iki kuruluştan aşı satın almaktadır.

TOB'lığı tarafından ülkesel çapta hastalığın eradikasyonu için 1984 yılında **"Ulusal Brusella Kontrol ve Eradikasyon Projesi"** yürürlüğe konmuş ve 26 yıl boyunca doğan dişi sığır, koyun ve keçi yavrularının uygun yaş aralığında aşılanması hedeflenmiştir, 2010 yılına gelindiğinde sürü prevalansını %1'in altına çekip test kesim ile eradikasyon yoluna gidilmesi amaçlanmıştır. Proje kapsamında 1989 yılına

Türkiye genelinde yapılan serosurveylerde Brusellozis'in prevalansı sığırlarda %3,56, koyun ve keçilerde ise %1,26 bulunmuştur (GTHB 2012). Aşılamaya devam edilmesi ve hastalık odaklarının sınırlarının çizilmesine rağmen geçen 20 yıllık süre içerisinde enfeksiyonun prevalansı artış göstermiştir.

Çizelge 1.1. Türkiye'de yıllara göre Brusellozis prevalansları

Sero-Survey	**Sığırlarda Brusellozis Prevalansı (%)**		**Koyun-Keçi Brusellozis Prevalansı (%)**	
Yılı	**Fert**	**Sürü**	**Fert**	**Sürü**
1998	1,43	11,4	1,97	15
2011	2,7	7,8	3,4	22,5
2012	-*	-*	4,7	30
2017	-*	-*	2,1	12,34

*TOB'lığı, GKGM sadece koyun-keçi verileri talep edilmiştir.

Bu sebeple TOB, GKGM tarafından 12.01.2012'de "Brusella'nın Konjuktival Aşı ile Kontrol ve Eradikasyonu Projesi" başlatılmıştır. Proje sığırlarda 10, koyun-keçilerde 6 yıllık sürecek şekilde planlanmıştır. Yaygın aşılama sürecinde (aşılı-enfekte ayırımı serolojik olarak yapılamadığından dolayı) serolojilik izlemelerin yapılmayacağı, aşılama etkinliklerinin atık azaltılması temelli izleneceği, nihai değerlendirmenin proje sonunda yapılacak serosurvey sonuçlarına göre karar verileceği belirtilmiştir. Proje, sığırlarda 6-12 aylık dönemde çift doz, koyunlarda 3-6 aylık yaşlarda tek doz aşılama üzerine kurulmuştur. Parenteral (genç ve ergin) aşı uygulamalarından vazgeçildiği süre sonunda yapılacak serosurveyde aşıya bağlı seropozitiflik istenmemiştir (GTHB 2012).

Hollanda, Ekonomik İlişkiler, Tarım ve Yenilik Bakanlığı ile TOB arasında yürütülen 2012 yılında ki çalışmaya göre fert ve sürü prevalansı sırasıyla %4,7 ve %30 olarak tespit edilmiştir. Takip eden dönem 2017 yıllında %22 beklenen prevalans ve %95 güven aralığına göre numune alınmışıtır. Bu kapsamda 81 ilde 1118 işletmeden toplamda 28 169 koyun ve keçiden kan serumu incelenmiş fert ve sürü prevalansı sırasıyla %2,1 ve %12,34 olarak tespit edilmiştir (GKGM 2018).

Yeni eradikasyon planı öncesinde 2017 yıllarında yapılan serosurvey sonuçlarına göre Brusselloziste tekrar artış tespit edilmiştir. GKGM 2019/6 yeni eradikasyon planına göre; 2 yıl sürecek, üçüncü yıl serosurvey ile prevalans

belirlenecektir. İller 2017 yılındaki verilere göre 3 bölgeye ayrılmıştır; Daha önce kısmi eradikasyonun sağlandığı ve hayvan hareketlerinin daha kontrollü olduğu Trakya da; 3-6 aylık dönemindeki genç aşılama devam edecek aşılama kayıtlarına bakılarak, aşı kaydı bulunmayan ergin sığırlarda aşılacaktır. Bu süreçte gebe olan hayvanlar, doğum sürecinin sonunda aşılanacaktır. Anadolu'da hayvan hareketlerinin buna bağlı hastalığın yoğun olduğu illerde; (Ağrı, Ankara, Ardahan, Bayburt, Çankırı, Erzincan, Erzurum, Kars, Konya, Sivas) gençlerde aşılamaya 2012 yılındaki mevzuatta belirtildiği şekilde devam edilecek, ergin sığırlarda aşı kayıtlarına bakılmaksızın tüm sığırlar aşılanacaktır. Gebelikte ise doğum süreci beklenecek ve aşılama tamamlanacaktır. Diğer Anadolu illerinde ise aşılama 2012 yılındaki planda belirtildiği gibi sadece genç aşılama yapılacak, ergin sığırlarda aşılama yapılmayacaktır. Ayrıca isteyen yetiştiricilerin birinci doz aşılamada Bakanlığın bilgisi dâhilinde 3-6 aylık dişi buzağılara ilk aşılamalarını *B. abortus* S-19 ile deri altı olarak uygulayabilecekleri belirtilmiştir. Farklı olarak hastalık mihraklarında aşılama üzerinden 1 yıl geçtikten sonra yapılan serosurveylerde Komplement Fikzasyon Testi (CFT) ile 30 EEC'den yüksek titreler pozitif olarak kabul edileceği ve hayvanların şartlı kesime tabi tutulacağı belirtilmiştir. Meralarda kullanılan damızlık boğaların 6 ay aralıklar ile serosurvey ile taranacağı bildirilmiştir. Ayrıca, sonuçlar ile ilgili halkı ve Veteriner Hekimleri bilgilendirmek amacı ile basın bildirileri ve eğitimlerin verileceği belirtilmiştir (TOB 2019).

Atılan bu adımlar hastalığın mevcut durumunun kabullenilmesi açısından önemlidir. Ancak Brusellozis ile mücadele sadece mihrak sayılarının bildirildiği ve gerçek prevalansın bilinmediği Türkiye'de 2 yıl gibi kısa bir sürede %1'in altında bir prevalans hedeflemek gerçekçi görünmemektedir. Bahsi geçen 2 yıl süreye ek olarak 1 yılda serosurvey yapılması için beklenecektir. Hastalığın endemik olarak seyrettiği illerde antikorlar kaybolsa bile 3 yıl içerisinde enfeksiyonun ortadan kalkması mümkün gözükmemektedir. Brusella aşılamasının enjeksiyonla tercih edildiği mücadele de antikorların kaybolmasının ortalama 18 ay sürdüğü bildirilmektedir (Erganis 2019).

1.4. Brucella aşıları

Dünyada pek çok aday brusella aşı geliştirme çalışması mevcuttur. Bunlar ölü aşılar, attenüe aşılar, sub-unit aşılar, DNA aşıları, bölge delesyonlu mutant aşılardır

(Liu 1995, Yang ve ark 2013). *B. abortus 45/20* (R koloni) ve *B. melitensis* H38 formları, ölü aşı suşlarına örnek olarak gösterilebilir. Bu aşıların çelınçda koruma düzeyi düşük olup, uzun süren kalıcı antikor titresi oluşumuna sebep olmaktadırlar (Hasanjani-Roushan ve ark 2014).

1.4.1. *B. abortus* S19

Attenüe *B. abortus* S19 aşı suşu ilk olarak 1923'te geliştirilmiştir. Sığırlarda aşı olarak kullanımı 1925 yıllıdır. Sonra ki 8 yıl boyunca birçok suş attenü edilmiştir. Çeşitli çalışma grupları oluşturulmuş ve buzağı iken aşılanan sığırlar ikinci gebeliklerine kadar aşının koruma gücü açısından takip edilmiştir (Buck 1930). Dünyada ve Türkiye'de kabul görmüş bir aşı suşu olup koruma gücünün %70 üzerinde olduğu bildirilmiştir (Lubroth ve ark 2007). Deri altı yolla dişi buzağılarda 3-6 aylık dönemde $5\text{-}8x10^{10}$ dozunda, ergin sığırlarda $3x10^{8}$ dozunda kullanılmaktadır. Konjuktival yolla uygulandığında 3-6 aylık dönemde ve 12-14 aylık dönemde $5x10^{9}$ dozunda çift doz uygulanmaktadır (Ragan ve ark 2013). Bizon ve geyik gibi yaban hayatında *B. abortus*'a karşı etkin olarak koruma sağladığı bildirilmiştir (Davis ve Elzer 1999).

1.4.2.B. abortus RB51

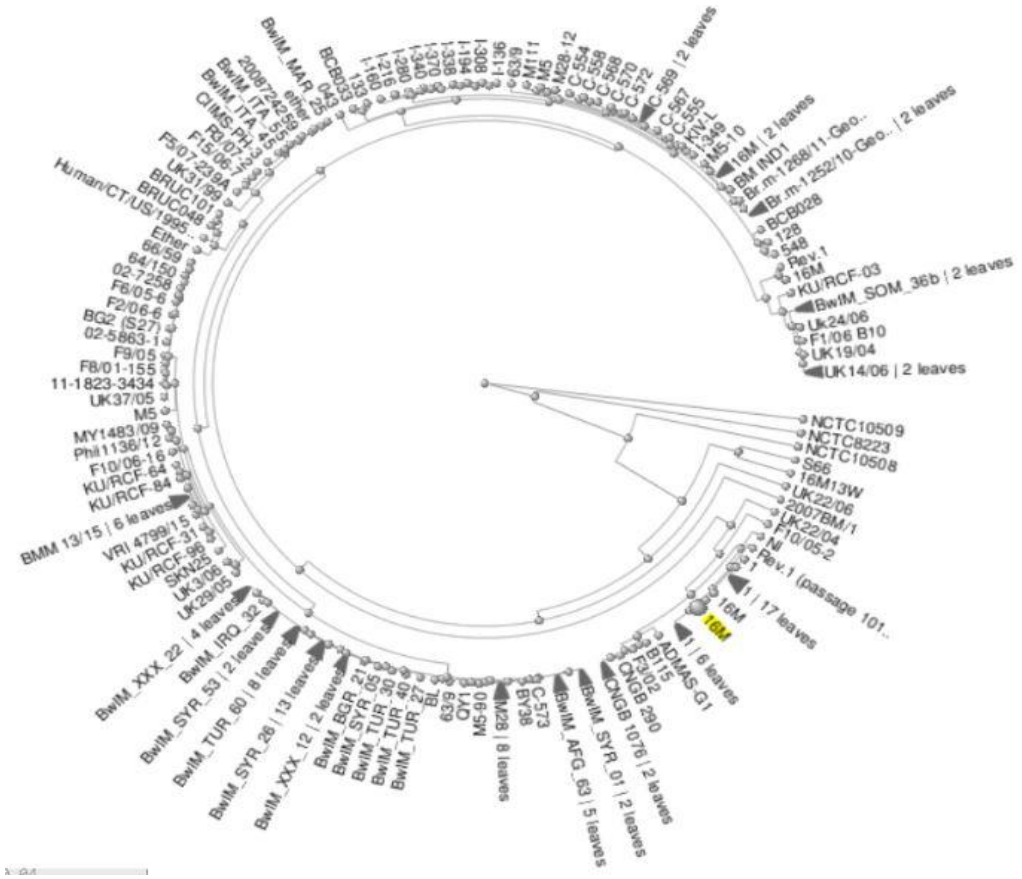
B. abortus RB51 aşısı ise rifampin dirençli rough koloni tipli *B. abortus* 2308 suşu pasaj mutantı olup, O-Polisakkarit (O-PS) yapısına sahip değildir ve erithritolu kullanabilir (Sangari ve ark 1994, Hasanjani-Roushan ve ark 2014). Sığırlar Brusellozis enfeksiyonundan korunmada kullanılan smooth koloni formunda *B. abortus* S19 ile hazırlanan canlı attenüe aşı suşunda 702 bp büyüklüğünde eritritol katabolik geninin bulunmadığı bildirilmektedir. *B. abortus* S19 aşının 1 yaşından büyük hayvanlara uygulanması sonucunda kalıcı titrelere bağlı aşılı enfekte ayrımı yapılamamaktadır. Ayrıca gebelerde abortlara, erkeklerde kalıcı orşitis ve eklem bozukluklarına sebep olmaktadır. RB51 yapısında O-PS bulunmaması sebebiyle serolojik testlerle enfekte aşılı ayrımı daha kolaydır ve bu sebep ile ABD, Meksika, Arjantin ve Şili gibi Amerika kıtası ülkelerinde aşılama çalışmalarında kullanılmaktadır (Stevens ve ark 1994).

1.4.3. *B. abortus* 82 aşısı

Rusya'da kullanılan bir aşı suşu olup S ve R koloni oluşturabilir. Bu koloni yapısı ile RB51'e benzer (Erganis 2012).

1.4.4. *B. melitensis* bv.1 Rev.1 aşısı

Herzberg ve Elberg (1953) virülent *B. melitensis 6056* suşunun streptomisin içeren besi yerinde seri pasajı sonucunda attenüe S koloni *B. melitensis Rev.1* suşunu elde etmişlerdir (Yang ve ark 2013). Elberg tarafından 1970 yılında orijinal Rev.1 suşu pasajlanarak pasaj 101 suşu elde edilmiş ve günümüzde master seed olarak kullanılmaktadır (Banai 2002). Gelişen teknolojiler ve dizi analizleri ile *B. melitensis* Rev.1 ve virülent *B. melitensis* 16M suşları karşılaştırılmış ve %99,9 uyumlu bulunmuştur. Oluşan %0,1'lik değişikliğin 5 adet gen eklenme bölgesi ve 3 adet gen silinme bölgesinden kaynaklandığı ve attenüasyonda Mer R geninde meydana gelen değişimin rol oynadığı tespit edilmiştir (Salmon-Divon ve ark 2018). Koyun keçilerde koruma oranı yüksek olmasına rağmen insan için patojendir. Ayrıca gebelerde kullanımına bağlı olarak abort şekillenebilmektedir (Pishva ve Salehi 2008). O-PS yapısına sahip olmasından dolayı serolojik testlerde aşılı/enfekte ayrımında problemlere sebep olmaktadır (Marín ve ark 1999). Ayrıca aşılama sonrası 60 güne kadar kan dolaşımında bulunarak kalıcı bakteriyemiye ve hayvanlar arasında saçılıma sebep olmaktadır (Kojouri ve Gholami 2009).



Şekil. 1.7. *B. melitensis* Rev.1'in genetik ve taksonomik olarak sınıflandırılması (NCBI 2018)

Brucella'nın immünojen özellik gösteren yüzey proteinleri rekombinat sub-unit bölge olarak sentezletilmiş ve etkinlik düzeylerine bakılmıştır. Sub-unit aşıların, gebe hayvanlarda risk oluşturmamasının yanı sıra, insanlar içinde güvenilir olduğu bildirilmektedir. Ancak insanlar faz çalışmalarını geçmiş sub-unit Brucella aşısı bulunmamaktadır. Ayrıca *Brucella* türleri arasındaki homoloji sebebiyle türler arası koruyuculuk sağladığı belirtilmektedir. Sub-unit olarak tercih edilen bölgeler; Bp26, Tig, InfC, L7/L12, Omp16, Omp19, Omp25, Omp28, Omp31, P39, S-adenosyl-1-homocysteine hydrolase, DnaK, Sur A ve Sod C'dir (Montaraz ve Winter 1986, Bosseray 1991, Toth ve ark 1995, Tibor ve ark 1998, Tibor ve ark 1999, Ribeiro ve ark 2002, Yang ve ark 2005, Xinghong ve ark 2006, Grilló ve ark 2009). Ancak tüm bu bölgelerin koruyuculukları sınırlı olmakla beraber etkinliklerinin ise <2 $\log_{10}$ koruyuculuk ünitesinden düşük olması etkili bağışıklık için tekrarlayan uygulamalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Çünkü Brucella hücre içindeki fagozom sistemlerinden kolayca kurtulabilmesi sebebiyle korunmada hücresel bağışıklığı sağlayacak aşıların kullanılması gerektir (Gorvel ve Moreno 2002). Fare deneme

gruplarından elde edilen sub-unit aşı sonuçları olumsuz olsa da, hedef hayvanlarda daha anlamlı sonuçlar alınabilineceğine dikkat çekilmiştir (Yang ve ark 2013).

DNA aşıları humoral ve hücresel bağışıklığı uyarması Brucella mücadelede çeşitli modellerde denenmiştir. *B. melitensis* Omp 31 gen bölgesini içeren pCI plazmidi ile hazırlanan aşı, hücresel ve humoral bağışıklığı çok az uyarmıştır (Commander ve ark 2007). *B. abortus* L7/L12 insan sitomegalovirüs (CMV) (pcDNA3) plazmid promotoru kullanılarak, farelerde tek doz kas içi uygulanmış hücresel immün yanıt parametreleri olumlu bulunmuştur (Kurar ve Splitter 1997). *B. abortus* BLS geni içeren pcDNA plazmidi ile hazırlanan DNA aşısı ile hayvanlarda humoral ve hücresel yanıtın olumlu şekilde uyarıldığı bildirilmektedir (Babiuk ve ark 2003). Başka bir çalışmada, González-Smith ve ark (2006) süperoksit dismutaz geni taşıyan plazmid (*pSecTag-SOD*) ile aşılma sonrası *B. abortus* çelınca karşı ciddi koruma sağlamıştır. Brusellozis ile mücadelede DNA aşılarının etkinliğinin düşük bulunmasını; DNA aşılarının hücre içine aktarımını sağlayan sistemlerde başarısızlık, antijenik bölgenin plazmid sentezi sağlanan uyarım dozunu stabil olarak sağlamamasına bağlanmaktadır (Babiuk ve ark 2003, Leclercq ve Oliveira 2003, González-Smith ve ark 2006).

Mevcut *B.melitensis* Rev.1 suşunun hücre duvarlarında saha suşları gibi O-PS bulunması, aşılamalar sonrasındaki serolojik izlemeler ve aşılı/enfekte ayırımının klasik serolojik testlerle yapılamaması, eradikasyon kontrol çalışmalarını zorlaştırmaktadır. Bu sebeple çeşitli *B. melitensis* mutantları geliştirilmiştir. LPS için tasarlanan wbkF, per ve wa mutantları O-PS bölge delesyonu mutantları olup bu 3 mutantın etkinliğinin *B. melitensis* Rev.1 aşısından daha az olduğu belirtilmektedir. Rev.1 ile aşılanan gruplarda çelınç sonrası hiç abort gözlenmezken en iyi mutant adayı wbkF*'nin* abort oranı %38 civarında bulunmuştur (Barrio ve ark 2009, Yang ve ark 2013). Bir diğer R koloni rpoB mutantının, koruyuculuğu *B. melitensis* Rev.1 ile benzerken *B. abortus* RB51'e göre daha yüksektir. Farelerde *B. melitensis* LPS mutantı ile yapılan çalışmalarda, aşı etkinliğinin Rev.1 ile eşit olduğu ancak aşı dozunun Rev.1'den 1000 kat daha fazla olması gerektiği belirtilmektedir (Adone ve ark 2005). ZnuA mutantı ile yapılan oral immünizasyon çalışmasının sonuçlarına göre; bu aşının RB51'e göre koruma gücünün daha yüksek olduğu ve Brucella atenüasyonunda oral iletim yolunun da bir yöntem olarak kullanılabileceği

bildirilmektedir. Diğer immünojenik bölge mutantlarıyla ilgili çalışmalarda mevcuttur (Clapp ve ark 2011). Sıcaklık geni htrA bölgesi delesyon mutantı *B. melitensis* RWP5, hücre içi oksidative ölüm mekanizmasından kaçışta etkindir. Nötrofil ve makrofajlar tarafından etkisiz hale getirilip fetusta kolonize olmasına fırsat tanımadığı için gebe keçilerde abortlara sebep olmadığı bildirilmiştir. *purE* mutantının, keçilerde güvenilir olduğu belirtilmiştir (Phillips ve ark 1997). Omp25 mutantı ile yapılan çalışmalarda çelinç sonrası 8. haftada dalaktaki bakteri sayısının $>10^3$ koloni oluşturan ünite (CFU) olması sebebiyle kalıcı virülansa ve titreye sebep olmaktadır (Edmonds ve ark 2002).

1.5.Antijenik bölgeleri

Tüm Gram-negatif bakteriler hücre duvarı, dış membran, periplazmik boşluk ve sitoplazmik membrandan oluşmaktadır. Antijenik yapının belirlenmesinde dış membranı oluşturan üyelerin biyokimyasal içerikleri önemlidir. Brucella dış membranı lipopolisakkarit (LPS) yapısındadır. LPS, biyokimyasal olarak polisakkarit (kaprilik asit, mannoz, glukoz, glukozamine ve quinovosamine) ve lipid A yapısından oluşur. Brucella, O-PS bölgesini yitirmesi durumunda koloni tipi smooth (S) koloniden rough (R) koloni tipine dönüşmektedir. *B. canis* ve *B. ovis*'te doğal olarak bu bölge olmadığı için R koloni formu gözlenmektedir (Gargani ve Lopez-Merino 2006, Garin-Bastuji ve Blasco 2008) (Şekil 1.9).



Şekil.1. 8. *B.melitensis* Rev.1 aşısının sahip olduğu antijenik bölgeler

Brucella spp.*'nin* lipid A yapısı, antijenik olarak *Yersinia enterocolitica* O:9, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella*Typhimurium, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O:157, *Pseudomonas putida*, *Rickettsia prowazekii* ve *Ochrobactrum* spp. gibi bakterilerle benzerlik göstermektedir (Gargani ve Lopez-Merino 2006). Bu antijenik benzerlik, bazı serolojik testlerde yanlış pozitif sonuçlara sebep olmaktadır. Brucella'nın çeşitli bölgelerinde bulunan 140 proteini vardır bu proteinler; outer mebran proteinleri (10 adet), sitoplazmik proteinleri (75 protein), periplasma proteinleri (10 protein), sitoplazmik membran proteinleri (25 protein), ekstraselülar matriks proteinleri (2 protein) yanı sıra bölgesi bilinmeyen 18 proteinden oluşmaktadır (He ve Xiang 2010). Bu proteinler konak patojen ilişkisine göre koruyucu antijen, virulens faktör, görevi bilinmeyen proteinler olarak sınıflandırılırlar. Ancak bazı protein bölgeleri, sadece Brucella'ya özgü değildir. Örneğin xedD gen bölgesi Brucella'da kromozomal ayrımdan sorumlu iken *S. aureus* ve *E. coli*'de virülens faktörü olarak görev yapmaktadır (Chalker ve ark 2000). *Brucella* proteinleri içerisinde 5 protein bölgesi hem koruyucu hem de virülens özellik göstermektedir. Bunlar; DnaK (moleküler şaperon), Omp25 (outer membran protein), Tig (protein çeviriminden sorumlu şaperon), Sod C (ion transport

metabolizması), Omp19'dur (outer membran lipoprotein) (Hur ve ark 2011) (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Brucella proteinlerinin bakteri hücresindeki yeri

Sembol	Proteinin tanımı	Lokasyonu
BLS	Brucella lumazine sentez	Sitoplazma
L7/L12	Ribozomal protein L7/L12	Sitoplazma
P39	Seker bağlanma 39-kDa proteini	Periplazma
Bfr	Bakteriyoferritin	Sitoplazma
Bp26	Periplasmik immünojenik protein	Periplazma
DnaK	Moleküler Chaperon DnaK	Sitoplazma
IalB	İnvasyon protein B	Sitoplazmik membran
Omp16	Dış membran protein MotY	Dış membran
Omp19	Lipoprotein Omp19	Dış membran
Omp25	25 kDa dış membran immünojenik protein reseptörü	Dış membran
Omp31	OmpA benzeri transmembran bölgesi	Dış membran
SodC	Cu/Zn süperoksit dismutaz	Periplazma
SurA	Peptidil-prolil cis-trans izomeraz	Periplazma
Tig	Trigger Faktör	Sitoplazma

Virülensten sorumlu proteinlerin çeşitli seroaktiviteleri vardır. Sitoplazmik proteinler outer membran proteinlerine göre daha yüksek antikor yanıt oluşturmaktadır. Ayrıca oluşan antikor yanıt konakçıya özgüde olabilmektedir. Örneğin Brusellozisli keçi ve insanlarda *Omp 28* protein bölgesine karşı oluşan antikorlar tespit edilebilirken, domuz ve sığırlarda bu bölgeye karşı oluşan antikor

yanıt tespit edilememiştir (Cloeckaert ve ark 1993). Ayrıca α-2 Proteobacteria ailesinin hücre içi üyelerinin (*Brucella* spp.) outer membran yapısı, doğada serbest yaşayan üyelere göre (*Rhizobium* spp.) daha hidrofobik yapıya sahiptir (Velasco ve ark 2000).

1.6.Patogenez

Brucellozis'in sindirim sistemi yolu ile enfeksiyon oluşturabilmesi için oral $5x10^3$ adet *B. melitensis* alınımı yeterli olmasına karşın, *B. abortus* ve *B. suis*'te bu sayı sırasıyla 10^6 CFU ve 10^7 CFU civarındadır. İnsanlarda solunum yoluyla enfeksiyonun oluşabilmesi için 40 adet *B. melitensis*, 1 300 adet *B. abortus* ve 100 adet *B. suis* yeterli olmaktadır (Markey ve ark 2013). Brucella bakteriyemi sonrası bölgesel lenf yumrularına ve buradan da birkaç gün içinde kan dolaşımına ulaşır. Kanda 2-3 hafta kalır, bakteriyemi sonucunda organlara yayılır ve organlarda lezyonlar görülmeye başlar. Hastalık etkeni zamanla organlardan da çekilerek lenf yumrularına, ardından dalak, meme, iliakal lenf yumruları gibi lenfoid dokulara yerleşir ve varlığını sürdürür. Etken, özellikle memelere, gebe uterusa, lenf düğümlerine, testislere ve seyrek olarak da eklem, tendo kılıflarına ve bursalara yerleşir. Brucella, hücreye belli başlı temel zararlar vermeden fonksiyonlarını bozmadan hücre içi çoğalma yeteneğine sahiptir. Plasental trofoblast hücreleri normalde kortizon salınımı yapmaz ancak Brucella enfeksiyonu esnasında bu hücrelerden kortizon salınımı prostaglandin F2α miktarını artırır, progesteron miktarını ise azaltır ve buna bağlı olarak gebelik sonlanır (Enright ve Samartino 1994). Ayrıca eritritole olan affinitesi sebebiyle kotiledonlarda yoğun olarak bulunması plasentitise sebep olarak anne yavru arasında beslenme bozulmasına yavrunun oksijensiz kalarak abortun şekillenmesine sebep olur (Siadat ve ark 2012).

1.7.İmmun sistem ile olan ilişkisi

Brucella spp.'nin virülensında rol oynayan ana etkenler, bağışıklık sistemi hücrelerinden kaçıp konak hücrelerde canlı kalarak bölünebilmesinden ileri gelmektedir (Quinn ve ark 2011). Mukozal, sub-mukozal ve makrofaj, M hücreleri, nötrofil gibi hücrelere penetrasyon ile fagolizom füzyonu inhibe ederek, degranülasyon, myelo-peroksidaz sistemi aktivasyonu ve tümör nekrozis faktör (TNF) etkisiz hale getirerek virülensi sağlamaktadır (Ackermann ve ark 1988). Hücre invazyonu ise lektin ve fibronektin gibi reseptörlerle başlar ancak sadece

reseptörlerle sınırlı değildir. Siklik AMP miktarını artıran kimyasal ve toksinler invazyonu önlerken, siklik GMP miktarındaki artış ise Brucella hücre invazyonunu inositol fosfolipid yolunu aktive ederek artırmaktadır (Campbell ve ark 1994, Guzmán-Verri ve ark 2001). Tirozin kinaz ve MAP kinaz gibi hücresel kinazlarda bazı hücre penetrasyonlarında rol oynamaktadır. Brucella'nın sentezlediği siklik β-1, 2-glukan konak hücre membranı yağ katmanı ile etkileşip füzyonu önleyerek, bakterinin fagozom ve lizozom arasında canlı kalmasını sağlar (Arellano-Reynoso ve ark 2005). Fagolizom füzyonunu, adenin-guanin monofosfat ile inhibe eder. Makrofajda canlı kalma ve hücre içerisinde çoğalması ise ısı şok protein (17 kDa) ve asit indükleyici proteinine (28 kDa) bağlıdır. Ayrıca HtrA, RecA, Sod C proteinleri de hücre içi çoğalmada önemlidir. Brucella virülensi ile ilişkili proteinler (BvrR-BvrS) sistemi, özellikle *B. abortus* hücre invazyonu ve hücre içinde çoğalmasında önemli role sahiptirler. LPS ise hücre içi yaşamdan sorumlu bir diğer ana faktördür (Guzmán-Verri ve ark 2001, Gorvel ve Moreno 2002). LPS delesyon mutantları, hücre içi çoğalma ve bakteri stabilitesindeki azalmaya bağlı olarak virülens özelliğini kaybederler. Diğer hücre içi bakterilerin (Legionella, Rickettsia, Porphyromonas, Coxiella, Chlamydia, Agrobacterium) LPS yapıları yok olduğunda da benzer şekilde daha az endotoksite göstermişlerdir (Helander ve ark 1982, Amano ve ark 1987, Brade ve ark 1999). Tüm hücre içi bakteri LPS molekülleri, klasik LPS moleküllerinden farklı olarak Toll-Like (TLR) reseptör ve CD14 reseptör mekanizmalarını kullanmazlar. Brucella türleri, LPS molekülünü özellikle makrofajlarda çoğalırken sentezler ve normalde hücre içi enfeksiyona sebep olan ajanların sunulumu MHC I ile yapılırken ilginç bir şekilde LPS, MHC II ile immün sistem hücrelerine sunulur. Fagositik hücreler tarafından algılanan, Brucella LPS molekülü sadece antijen sunumundan görevli bir immünmodulatör değildir. Aynı zamanda yardımcı, T ve B hücreleri tetikleyerek humoral bağışıklığı ön plana çıkaran bir görevi de vardır (Gorvel ve Moreno 2002). *B. abortus* 2308'in LPS barındırmayan rough kolonili mutantları hücre içinde tip 4 sekresyon (T4SS) sistemini aktive edemediği için apopitozis önleyememiştir (Pei ve ark 2006). Brucella lipid A yapısı TLR-4 ile etkileşim kurmaktadır. Komplement C3 Gram-negatif bakterilerde hücre duvarı O antijeni serbest hidroksil bağlarına kovalent bağlanmaya meyilli olsa da, Brucella O antijeninde bu yapı polimerleştiği için komplementi aktive edemez (Caroff ve ark 1984).

Özetle smooth Brusella, organizmada bakteriyemi safhasını tamamlayıp makrofaj içerisine yerleşmeye çalıştığında ilk olarak Brucella LPS yapısı ve TLR etkileşimi ile hücre içine alınması sağlanır. Brucellalar bir vakuol içerisinde hücre içine alınır ve Brucella vakuolu (BCV) oluşturur (Celli ve ark 2003). EEA-1 ve Rab5 bu aşamada erken dönem hücre içi markerlar olarak görev yaparlar. Makrofajların nihai amacı Brucella etkenlerini lize etmektir. Sonraki olgunlaşma döneminde BCV etrafındaki markerler Rab7 ve LAMP-1'e dönüşür (Ahmed ve ark 2016). Son aşamada lizozom ile bağlantı kuracağı nokta kritiktir. Hücre proteolitik olan katepsin-D'yi BCV'ye boşaltmak isterken Brucella virB geni operonundan sentezlenen T4SS ile Brucella yaşam döngüsünü ele geçirir (Dohmer Pisani ve ark 2014). Hücre içi süreci BvrS/BvrR, LPS, siklik B-glukon, vjbR, BacA, flagellum benzeri yapı ve CD98hc ile yönetir (Sola- Landa ve ark 1998, Keriel ve ark 2014). Apopitozis veya otofaji ile hücre kendini sindirimini önler. Ayrıca hücreyi G1 fazında tutarak hücrenin yaşlanmasını da önler (De Bolle ve ark 2015). Endoplazmik retikulumdan salgılanan kalretukulin BVC içerisinde Brucella'nın çoğalmasına olanak tanır. Son aşamada vakuol içerisinde sayıca artan etkenler otofaji proteinleri, lizis veya lizis olmaksızın hücreden ayrılırlar ve bu şekilde hücre içi enfeksiyon döngüsü tamamlanır (Boschiroli ve ark 2002).

1.9. *B.melitensis* Omp 19 gen bölgesi

Outer membran proteinleri grup 1 (88-94 kDa), grup 2 (36-38 kDa), grup 3 (31-34 kDa ve 25-27 kDa) ve küçük outer membran proteinleri olarak sınıflandırılır (Gupta ve ark 2007). Omp 16, Omp 10, Omp 19 lipoprotein yapısındaki outer membran proteinleridir ve *Rhizobiacae* ailesinde bulunan bakteriler içinde antijenik determinat göstermektedirler. Bu lipoproteinler ile yapılan serolojik testlerde, *B. melitensis* ile enfekte koyunlarda daha güçlü antikor cevap alınırken, *B. abortus* ile enfekte sığırlarda bu liporoteinlere karşı daha zayıf bir antikor cevap alınmış olması, koyunlarda *Brucella* enfeksiyonlarında Omp19 bölgesinin antijenik ve serolojik önemini göstermektedir (Tibor ve ark 1999).

Salmonella vektör sistemi ve influenza vektör sistemi kullanılarak yapılan potens çalışmalarında yüksek derece korunmuş antijenik protein yapısı olarak yine Omp19, SOD, BLS, Prp A tercih edilmiş ve DIVA etkili aşı tasarlanabileceği bildirilmiştir (Lalsiamthara ve Lee 2017, Mailybayeva ve ark 2017).

1.10.Brucella intihar plazmid ile in vitro mutasyonlar

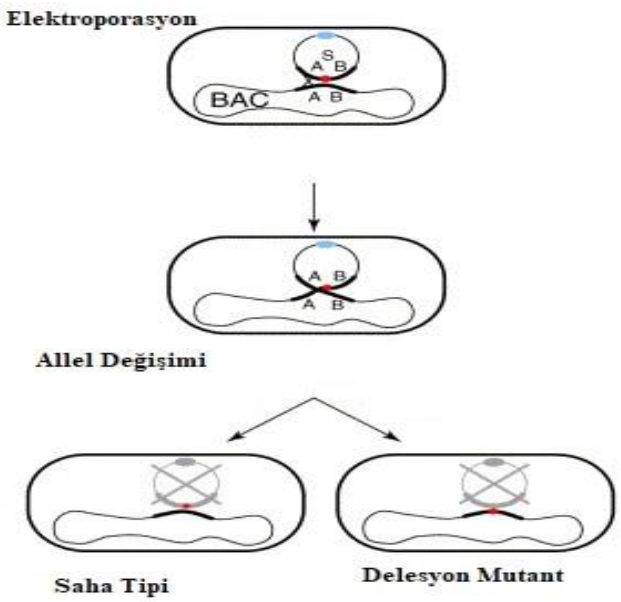
Brucella'nın çoğu türünün 2 kromozomu bulunmaktadır ancak kromozoma entegre olan plazmidi bulunmamaktadır. Bunda ana etkenin yaşamsal döngüsü içerisinde konak ile hızlı etkileşim kurarak enfeksiyona sebep olup, hücre içine yerleşmesi ve diğer bakterilerle etkileşim kurmaması olarak bildirilmiştir. Brucella konak ile bağı kesildiğinde doğada aylarca canlı kalabilecek yapıya sahip değildir ve bu durum Brucella'nın etkileşim kurmasının önünü kesmektedir (Ficht ve ark 2010). Doğal plazmid'i bulunmayan Brucella içerisinde replike olabilecek plazmid bulmak için tür spesifikliği geniş olan, RK2 iletim araçlarına sahip ve düşük kopya üretebilen plazmidler tercih edilmiştir. pBBR1mcs, pMR10 ve pGL10 isimli plazmidler Brucella içerisinde çoğalarak gen düzenlemesi yapabilmektedir (Elzer ve ark 1994, McQuiston ve ark 1995, Haine ve ark 2006). Plazmid Brucella'da çoğalmaya başladığı zaman tekrar izole edilebilir olması Koch postulatının moleküler versiyonunun oluşmasını sağlamaktadır. pSUP202-1/Tn5 (ColE1), pUT-mini-Tn5 (oriRK6), pSC189 (oriRK6) ve pEX18Ap (oriT) isimli plazmidler Brucella içerisinde çoğalamamaktadır (Allen ve ark 1998, Wu ve ark 2006). Allel değişimi pUC ve pBluescript (ColE1) gen bölgelerinin Brucella'da çoğalma yetersizliğine bağlı olarak şekillendiği bildirilmiş ve dezavantaj bu yolla avantaja çevirilmiştir (Kahl-McDonagh ve Ficht 2006).

Organizmada antijenik değişim 2 yolla meydana gelmektedir;

1-Tesadufi mutasyonlar; kimyasal yolla veya transposon kullanarak bu mutasyonlar meydana getirilebilir.

2-Bilinçli mutasyonlar; var olan antijenik bölgenin organizma hayatına zarar vermeden genetik olarak silinmesi veya gen eklenmesi sonucu elde edilen mutasyonlardır (Quandt ve Hynes 1993). Allelik değişim ve transposon mutagenezleri bakteriyel gen silmede kullanılan yaygın metotlardır. Allelik değişim genelikle çift kross over ile yapılırken *Pseudomonas* gibi Gram-negatif bakterilerde tek krossover ile allelik değişim mümkündür (Miller ve Mekalanos 1988). Allelik değişimde önce silmek istenen ORF bölgesi uygun primerler ile çoğaltılır. Bu gen bölgesi uygun antibiyotik direnç ve sükroz geni (*Sac B*) içeren intihar plazmide aktarılır. İntihar plazmid önce donör *E. coli* suşuna aktarılır mutasyon doğruluğu

antibiyotik dirençliliği ile takip edilir. Belirlenen mutant çoğaltılıp alıcı bakteri ile konjugasyona tabi tutulur. Mutantlar belirlenir ve sükroz varlığında çoğalan çift kross-over'ın şekillendiği delesyon mutantlar seçilir (Gay ve ark 1985)(Şekil 1.9) .



Şekil 1. 9. İntihar plazmid çift kross-over sonucu silinmiş bölge mutantının elde edilmesi (kırmızı silinmesi istenen bölge, mavi antibiyotik direnç geni) (Brune ve ark 2000).

Bu yöntem özellikle Gram-negatif bakteriler için tercih edilmektedir. Gram negatifler sükroz varlığında çoğalamamaktadır. Ancak çift kross-over ile sükroz varlığında konjugasyon sonucu plazmid aktarımı başarılı ise alıcı bakteri sükroz varlığında çoğalmaktadır. Allelik değişim yoluyla *Pseudomonas* spp, *Enterobacter* spp, *Vibrio* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Francisella tularensis*, *Brucella* spp. *Rhizobium leguminosarum*, α-2 *Proteobacteria* gibi Gram-negatif aile üyelerinde bu yol kullanılarak birçok gen silme çalışması yapılmıştır (Kaniga ve ark 1991, Quandt ve Hynes 1993, Golovliov ve ark 2003, Ortiz-Martín ve ark 2006). pJQ200KS plazmidi, gentamisin direnç gen bölgesi, birçok kesim enzimine açık çoklu klonlama bölgesi, Sac B gen ve X-gal operonuna sahiptir. Bu plazmid donör olarak *E. coli* DH5 α'yı kullanmakta ve alıcı α-2 *Proteobacteria* ailesi üyelerine gen aktarımında uygun olduğu belirlenmiştir (Quandt ve Hynes 1993).

İntihar plazmidleri kullanılarak elde edilen ve marker aşı olma özelliği bulunan P39, Omp25, Omp 31, znu A delesyon mutantlarıyla yapılan aşı çalışmaları mevcuttur (Yang ve ark 2006, Hur ve ark 2011, Hasanjani-Roushan ve ark 2014).

znu A mutantı ile farelerde yapılan çalışmada, çelınç sonrası 8. haftadaki dalak dokusundaki bakterinin CFU miktarı incelenmiş, RB51 ve S19 ile benzer seviyede koruma sağladığı bildirilmiştir (González-Smith ve ark 2006). Bp 26 ve Omp 31 delesyon mutantları ile koyunlarda yapılan çalışmada, konjuktival yolla uygulanan Bp 26 delesyon mutantı, Rev.1 ile benzer sonuçlar verirken, Omp31 ve Bp 26 bölge delesyonlarını birlikte içeren mutant sonuçları çok başarılı bulunmamıştır (Grilló ve ark 2009). S19 ve Rev.1 aşı suşlarından elde edilen P39 bölge delesyon mutantları ile farelerde yapılan çalışmada, S19 aşı suşunun ΔP39 mutantı, klasik S19'a göre oldukça düşük dalak bakteri CFU sayısına sahip iken Rev.1 aşı suşu ΔP39'a göre daha etkili bulunmuştur (Tibor ve ark 1998). Rev.1 Omp25 mutantı ile gebe keçilerde yapılan etkinlik çalışmasında; kontrol grubunda 8 hayvandan 5'inde abort gözlenirken, Rev.1 ve Omp25 mutantı gruplarında abort gözlenmemiştir (Edmonds ve ark 2002).

Ficht ve ark (2010), Brucella'da yapılan in vitro mutagenezise ait çalışmaları derleyerek Himar1 transposon mutasyonlarını, işaretli mutasyonu (STM), hedef gen silinmesini ve hücre içi hayatta kalma döngüsünün araştırılmasına yönelik tüm protokolleri basamaklar halinde açıklamışlardır. Ayrıca McQuiston ve ark (1995), intihar ve geniş tür spesifikliği olan plazmidlerin *B. abortus*'a gen aktarım protokolleri hakkında detaylı bilgi vermişlerdir. Bu iki çalışma Brucella kromozomundan gen silinebileceğinin kanıtı olarak çalışmanın tasarlanması için ana hipotez kaynağı olmuştur. Ayrıca, pJQ200KS isimli intihar plazmidinin α-2 *Proteobacteria* ailesi üyesi *Rhizobium leguminosarum*'da etkin delesyonda bulunması ve bu plazmid ile Brucella'da gen delesyonu için kullanılması hipotezi destekleyen bulgular olmuştur (Quandt ve Hynes 1993, Scupham ve Triplett 1997).

1.11.Elektroporasyon

Elektroporasyon hücre zarında elektriksel iletkenliğe bağlı, membran geçirgenliğini artıran bir mekanizma ile gen transfeksiyonunu sağlar (Das ve Dash 2015). Yüksek yoğunluktaki elektrik akımı hücre zarının yarı geçirgen yapısını geçici olarak bozar. Kilovolt biriminde cm alana µsn veya msn kadar kısa süreli akımlar verir. Bu mekanizma ile hücre içine por yolu ile alınamayan ilaç, moleküler prob ve DNA kolaylıkla hücre içine alınır. Plazmid veya yabancı DNA'nın hücre içine alınması dışında hibridoma gibi hücrelerin füzyonu, membran protein veya

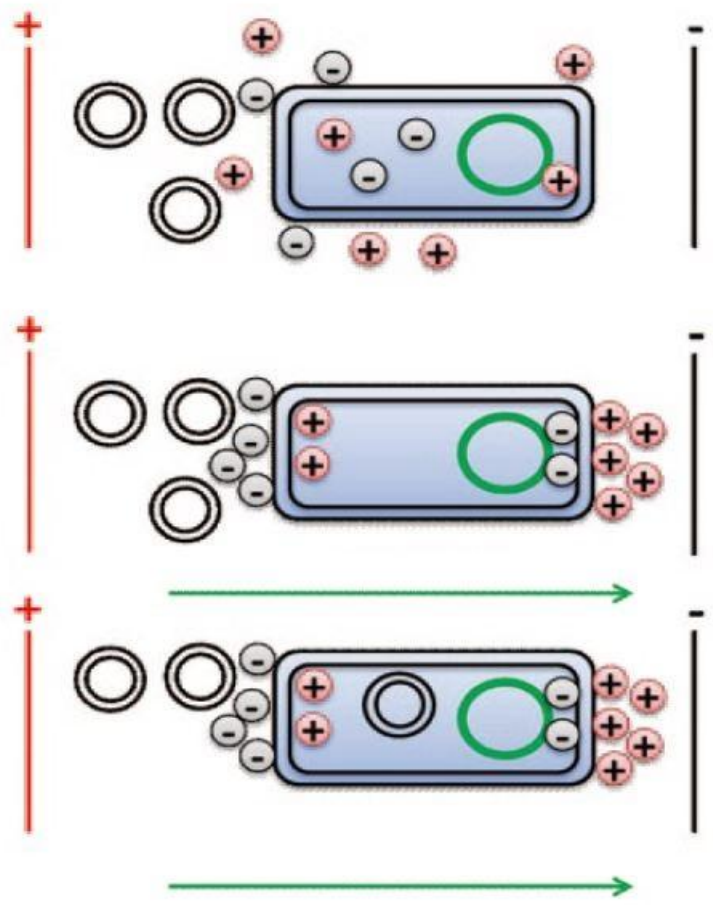
marker ekleme, kanser hücre hattında kemoterapi esnasında etkinliğin artırılması, hücrenin transport mekanizmasının değiştirilmesi ve canlı hücrelerin gen ekspresiyonunun değiştirilmesi için elektroporasyon kullanılabilir. Diğer transfeksiyon metotları ile kıyaslandığında daha az DNA ile daha çok gen aktarımının sağlanması, daha basit bir mekanizmaya sahip olması, kimyasal metotlar gibi hücreler üzerine toksik etkisinin olmaması, hücrelere az zarar verilmesi ve maliyetin diğer metotlara göre daha düşük olması elektroporasyonun tercihinde bir diğer etkendir (Reeves 2017). Kimyasal metot ile kıyaslandığında en az 10 kat aktarım farkı bulunduğu tespit edilmiştir (Braman 2010).

Elektroporasyon bu amaçla ilk olarak fare myeloma hücrelerine DNA aktarımında kullanıldıktan sonra sırasıyla bakterilerde *Bacillus cereus*'a, maya ve bitkilerde DNA aktarımında başarıyla kullanılmıştır (Belliveau ve Trevors 1989). Tüm veteriner bakteriyel etkenler için ilk elektroporasyon yolu ile transfeksiyon yöntemleri 90'lı yıllarda tamamlanmıştır (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Elektroporasyonun transfeksiyon metodu olarak kullanıldığı bakteri çalışmaları

Organizma	**Referans**
Bacillus anthracis	(Koehler ve ark 1994)
Bacillus cereus	(Belliveau ve Trevors 1989)
Bacillus subtilis	(Brigidi ve ark 1990)
Campylobacter jejuni	(Wassenaar ve ark 1991)
Clostridium perfringens	(Phillips-Jones 1990)
Escherichia coli	(Sheng ve ark 1995)
Klebsiella pneumoniae	(Fournet-Fayard ve ark 1995)
Salmonella Typhimurium	(O'Callaghan ve Charbit 1990)
Streptococcus spp.	(Holo ve Nes 1995)
Listeria monocytogenes	(Park ve Stewart 1990)
Rhizobium meliloti	(Garg ve ark 1999)
Mycobacterium tuberculosis	(Pelicic ve ark 1997)
Staphylococcus aureus	(Kraemer ve Iandolo 1990)
Mycoplasma pneumoniae	(Hedreyda ve ark 1993)
Brucella spp.	(Lai ve ark 1990)

Bu akımlar esnasında hücre ve plazmid yükleri elektirik akımı yönünden tek taraflı dağılımı sağlanır. Negatif yüklü plazmid DNA'sı hücrenin pozitif kutbunda değişen yükle beraber kolaylıkla hücre içine alınmış olur. Bu aktarım esnasında plazmid büyüklüğü, bakterinin hücre duvarı yapısının elektrik yüküne olan etkisi, ortamdaki en ufak tuz varlığı dahi etkilidir. Memeli hücre hatları ile kıyaslandığında bakteriler çok daha küçük yapıya sahip olduğu için por yapısını sağlamak için daha büyük elektrik akımına ve süresine ihtiyaç duyarlar (Şekil 1.10).



Şekil.1. 10. Elektroporasyon esnasında bakteri sitoplazması içerisindeki elektirik yükü dağılımı

Genellikle kompetent Brucella içerisine plazmid ve transposon aktarımında konjugasyon ve çoğunlukla elektroporasyon tercih edilmektedir.

Bu projede; hedeflenen *Omp 19* bölgesinin hem protektif hem de virulans özellikte olması hem saha suşunda hem de aşı suşunda bulunması sebebi ile tercih edilmiştir. *B. melitensis* Rev.1 aşı suşundan "Omp 19 gen" bölgesi silinerek elde edilen mutant izolatlar ile aday aşıların hazırlanması, aday aşıların ve piyasada bulunan üç farklı ticari *B. melitensis* Rev.1 aşılarının etkinliklerinin rezidüel

virülenslerinin/immünojenitelerinin fare modellenmesi üzerinde denenerek karşılaştırılması ve elde edilen verilerin aşılı ve enfekte hedef hayvan ayrımına yönelik yapılması planlanan sonraki çalışmalara temel teşkil etmesi amaçlanmaktadır. Günümüz bilim adamları aşıların koruyucululunun yanı sıra aşılı ve enfekte hayvanları ayırmanın bir yolu olarak mutant işaretli veya delesyonuna yönlenmiştir. Amerika menşeili GALVmed isimli firma koyun-keçi Brusellozisine karşı etkili, güvenilir şus üretim fikri için 30 milyon dolarlık bir ödül koymuştur. Amaçlanan çalışma, Brusellozis ile mücadele için oluşturulan Delesyon mutant aşının etkin, güvenilir, DIVA konseptini içermesi ve bakteri kromozomda yaratılan gen delesyonu ile güncel birçok konuyu içermektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Bakteriyel suşlar ve plazmid

B. melitensis bv. 1 Rev.1. suşları

Bir kamu (Pendik VKE) ve ikisi özel aşı firmalarından (Dollvet A.Ş, Vetal A.Ş) özel izinle alınan *B. melitensis* bv.1. Rev.1. suşları Dye Test ve Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) ile Rev.1 özellikleri taşımaları bakımından test edildi. Etik açıdan suşlar numaralandırıldı ve isimleri saklı tutuldu. En kararlı suş olan 2 numaralı ticari *B. melitensis* Rev.1 suşu çalışmada kullanıldı.

B. melitensis H38 suşu

Çelınç suşu *B. melitensis* H38 (ATCC 23456) Mikrobiyoloji Anabilim Dalı SÜVF kültür koleksiyonundan kullanıldı.

E. coli suşu ve intihar plazmid'i

Kompetent hücre olarak; *E. coli* DH5α (New England Biolabs, Inc ABD) ve intihar plazmidi olarak; pJQ200KS (ATCC 77484) kullanıldı.

2.1.2. OMP19 geni, *open reading frame* bölgesi biyoinformatik verilere göre değerlendirilmesi

National Center for Biotechnology Information (NCBI) verilerine göre *B. melitensis* bv.1. Rev.1'in Omp19 geni 534 bp uzunluğunda olup, linear DNA formundadır. Gen aktarımı için Omp19 geni, ORF bölgesi ve homoloji bölgeleri NCBI veri tabanına göre belirlendi.

2.1.3. Besiyerleri

B.melitensis bv.1. Rev.1. besiyeri

B. melitensis bv.1. Rev.1. bakterisinin koloni morfolojisini gözlemlemek amacı ile Brucella agar base (Sigma Aldrich, 18795) kullanıldı.

Tuzsuz Brucella besiyeri

Bir litre tuzsuz Brucella agar için 700 ml distile su içerisinde 10 gr triptofan (Sigma, 09136), 10 gr etten ekstrakte edilen pepton (Sigma, 91249), 2 gr yeast ekstraktı (Sigma, Y1625) ve 12 gr Agar (Sigma, 05039) çözdürüldü. Otoklav ile steril hale getirildi ve 55°C sıcaklığa ulaştığında, filtre edilerek sterilize edilen sükroz (100 gr sükroz (Sigma, 10765)/200 ml) eklendi ve petrilere dağıtıldı (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Tuzsuz Brusella besiyeri içeriği

1 litre Tuzsuz Brucella Agar içereği	700 ml distile su	200 ml distile su içinde filtre
Triptofan	10 gr	-
Etten ekstrakte edilen pepton	10 gr	-
Yeast ekstraktı	2 gr	-
Sükroz	-	100 gr
Agar	12 gr	-

Dye test besiyeri

Otoklav ile sterilize edilmiş Brucella agarda son konsantrasyonlar distile su ile penisilin, streptomisin, tiyonin (Sigma, T3387) ve bazik fuksinden (Sigma, B0904) stok solüsyonlar hazırlandı. Otoklav edilmiş 1000 ml Brucella agara penisilin, streptomisin, tiyonin ve bazik fuksin stok solüsyonlarından 100µL ilave edilerek streptomisin 2,5 µg/ml, penisilin 5 IU, bazik fuksin 20 µg/ml ve tiyonin 20 µg/ml içeren besiyerleri hazırlandı (Alton ve ark 1998).

Rekombinant koloni besiyeri

Rekombinant kolonileri geliştirmek için Luria Bertani Agar (LB) (Lab M) ve plazmid izolasyonu öncesinde LB buyyon (Merck 71753) kullanıldı.

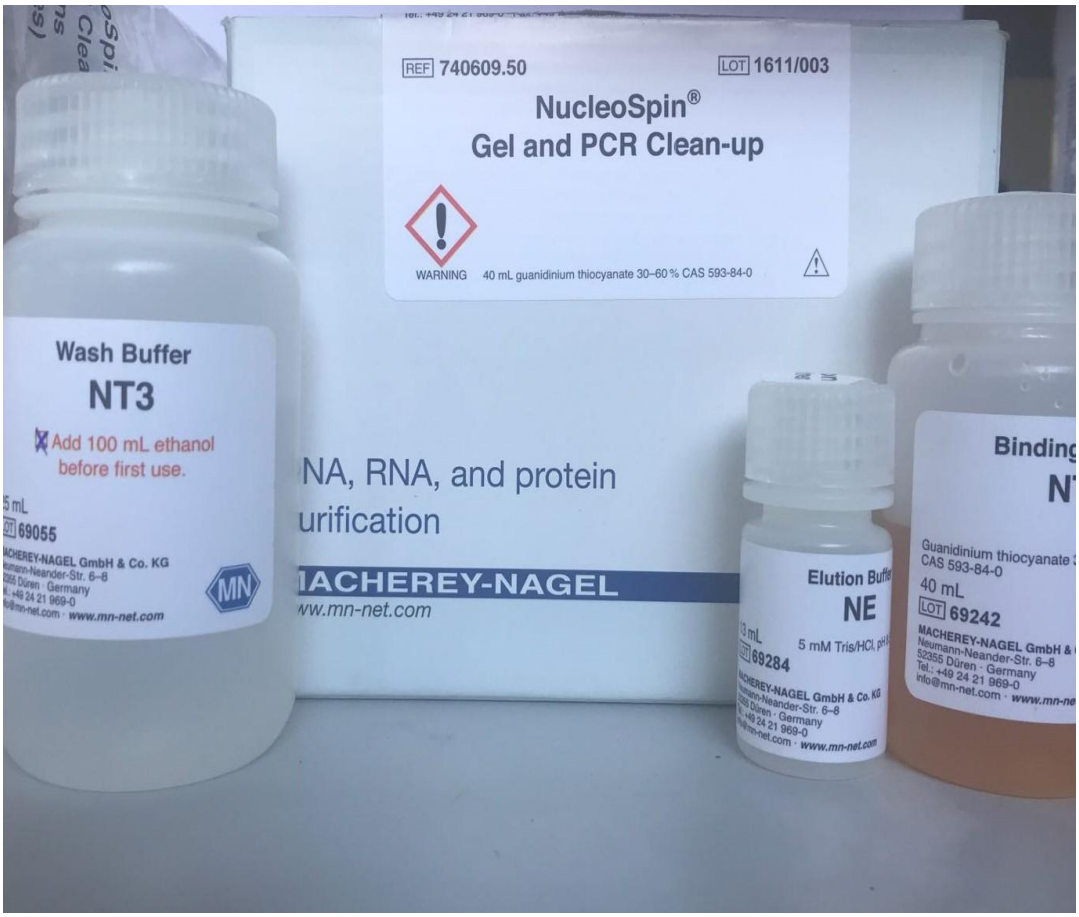
X-gal besiyeri

Mavi beyaz koloni ayrımı için X-gal (20mg/ml) ve IPTG (100mM) ihtiva eden LB agar kullanıldı.

2.1.4. Kullanılan kitler

Jel ekstraksiyon kit

Jel artıklarından PZR ürünlerinin ve ligasyon öncesi jelde görüntülenen *insert* Omp19 genine ait DNA bandın temizlenmesi Jel Extraction Kiti (Macherey-Nagel Gmbh, Germany) (Şekil 2.1) ile sağlandı.



Şekil 2. 1. NucleoSpin jel ve PZR ürünü temizleme kiti

Plazmid ekstraksiyon kiti

Çalışmada, boş vektörün kesim enzimleri ile muamelesi ve ligasyon öncesi daha küçük miktarlardan izolasyon sağlamak için E.Z.N.A.® Plazmid Mini Kit (Omega Bio-tek, Inc.ABD) kullanıldı. Kompetent hale getirilmiş Brucella hücrelerine gen aktarımı öncesi yoğun miktarda plazmid izolasyonu sağlayan ZymoPURE™ II Plazmid Maxiprep Kit (Zymoresearch, ABD) kullanıldı.

Alkalen lizis ile plazmid İzolasyonu

Alkalen lizis yoğun plazmid elde etmek ve B. melitensis Rev.1'e aktarmak için kullanıldı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Alkelen lizis solüsyonu içeriği hazırlanışı

Solüsyon İsimleri	İçerik	Miktar
Solüsyon 1 (Resüspansiyon Buffer)	Glikoz Monohidrat	50 mM
	Tris-HCL	25 mM
	EDTA	10 mM
Solüsyon 2 (Lizis Solüsyon)	NaOH	0.2 M
	SDS	%1
Solüsyon 3 (Nötralizasyon Solüsyon)	Glacial Asetik Asit	23 ml
	$KaCH_3COOH$	3M

Restriksiyon enzimleri

pJQ200KS vektörü çoklu klonlama bölgesi (MCS) içerisinde yer alan kesim bölgelerinden kesim için iki farklı restriksiyon endonükleaz kullanıldı. Bunlardan ileri bölgeden kesim için G'TCGAC baz dizisinden Sal I HF (New England Biolabs, Inc ABD R3138S) ve geri bölgeden kesim için C'TCGAG baz dizisinden Xho I (New England Biolabs, Inc ABD R0146S) kullanıldı.

Restriksiyon kesim enzimleri ihtiva eden 5' homoloji bölgesinin, ileri bölgesinden kesim için Sal I HF (New England Biolabs, Inc ABD R3138S) geri bölgesi GC'GGCCGC baz dizisinden kesim için Not I (New England Biolabs, Inc ABD R0189S) kullanıldı.

Restriksiyon kesim enzimleri ihtiva eden 3' homoloji bölgesinin, ileri bölgesinden kesim için Not I (New England Biolabs, Inc ABD R0189S) geri bölgesiden kesim için Xho I (New England Biolabs, Inc ABD R0146S) kullanıldı.

T4 DNA ligasyon kiti

Kesilen 5' homoloji bölgesi ve 3' homoloji bölgelerinin birbirine ligasyonu yapılarak tek bir *insert* haline getirilmesi için T4 DNA ligaz enzimi (New England Biolabs, Inc ABD M0202S) kullanıldı.

Ayrıca tek bir *insert* haline getirilen homoloji bölgesinin, kesilmiş açık uçlu vektör içerisine ligasyonu için T4 DNA ligaz enzimi (New England Biolabs, Inc ABD M0202S) kullanıldı.

2.1.5. Stok Solüsyonlar

Gentamisin stok solüsyonu

Gentamisin sülfat (Goldbio, G-400-1)	0,015 gr
Ultra saf su	1000µl'ye tamamlandı

0,22 µm (Merck, Millipore) ile filtre edildikten sonra –20°C'de saklandı.

Streptomisin stok solüsyonu

Streptomisin sülfat (Sigma Aldrich, S9137)	0,0025 gr
Ultra saf su	1000µl'ye tamamlandı

0,22 µm (Merck, Millipore) ile filtre edildikten sonra –20°C'de saklandı.

Ampisilin stok solüsyonu

Ampisilin Sodyum (Sigma Aldrich, A0166)	0,010 gr
Ultra saf su	1000µl'ye tamamlandı

0,22 µm (Merck, Millipore) ile filtre edildikten sonra –20°C'de saklandı.

Penisilin stok solüsyonu

Penisilin G Sodyum (Sigma Aldrich, 13752)	0,0009 gr
Ultra saf su	1000µl'ye tamamlandı

0,22 µm (Merck, Millipore) ile filtre edildikten sonra –20°C'de saklandı.

X-Gal stok solüsyonu

X-Gal (Sigma Aldrich, B4252)	0,2 gr
Ultra saf su	1000µl'ye tamamlandı

0,22 µm (Merck, Millipore) ile filtre edildikten sonra –20°C'de saklandı.

İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit (IPTG) stok solüsyonu

IPTG (Sigma Aldrich, I6758)	0,0238gr
Ultra saf su	1000µl'ye tamamlandı

0,22 µm (Merck, Millipore) ile filtre edildikten sonra –20°C'de saklandı.

Bazik fuksin stok solüsyonu

Bazik fuksin (Sigma Aldrich, 215597)	0,020 gr
Ultra saf su	1000µl'ye tamamlandı

Su banyosunda (Memmert, WNB14, Germany) 50°C'de çözülerek +4°C'de saklandı.

Tiyonin stok solüsyonu

Tiyonin (Sigma Aldrich, 861340)	0,020 gr
Ultra saf su	1000µl'ye tamamlandı

Su banyosunda (Memmert, WNB14, Germany) 50°C'de çözülerek +4°C'de saklandı.

2.1.6. DNA amplifikasyonu

Master miks

PZR analizlerinde içerisinde Taq Polimeraz, dNTP ve MgCl ihtiva eden Master Miks 5X (Solis BioDyne, 5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load, Estonya) kullanıldı.

Kullanılan primerler

NCBI'da incelenen Omp19 baz dizilimi Oligo 7 yazılım ile incelenmiş, dizayn edilen primerler *dimer* ve *hair pin* gibi olası hatalardan arındırıldı (Rychlik 2007) (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Kullanılan primer dizileri

Primer İsmi	Dizisi	Altıntı yapılan kaynak
Brc-m	5'AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA'3	(Bricker ve Halling 1994)
Brc-a	5'GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC'3	
IS77	5' TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT'3	
Rev1 rpsL12 F	5'CAGGCAAACCCTCAGAAGC'3	(Cloeckaert ve ark 2002)
Rev1 rpsL12 R	5'GATGTGGTAACGCACACCAA'3	
Universal F	5'GATATCAAGCTTATCGAT'3	(Zhou ve Gomez-Sanchez 2000)
Universal T3-R	5'GCAATTAACCCTCACTAAAGG'3	
Omp19-534bp F	5'ATGGGAATTTCAAAAGCAAGT'3	Çalışmada dizayn edildi.
Omp19-534bp R	5'TCAGCGCGACAGCGTCA'3	
Omp19-751 F	5'GGGCTTTGGAGGCAGAAATG'3	Çalışmada dizayn edildi.
Omp19-751 R	5'CGGTGCGCCTTAAAATTCGG'3	
5'HB-729bp F	5'GGCAGGAAAAGCTGACGGTTC'3	Çalışmada dizayn edildi.
5'HB-729bp R	5'GCTGATCTGACCCGGAAACGA'3	
3'HB-749bp F	5'GATTACCAAGCCGGGAGCTCT'3	Çalışmada dizayn edildi.
3'HB-749bp R	5' CGGGTCTCGAAAGTAAAGGCG'3	
5'HB-RES F	5'TAACA/GTCGAC/TGCCGTTGCC'3	Çalışmada dizayn edildi.
5'HB-RES R	5'ATA/GCGGCCGC/CAT/CAGGTTCTCCAT'3	
3'HB-RES F	5'ATA/GCGGCCGC/A/TGA/TCTGACCCG'3	Çalışmada dizayn edildi.
3'HB-RES R	5'TGCTTA/CTCGAG/CCGCAATGTCGGTCA'3	
Omp19-Del F	5'ACAATTCCCCAATGCGCCCTC'3	Çalışmada dizayn edildi.
Omp19-Del R	5'AACCGTACCGCCGTTCGCATC'3	

100 M'lık primerler 1/4 oranında sulandırılarak 1µM konsantrasyonunda kullanıldı.

Marker

Çalışmada 100 bp DNA ladder (Solis Byo dye) ve kb DNA ladder (Fermentas, SM1332) kullanıldı.

2.1.7. Kullanılan cihazlar

Çalışmada, S.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan biyogüvenlik kabini sınıf II (Labgard, Nuaire), ısı döngü cihazı (T100, Biorad), santrifüj (Heraeus Megafuge 8 R, Thermo Scientific), jel elektroforez ekipmanları (maxicell-minicell, EC Apparatus Coperation) ile güç kaynağı (250-90, EC Apparatus Coperation), spektrofotometre (Nanodrop2000, Thermo Scientific), jel görüntüleme cihazı (212 Pro, Gellogic), bireysel havalandırmalı kafes sistemi (IVS) (Ecoflow, Allentown Inc.), S.Ü. Veteriner Fakültesi Parazitoloji laboratuvarında çalkalayıcılı inkübatör (MIR-254-PE, Panasonic), S.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ABD, ELISA okuyucu (MWGt Lambda Scan 200 Biotek Inc, USA) ve Konya Gıda Tarım Ü. KİTARGEM laboratuvarında bulunan elektroporatör (Xcell, Biorad) kullanılmıştır. Elektron mikroskop görüntüsü alma işlemi S.Ü. İleri Araştırma ve Uygulama Merkezinden hizmet alınarak yapıldı. Dizi analizleri tek yönlü 800 baz'a kadar olan okumalarda Pendik Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü'nde ve 800 baz üzeri okumalarda BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Sti.'nde (Ankara) hizmet alımı yoluyla yapıldı.

2.1.8 Agar jel elektroforezi

Tris Asetik Asit EDTA (TAE) tampon (50x)

Tris Base (Sigma-Aldrich, 93362)	242 gr
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 ml
Glacial asetik asit	57.2 ml
Distile su	1000 ml'e tamamlandı

Agaroz jel (%1) (w/v)

Agaroz (Sigma-Aldrich, A9539)	1 gr
TAE	100 ml

Etidyum bromür stok solüsyon (10 mg/ml)

Etidyum bromür	20 mg
Distile su	1.98 ml

Agaroz jele son konsantrasyonda 0.5 µg/ml oranında olacak şekilde ilave edildi.

2.1.7. Adjuvan

Incomplete Freund Adjuvan (IFA)(F5506, Sigma-Aldrich) kullanıldı.

2.1.8. Fare materyali

Aşı Çalışmalarında 7 haftalık 18-23 gr Brown Swiss Albino fareler kullanldı.

2.1.9. Enzim linked immunosorbent assay (ELISA)

Kaplama Antijeni

ELISA testinde kullanılacak pleytlerin kaplanmasında *B. melitensis* H38 tüm hücre antijeni ve rekombinant Omp19 (230-00508-100, Raybiotech Inc, ABD) kullanıldı.

Protein Ölçümü

Bradford solüsyonu

%95 etanol	50ml
Coomassie Blue G-250	100 mg
%85 fosforik asit	100ml
Distile su ile toplam hacim	1000ml

Antijen Kaplama Tamponu

Karbonat-bikarbonat tamponu, Ph:9,6 50 ml

0,0343 M $NaHCO_3$	0,288 gr
0,0157 M $NaCO_3$	0,167 gr
Distile su ile toplam hacim	50 ml

Phosphate buffer saline

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-Aldrich, A21153)	1 gr
PBS	100 ml

Konjugat

Tavşanda hazırlanmış horseradish peroksidaz (HRP) ile işaretli anti-fare IgG (Tüm molekül) (Sigma-Aldrich, A9044) konjugat, PBS ile 1/40000 sulandırılarak kullanıldı.

Substrat

Fosfat-sitrat Buffer (Phosphate-citrate buffer with sodium perborate capsules, (Sigma P4922, USA) ile taze olarak hazırlanan δ-Fenildiamin dihidroklorid tablet (Sigma p8287,USA) kullanıldı.

Stop solüsyonu (0,5 M H_2SO_4)

H_2SO_4	5 ml
Distile su	45 ml

2.1.10. Rose Bengal Pleyt Test (RBPT) Antijeni

Rose bengal pleyt test (RBPT, Vetal A.Ş.) antijeni, temin edildi.

2.1.11. Serum Aglütinasyon Test (SAT) Antijeni

Serum aglütinasyon test (SAT, Vetal A.Ş.) antijeni, Vetal A.S. Adıyaman'dan temin edildi.

2.2 Yöntem

2.2.1. *B. melitensis* bv.1. Rev.1 Suş Seçimi

Liyofilize aşılar PBS ile homojenize edilerek çözdürüldü Brucella agara ekilerek 37ºC 96 saat boyunca inkübe edildikten sonra koloni oluşumu ve morfolojisine göre suşlar kontrol edildi. Elde edilen koloniler birinci pasaj olarak stoklandı.

Farklı antibiyotik duyarlılık ve boyalara dirençlilik ile *B. melitensis* bv.1 Rev.1 suşunu saha *B.melitensis* biovarlarından ayırmada kullanılan Dye test için kültürler Mcfarland 0.5'e ayarlandı; streptomisin 2,5 µg/ml, penisilin 5 IU, bazik fuksin 20 µg/ml ve tiyonin 20 µg/ml açısından değerlendirilerek en stabil yapıda, mutasyona uğramamış aşı suşu delesyon çalışmasında kullanılmak üzere seçildi.

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon

DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonunda ticari DNA purifikasyon kiti (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega) üretici firmanın belirttiği şekilde kullanıldı. Üretilmiş bakteri kültürü 7500 rpm'de 10 dk satrifüj edildi ve üst kısım atılarak pelet üzerine 600 µl nükleik lizis solüsyonu ilave edilip 80°C'de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 3 µl RNAaz enzimi ilave edilerek 37°C'de 1 saat daha inkübe edildi. Süspansiyon üzerine 200 µl protein presipitasyon solüsyonu eklenerek 20 sn karıştırıldı, 5 dk parça buz üzerinde bekletildikten sonra 8000 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Üstteki kısım yeni bir tüpe alınıp üzerine 600 µl oda ısısında isopropanol eklendi. Tüpler 1-2 dk karıştırılıp 8000 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Üst kısım dikkatlice döküldükten sonra tüpler 20 dk kurumaya bırakıldı. Pelet üzerine 600 µl % 70 soğuk etanol ilave edilip 10'ar kez alt-üst edildi, 8000 rpm'de 4 dk santrifüj yapıldı. Üst kısım dikkatlice alındı ve pelet kurutuldu. Üzerine 100 µl DNA rehidratasyon solüsyonu eklenerek 65°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra DNA elde edildi. DNA ekstraktları kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

DNA miktarlarının ve saflığının belirlenmesi

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 saptandı. DNA rehidratasyon solüsyonu blank olarak kullanıldı. DNA örneklerinin konsantrasyonları ng/µl cinsinden elde edildi. OD260 ve OD280 değerlerine göre hesaplanan DNA miktarları birbiri ile oranlanarak (OD260/OD280) kaliteli kullanılabilir DNA içeren izolasyonları belirlendi ve PZR'de kullanıldı.

Aşı suşlarının *B.melitensis* yönünden doğrulanması

Her bir PZR amplifikasyonu için toplam hacim 20 µl olacak şekilde primerlerden toplam 1,2 µl (IS711 1 µl, *B. melitensis* spesifik primer 0,1 µl ve *B. abortus* spesifik primer 0,1 µl), Master Mix 5X 4 µl, steril ultra saf su 9,8 µl ve 5 µl DNA kullanılarak hazırlandı. Bu karışım ısı döngü cihazında, 95°C'de 2 dkön denatürasyon, 35 döngü (95°C'de 20 sn, 55°C'de 20 sn ve 72°C'de 30 sn) son uzatma olarak DNA'lar 72°C'de 5 dk tutuldu (Bricker ve Halling 1994).

PZR ürünleri 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren %1'lik agaroz jelde elektroforeze edildi. Marker olarak 100 bp marker kullanıldı. 731 bp büyüklüğündeki bantlar *B. melitensis*, 500 bp büyüklüğündeki bantlar *B. abortus* pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *B. melitensis* H38, *B. abortus* S19 suşlarının DNA ekstraksiyonları kullanıldı. Negatif kontrol olarak steril ultra saf su kullanıldı (Bricker ve Halling 1994)

Aşı suşlarının *B. melitensis* bv.1 Rev.1 yönünden doğrulanması

Diğer biovarlarından farklı olarak *B. melitensis* Rev.1'de bulunan ribosomal protein S12, rpsL geni amplifikasyonu için ileri primer rpsL12 F geri primer Rev1 rpsL12 kullanıldı. Amplifikasyon her PZR tüp içeriğinde toplam hacim 20 µl olacak şekilde; primerlerinden toplam 4 µl (10'ar pmol), Master Mix 5X 4 µl, steril ultra saf su 7 µl ve 5 µl DNA kullanılarak hazırlandı. Bu karışım ısı döngü cihazında, 95°C'de 3 dk ön denatürasyon, 35 döngü (95°C'de 20 sn, 50°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk) son uzatma olarak DNA'lar 72°C'de 7 dk ile gerçekleştirildi (Cloeckaert ve ark 2002).

PZR ürünleri 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren % 1'lik agaroz jelde elektroforeze edildi. Marker olarak 100 bp marker kullanıldı ve 218 bp büyüklüğündeki bantlar *B. melitensis* bv1 Rev.1 olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *B. melitensis* bv.1 Rev.1 aşı suşları, kıyaslama için *B. abortus* S19 ve *B. abortus* S99 suşlarının DNA ekstraksiyonları kullanıldı. Negatif kontrol olarak steril ultra saf su kullanıldı (Cloeckaert ve ark 2002).

Omp19 ORF bölgesinin PZR ile amplifikasyonu

Dye test ve PZR analizleri sonucunda Rev.1 olarak doğrulanan ve karalı yapıda bulunan 2 numaralı aşı suşunun delesyonu yapılacak gen dizilimi olan Omp 19'un 534 bp uzunluğundaki ORF kısmı incelendi. Kullanılacak olan primeler NCBI gen bankası *B. melitensis* bv.1 Rev.1 Omp19 dizilimi üzerinden Oligo 7 yazılımında dizayn edildi. Omp 19 geninin amplifikasyonu için ileri primer Omp19-534 bp F geri primer Omp19-534 bp R kullanıldı. Amplifikasyon her PZR tüp içeriğinde 20 µl olacak şekilde; primerlerinden toplam 4 µl (10'ar pmol), Master Mix 5X 4 µl, steril ultra saf su 7 µl ve 5 µl DNA kullanılarak hazırlandı. Bu karışım ısı döngü cihazında, 95°C'de 5 dk ön denatürasyon, 30 döngü (95°C'de 1 dk, 52°C de 90 sn ve 72°C'de 90 sn) son uzatma 72°C'de 10 dk tutuldu.

PZR ürünleri 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren % 1'lik agaroz jelde elektroforeze edildi. Marker olarak 100 bp marker kullanıldı ve 534 bp büyüklüğündeki bantlar Omp 19 gen varlığı olarak değerlendirildi. Negatif kontrol olarak steril ultra saf su kullanıldı.

Omp19, 5' ve 3'homoloji bölgelerinin PZR ile amplifikasyonu

Omp19 gen varlığı belirlenen DNA izolatı üzerinden, 729 baz dizimli olan 5' ve 749 baz dizilimine sahip olan 3' homoloji bölgeleri ayrı ayrı primer çiftleri ile amplifiye edildi. 5' homoloji bölgesi gen amplifikasyonu için ileri primer 5'HB-729bp F geri primer 5'HB-729 bp R kullanıldı. 3' homoloji bölgesi gen amplifikasyonu için ileri primer 3'HB-749 bp F geri primer 3'HB-749 bp R kullanıldı. Her iki homoloji bölgesi için; amplifikasyon her PZR tüp içeriğinde 20 µl olacak şekilde; primerlerinden toplam 4 µl (10'ar pmol), Master Mix 4 µl, steril ultra saf su 7 µl ve 5 µl DNA kullanılarak hazırlandı. Bu karışım ısı döngü cihazında,

95°C'de 5 dk ön denatürasyon, 35 döngü (95°C'de 30 sn, 58,3°C de 90 sn ve 72°C'de 90 sn), 72°C'de 6 dk son uzama ile DNA amplifiye edildi (Şekil 2.2).

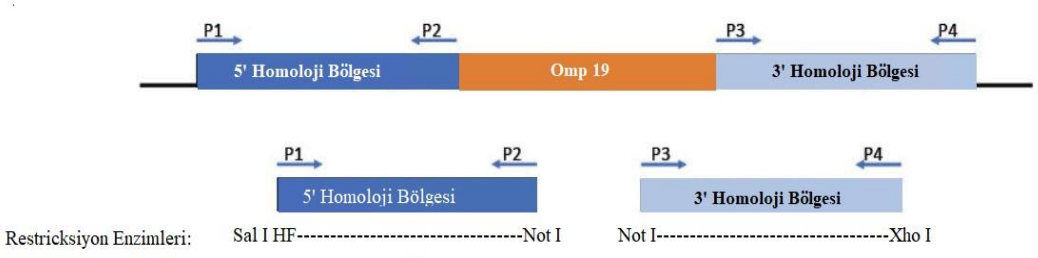


Şekil 2. 2. 729 baz dizilimli 5'homoloji bölgesi-534 baz dizilimli Omp19 ORF-749 baz dizilimli 3'homoloji bölgesi

PZR ürünleri 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren % 1'lik agaroz jelde elektroforeze edildi. Marker olarak 100 bp marker kullanıldı ve 729 bp büyüklüğündeki bantlar 5' homoloji bölgesi gen varlığı 749 bp büyüklüğündeki bantlar 3' homoloji bölgesi gen varlığı olarak değerlendirildi. Negatif kontrol olarak steril ultra saf su kullanıldı.

Enzim kesim bölgesi içeren homoloji bölgelerinin PZR ile amplifikasyonu

Amplifiye edilen 729 baz dizimli olan 5' ve 749 baz dizilimine sahip olan 3'homoloji bölgeleri PZR artıklarından MN kiti ile arındırıldı. Uçlarında kesim bölgeleri içeren 625 baz dizilimine sahip 5' homoloji bölgesi gen amplifikasyonu için ileri primer 5'HB-RES F ve geri primer 5'HB-RES R kullanıldı. Uçlarında kesim bölgeleri içeren 627 baz dizilimli 3' homoloji bölgesi gen amplifikasyonu için ileri primer 3'HB-RES F ve geri primer 5'HB-RES R primerleri kullanıldı. Her iki homoloji bölgesi için; amplifikasyon her PZR tüp içeriğinde 20 µl olacak şekilde; primerler toplam 4 µl (10'ar pmol), Master Mix 4 µl, steril ultra saf su 7 µl ve 5 µl DNA kullanılarak hazırlandı. Bu karışım ısı döngü cihazında, 95°C'de 5 dk ön denatürasyon, 35 döngü (95°C'de 30 sn, 63°C de 90 sn ve 72°C'de 90 sn) 72°C'de 6 dk son uzama ile DNA'lar amplifiye edildi.



Şekil 2. 3. Tasarlanan kesim enzimli primerler sonrası Sal I HF ve Not I kesim enzimlerine sahip 625 bp 5' homoloji bölgesi ve Not I ve Xho I kesim enzimlerine sahip 3' homoloji bölgesi

PZR ürünleri 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren % 1'lik agaroz jelde elektroforeze edildi. Marker olarak 100 bp marker kullanıldı. 625 bp büyüklüğündeki bantlar 5' homoloji bölgesi gen varlığı olarak değerlendirildi. 627 bp büyüklüğündeki bantlar 3' homoloji bölgesi gen varlığı olarak değerlendirildi. Negatif kontrol olarak steril ultra saf su kullanıldı.

2.2.3. PZR ürünlerinin jelden ekstraksiyonu

Homoloji bölgeleri uçlarına kesim enzimi eklenerek özel dizayn edilen 5'HB-RES F - 5'HB-RES R ve 3'HB-RES F 3'HB-RES R primerleri ile çoğaltıldıktan sonra elde edilen PZR ürünü elektroforez işlemi ile ayrıştırıldıktan sonra ultraviyole (UV) altında görüntülenerek 625 bp ve 627 bp'lık bantlar, bistüri ile agaroz jelden

kesildi. Bantlar 1.5 ml'lik DNase-RNase free ependorf tüpüne aktarıldı. Ependorf tüpünde bulunan her 100 mg jel üzerine PZR *Clean up* kiti (Macherey-Nagel Gmbh, Germany) eritici solüsyondan 200 µl ilave edilerek 70ºC'de 5 dk su banyosunda (Memmert, WNB14, Germany) jel erinceye kadar bekletildi. NucleoSpin® Jel ve PZR *Clean-up* kolum içerisine aktarıldı ve 11.000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildikten sonra iki kere 700 µl yıkama solüsyonu kolona ilave edilerek 11.000xg'de 1 dk santrifüj yapıldı. DNA eldesi için son aşamada 100 µl DNA sulandırma solüsyonu kolona ilave edilerek 16.000xg 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildikten sonra herhangi bir solüsyon eklenmeksizin 11.000xg 2 santrifüj edildi ve kolum kurumaya bırakıldı. Steril ependorf tüplere alınıp 20 µl elüsyon buffer eklendi ve 11.000xg 1 dk santrifüj edildi. Tüpün dip kısmında biriken DNA miktarı nanodrop ile ölçülerek -20ºC'de muhafaza edildi.

2.2.4. PZR ürünlerinin kesim enzimleri ile uç kısımlarından arındırılması

Jelden arındırılan 625 bp ve 627 bp'lık PZR ürünlerinin çift kesim enzimi ile muamelesi için üretici firma protokolü (NEB) takip edilmiştir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. İnsert için kesim enzim protokolü

Protokol		**5' HB *insert*'ü için**	**3' HB *insert*'ü için**
DNA	1 µg	20µl (20x61.6ng=1232ng)	10µl (10x132ng=1320ng)
Cut Smart buffer	5 µl	5 µl	5 µl
Sal I-HF	1 µl	1 µl	-
Xho I	1 µl	-	1 µl
Not I	1 µl	1 µl	1 µl
Ultra Saf Su	50 µl'ye tamamlanır	23 µl	33 µl

Sonrasında hazırlanan karışım 37˚C'de 15 dk inkübe edilerek, 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren % 1'lik agaroz jelde elektroforeze edildi. Marker olarak 100 bp marker kullanıldı. UV görüntüleme cihazında görüntülenen band jelden kesilip, jel ekstraksiyon kiti (Macherey-Nagel Gmbh, Germany) ile artık ürünlerden ve jelden saflaştırıldı. Kesilmiş ürün miktarları nanodrop ile sırasıyla kesilmiş *insert* 5' homoloji bölgesi 31 ng/µl ve kesilen *insert* 3' homoloji bölgesi 48ng/µl olarak ölçülerek ve jelde görüntülendi.

2.2.5. Kesilmiş 5'homoloji bölgesi ve 3' homoloji bölgesinin Not I bölgesinden ligasyonu

İki ayrı *insert* homoloji bölgesinin kesilmiş vektöre ligasyonunu yapmak yerine, önce bu iki bölgenin kendi arasında Not I (GC^GGCCGC) ligasyonunu sağlayıp tek bir *insert* elde edilmeye çalışıldı. Ligasyon için yine üretici firma (NEB) protokolü (10 dk 25˚C) takip edildi, 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren % 1'lik agaroz jelde elektroforeze edildi. Marker olarak 100 bp marker kullanıldı (Çizelge 2.5).

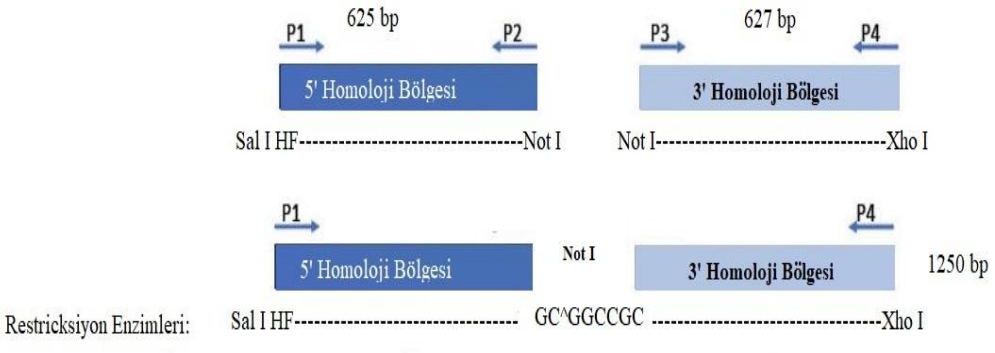
Çizelge 2.5. Homoloji bölgeleri ligasyonu

Protokol (20 µl total hacim)		**Takip Edilen Protokol**
Cut İnsert 5'HB DNA	50 ng	10 µl (31 ng/µl)
Cut İnsert 3'HB DNA	50 ng	10µl (48 ng/µl)
T4 DNA ligase buffer	2 µl	4 µl
T4 DNA ligase	1 µl	2µl
Ultra Saf Su	20 µl'ye tamamlanır	40 µl'ye tamamlanır

UV görüntüleme cihazında görüntülenen 1900 bp, 1250 bp ve 625 bp'lik bantlar görüntülenmiş ve 1250 bp'da birbirine ligasyonu tamamlanmış olan bant jelden kesilip, jel ekstraksiyon kiti (Macherey-Nagel Gmbh, Germany) ile artık ürünlerden ve jelden arındırılıp saflaştırıldı.

2.2.6. 5' ve 3'Homoloji bölgelerinin tek bir *insert* haline getirilmesi

Elde edilen 1250 bp'lık ligasyon ürünü uç kısımlarında Sal I enzim kesim bölgesi orta noktada Omp19 ORF yerine Not I kesim enzim bölgesi ve son kısımda Xho I kesim bölgesi olacak şekilde 5'HB-RES F ve 3'HB-RES R primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon PZR tüp içeriğinde 100 µl olacak şekilde; primerlerinden toplam 20 µl (10'ar pmol), Master Mix'ten 20 µl, steril ultra saf sudan 55 µl ve DNA'dan 5 µl kullanıldı. Bu karışım ısı döngü cihazında, 95°C'de 5 dk ön denatürasyon, 35 döngü (95°C'de 30 sn, 63°C de 90 sn ve 72°C'de 90 sn) son uzatma olarak DNA'lar 72°C'de 6 dk tutuldu.



Şekil 2. 4. Primer 1 ve primer 4 ile homoloji bölgelerinin tek ürün haline getirilmesi

Elde edilen PZR ürününün %1'lik agaroz jeldeki saf 1250 bp'lık bant jel arındırma kiti (Macherey-Nagel Gmbh, Germany) kullanılarak temizlendi. Klonlama sırasında *insert* olarak kullanılmak üzere nanodrop ile DNA miktarları ölçülerek -20ºC'de muhafaza edildi.

2.2.7. pJQ200KS vektörünün çoğaltılması

pJQ200KS (ATCC, 77484) isimli intihar vektörü ile denemelere başlandı. Plazmidin sahip olduğu gentamisin direnç geni ile minimum inhibisyon konsantrasyonu MIC 15µg/ml olarak belirlendi.

LB buyyon 100 ml hazırlanarak otoklavlandıktan sonra içerisine stok gentamisin solüsyonundan 100 µl ilave edildi. Plazmid içeren kompetent *E. coli*, final konsantrasyonu 15µg/ml gentamisin içeren 100 ml besi yeri içerisine eklendi ve çalkalamalı etüvde 200 rpm'de, 37˚C'de 12 saat inkübe edildi.

2.2.8. Vektör izolasyonu

Elde edilen hücre kültüründen, boş vektör backbone saf olarak elde etmek için, 5 ml kültürden 25 µg plazmid DNA'sı izole etme kapasitesine sahip plazmid miniprep izolasyon kiti (E.Z.N.A.® plazmid Mini Kit, Omega Bio-tek, Inc.ABD) kullanıldı. Beş ml kültür santrifüj (10000xg'de 1 dk) edildi. Üst kısım alındı ve pelet üzerine 250 µl solüsyon I/RNase A eklendi ve karışım pipetlendi. Karışım üzerine 250 µl solüsyon II eklendi ve yavaşça alt üst edilerek lizis işlemi yapıldı. Solüsyon III 350 µl eklenip karışım 10 kez alt üst edilerek nötralizasyonun tamamen sağlanması için parça buz üzerinde 10 dk inkübe edildikten sonra santrifüj (13000xg'de 10 dk) edildi. Üst sıvı HiBind® DNA mini kolum içerisine alındı ve

santrifüj (13000xg'de 1 dk) edildi. kolum içerisine 500 µl HBC buffer eklenerek santrifüj (13000xg'de 1 dk) edildi. İki kez tekrarnalacak şekilde 700 µl yıkama buffer eklenerek 1 santrifüj (13000xg'de 1 dk) edilerek kolum artıklardan uzaklaştırıldı. Boş olan kolum daha santrifüj (13000xg'de 2 dk) edildi. Kuruması için 10 dk beklendi. Son olarak 70ºC sıcaklıkta bulunan 25 µl elüsyon buffer eklenerek, santrifüj (13000xg'de 1 dk) edildi. DNA miktarı Nanodrop ile 23.8 ng/µl ölçüldü. Jelde süper yumak (Super coil) tarzında 4000 bp civarında görüntülendi.

2.2.9. Vektör ve 5'+3' homoloji bölgesinin Sal I- Xho I kesim enzimleri ile muamelesi

Saf olarak elde edilen süper yumak halindeki pJQ200KS plazmidi ve tek parça haline getirilmiş 1250 bp'lık homoloji bölgesi Sal I HF ve Xho I kesim enzimleri ile üretici firma (NEB) protokolüne göre hazırlandı (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.6. Vektör ve *insert*'ün kesim enzimi protokolü

Firma Protokolü		**Vektör için**	**5'+3' HB 1250bp *insert*'ü için**
DNA	1 µg	20µl (20x143.1ng=2862ng)	30µl (30x128ng=3840ng)
Cut Smart buffer	5 µl	10 µl	10 µl
Sal I-HF	1 µl	2 µl	2 µl
Xho I	1 µl	2 µl	2 µl
Ultra Saf Su	50 µl'ye tamamlanır	100 µl'ye tamamlanır	66 µl'ye tamamlanır

Hazırlanan karışım 37˚C'de 15 dk inkübe edildi ve 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren % 1'lik agaroz jelde elektroforeze edildi. Marker olarak 100 bp marker kullanıldı. UV görüntüleme cihazında görüntülenen band jelden kesilip, jel ekstraksiyon kiti (Macherey-Nagel Gmbh, Germany) ile artık ürünlerden ve jelden arındırılıp saflaştırıldı.

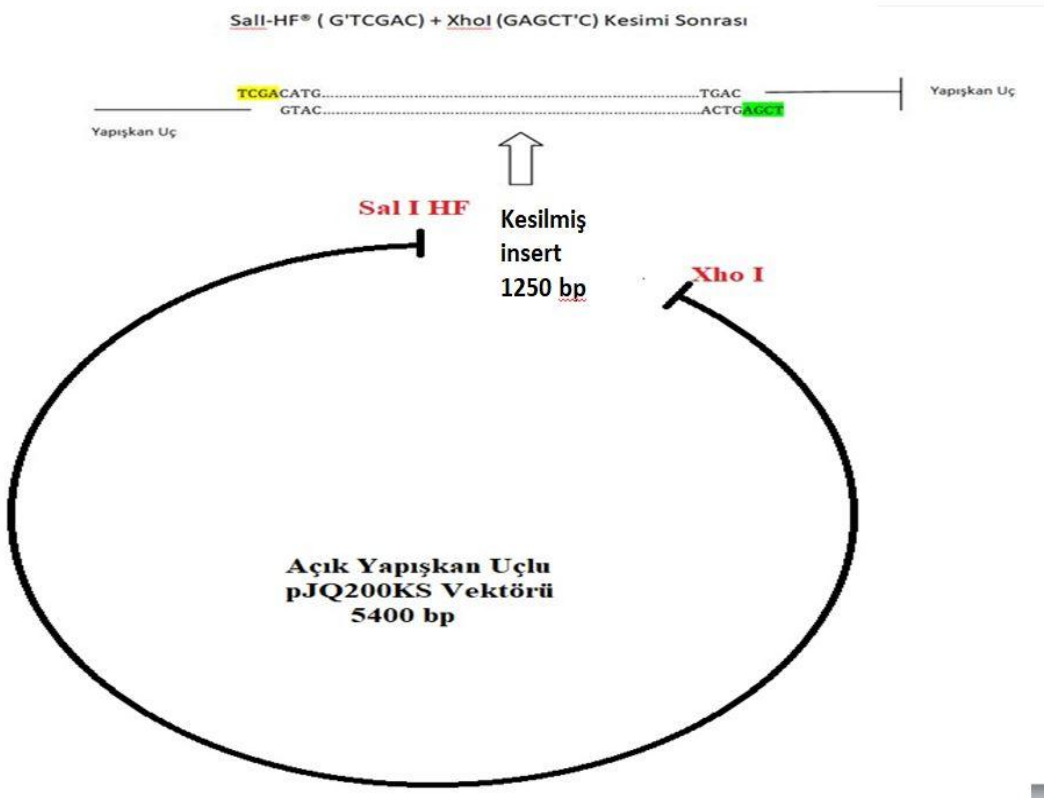
2.2.10. Kesilmiş vektör ve kesilmiş *insert* 5'+3' homoloji bölgesinin ligasyonu

Ligasyon protokolü 10 dk 25˚C'de protokol takip edildi (Çizelge 2.7).

Çizelge 2.7. Vektör ve *insert*'ün ligasyonu

	Firma protokolü	Takip edilen protokol
Vektör DNA	50 ng	2 µl (57.2ng/µl)
Cut İnsert 5'+3'HB DNA	50 ng	2 µl (51.7 ng/µl)
T4 DNA ligase buffer	2 µl	4 µl
T4 DNA ligase	1 µl	2 µl
Ultra Saf Su	20 µl total hacim	40 µl total hacim

Karışımın yarısı oda sıcaklığında 10 dk, yarısı 16˚C'de bir gece inkübe edildi. Bunun yanı sıra negatif kontrol olarak *insert* ilave etmeksizin ligasyon protokolü uygulandı. Ayrıca işlem görmemiş saf boş vektörde pozitif kontrol olarak kullanıldı.



Şekil 2. 5. Kesilmiş pJQ200KS ve homoloji bölgesi insert'ünün ligasyonu

2.2.11.Ligasyon ürünün *E. coli* DH5α'ya ısı yoluyla transformasyonu

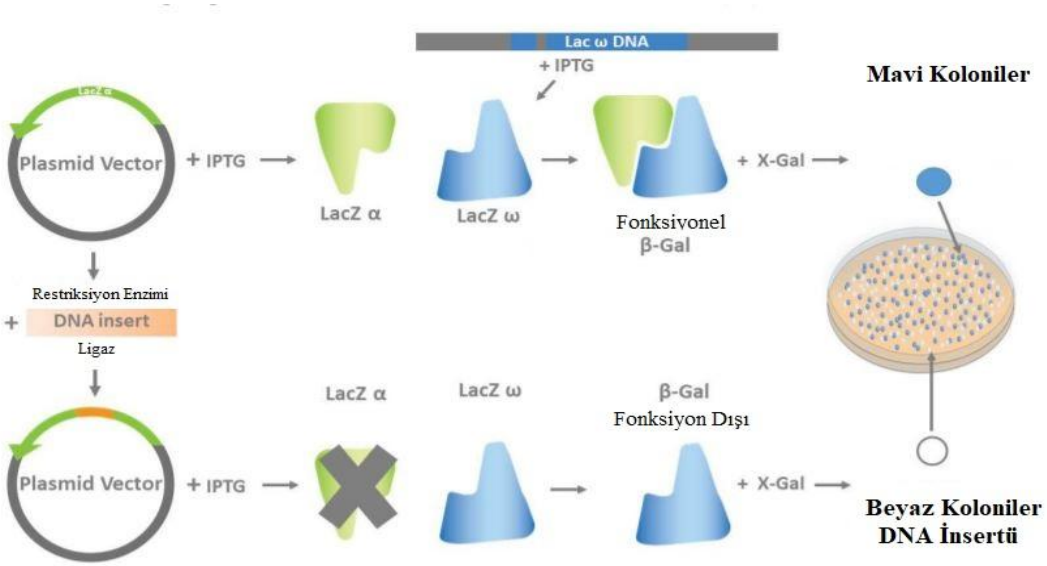
Klonlama için 20 mg/ml X-Gal, 100 mM IPTG ve 15 µg/ml gentamisin içeren LB agar besiyeri hazırlandı. Kompetent *E. coli* DH5α (New England Biolabs, Inc ABD, C2987H) -80ºC'den çıkarılarak parça buza koyuldu ve 5 dk hücrelerin çözünmesi beklendi. Üzerine 1/10 oranı korunacak şekilde ligasyon reaksiyonundan 5 µl alınarak 50 µl kompetent bakteriye zarar vermeyecek şekilde tüp karıştırıldıktan

sonra 30 dk parça buzda inkübasyona bırakıldı. Hücreler 42ºC'ye ayarlanmış ısı döngü cihazı (T100, Biorad), inkübasyon modunda 30 sn ısı şokuna tabi tutuldu. Parça buz içerisinde 5 dk inkübe edildikten sonra, 950 µl S.O.C medium eklenerek çalkalayıcı etüvde 1 saat 37˚C'de 200 rpm'de inkübe edildi. Bu şekilde antibiyotik direnç geni aktif hale getirildi. Kültürden, 15 µg/ml gentamisin içeren LB agar besiyerine onluk sulandırma sonrası 10^{-1} ve 10^{-2} pasajlar yapıldı. Normalde *E. coli* 12 saat içerisinde koloni oluşturmasına rağmen mavi-beyaz koloni ayrımının şekillenmesi için kültürler 72 saat inkübe edildi.

2.2.12. Mutant pJQ200KS taşıyan kolonilerin tespiti

Mavi-beyaz koloni ayrımı

Mutant vektörü taşıyan *E. coli*'nin daha net anlaşılabilmesi için kullanıldı. MCS bölgesi içerisine 1250 bp insert eklendiğinde bozulan lac operatörü X-gal'ı hidrolize edemediği için beyaz renkte koloni oluşturacaktır. Eğer açık uçlu hale getirilmiş vektör gen eklenmesi olmaksızın kapanır ise mavi renkli koloniler oluşacaktır. Tranformasyon sonrası besiyeri yüzeyinde gelişen beyaz koloniler sonraki doğrulama işlemleri için numaralandırılıp 15 µg/ml gentamisin içeren LB buyyon içerisine pasajlandı. Çalkalayıcı etüvde 12 saat 37˚C 200 rpm'de inkübe edildi (Şekil 2.6).



Şekil 2. 6. Plazmid MCS bölgesi gen eklenmesine bağlı beyaz mutant koloninin ayrımı

Mutant kolonilerden plazmid izolasyonu

Çoğaltılan mutant hücre kültüründen, plazmid miniprep izolasyon kiti (E.Z.N.A.® plazmid mini kit, Omega Bio-tek, Inc.ABD) ile mutant vektörü saf olarak elde etmek için kit protokolü takip edildi. Kültürden 5 ml alınarak 10000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Üst kısım alındı pelet üzerine 250 µl solüsyon I/RNase A eklendi ve karışım pipete edildi. Karışım üzerine 250 µl solüsyon II eklendi yavaşça alt üst edilerek liziz işlemi esnasında süre 3 dk'yı geçirilmedi. Solüsyon III 350 µl eklenip karışım 10 kez alt üst edildi ve nötralizasyonun tamamen sağlanması için parça buz üzerinde 10 dk inkübe edildi. 13000xg'de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı HiBind® DNA mini kolum içerisine alındı ve 13000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Kolum içerisine 500 µl HBC buffer eklenerek 13000xg'de 1dk santrifüj edildi. İki kez tekrarlanacak şekilde 700 µl yıkama solüsyonu eklenerek 13000xg'de 1 dk santrifüj edildi ve kolum artıklardan uzaklaştırıldı. Boş olan kolum 13000xg'de 2 dk daha santrifüj edildi. Kuruması için 10 dk beklendi. Son olarak 70ºC sıcaklıktaki elüsyon buffer'dan 25 µl eklenerek 13000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen plazmid DNA'sı nanodrop ile ölçülüp -20ºC'de saklandı.

Mutant kolonilerin PZR ile doğrulanması

Gen aktarımının şekillendiğini doğrulamak için izole edilen rekombinant mutant plazmid DNA'sı, MCS bölgesini içine alan universal primer çifti ile amplifiye edildi. MCS bölgesinin gen amplifikasyonu için ileri bölge primeri Universal F ile geri bölge primer Universal T3-R kullanıldı. MCS bölgesi amplifikasyonu için her PZR tüp içeriği 20 µl olacak şekilde ayarlandı. Primerlerden toplam 4 µl (10'ar pmol), Master Mix 5X'ten 4 µl, steril ultra saf sudan 7 µl ve DNA'dan 5 µl kullanıldı. Bu karışım ısı döngü cihazında, 95°C'de 5 dk ön denatürasyon, 30 döngü (95°C'de 60 sn, 52°C'de 90 sn ve 72°C'de 90 sn) son uzatma olarak 72°C'de 10 dk tutuldu.

PZR ürünleri'ne 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren % 1'lik agaroz jelde elektroforeze edildi. Marker olarak 100 bp marker kullanıldı. Primerler, *insert* bölgeye eklenmediğinde 81 bp'lık ürün, dahil olduğunda ise yaklaşık 1300 bp'lik bir bölge amplifiye edilecek şekilde dizayn edildi.

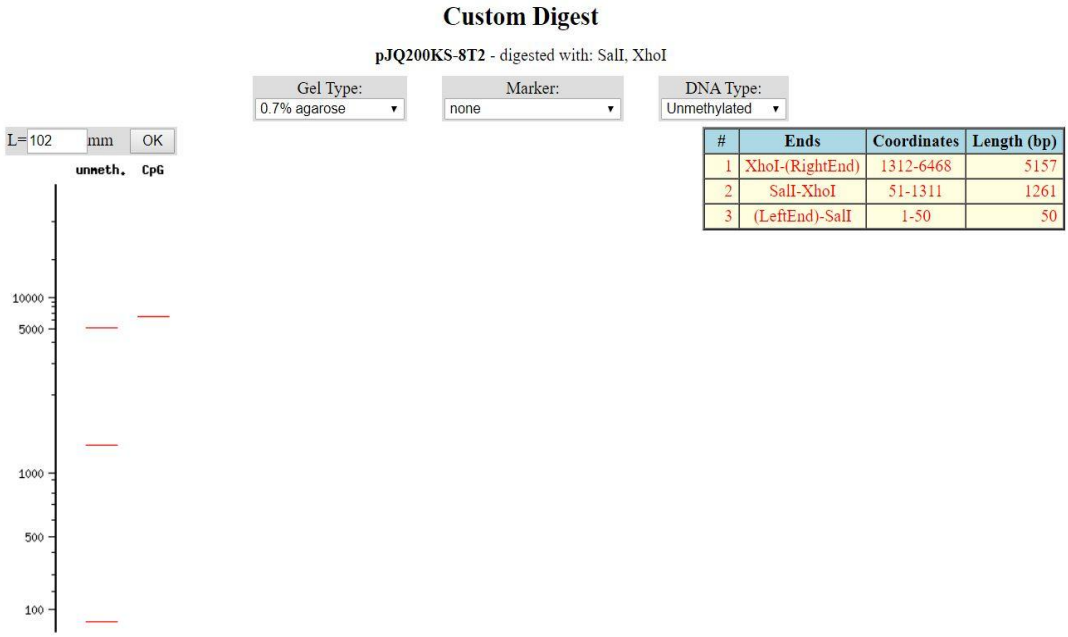
Mutant vektör'ün Sal-I ve Xho-I kesim enzimiyle kesilmesi

Kesim işlemi Sal-I ve Xho-I enzimi vektör *backbone* ve *insert* kısmının görüleceği bölgeler NEB firmasının sağladığı analiz programı ile kontrol edildi (Şekil 2.7). Mutasyonun doğrulanması için PZR pozitif mutant, bakteriden izole edilen plazmid nanodrop ölçüldü 388 ng/µl bulundu (Çizelge 2.8).

Çizelge 2.8. Kesim enzimleri sonucunda insert ve vektörün gösterilmesi

	Firma Protokolü	**Vektör**
DNA	1 µg	4µl (4x388ng=1552ng)
Cut Smart buffer	5 µl	5 µl
Sal I-HF	1 µl	1,5 µl
Xho I	1 µl	1,5 µl
Ultra Saf Su	50 µl'ye tamamlanır	50 µl'ye tamamlanır

Restriksiyon enzim protokolü takip edilerek kesim işlemine 37˚C'de 60 dk inkübasyon ile gerçekleştirildi. Hem vektör *backbone* hem de insert kısmı UV ile görüntüledi.



Şekil 2. 7. NEB firması restriksiyon enzimi analiz programı vektör *backbone* ve insert simülasyonu

Rekombinasyonun dizi analizi ile doğrulanması ve verilerin bioinformatik analizi

Mutant bakterilerin sahip olduğu rekombinant plazmidler universal primer çifti ile amplifiye edilen PZR ürünleri 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren % 1'lik agaroz jelde elektroforeze edildi. Marker olarak 100 bp marker kullanıldı. Yaklaşık 1300 bp'lik band UV altında agaroz jelden kesilerek 1.5 ml'lik DNase-RNase free ependorf tüpüne aktarıldı. Ependorf tüpünde bulunan her 100 mg jel üzerine, jel PZR Clean up kitindeki (Macherey-Nagel Gmbh, Germany) eritici solüsyondan 200 µl ilave edilerek 70ºC'de 5 dk su banyosunda (Memmert, WNB14, Germany) jel erinceye kadar bekletildi. NucleoSpin® jel ve PZR temizleme kolum içerisine aktarıldı 11.000xg 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildikten sonra iki kez 700 µl yıkama solüsyonu kolona ilave edilerek 11.000xg'de 1 dk santrifüj edildi. DNA eldesi için son aşamada 100 µl DNA sulandırma solüsyonu kolona ilave edilerek 16.000xg 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildikten sonra herhangi bir solüsyon eklenmeksizin 11.000xg 2 dk santrifüj edildi ve kolum kurumaya bırakıldı. Steril ependorf tüpüne alınıp 20 µl elüsyon buffer eklendi ve 11.000xg 1 dk santrifüj edildi. Tüpün dip kısmında biriken DNA miktarı, nanodrop ile belirlendi. Her bir reaksiyon için primer çiftlerinden 10'ar pmol/µl, her bir plazmid DNA'sından 15 µl (57,9 ng/µl) totalde 50 µl olacak şekilde soğuk zincirde Pendik VKE'ne dizi analizi için gönderildi. Dizi analizi sonucunda elde edilen grafiksel sonuç çift yönlü okumaları birleştirilerek tek bir dizi elde etmek için; Codoncode Aligner, dizi mutasyonları olup olmadığını okuma hatalarını görmek için MEGA 7 programı kullanıldı. Dizi analizi sonucu çıkan veriler NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) gen bankası *B.melitensis* bv.1. Rev.1 verileri ile karşılaştırıldı.

2.2.13. Mutant vektör elde edilmesi

Maxi prep kiti ile vektör elde edilmesi

Dört farklı yolla gen eklenmesi belirlenen ve en stabil olan 8T2 isimli mutant uygun koşullarda 5 kat hacim farkını barındıran 1000 ml bakteri kültürü 12 saat süre ile 37˚C 200 rpm'de çalkayıcılı etüvde inkübe edildi. Daha sonrasında 8000xg'de 10 dk santrifüj edildi. Zymopure P1 (Kırmızı) solüsyondan 14 ml ilave edildi ve hücre peleti pipete edilerek çözdürüldü. Karışıma Zymopure P2 (Yeşil) solüsyondan 14 ml

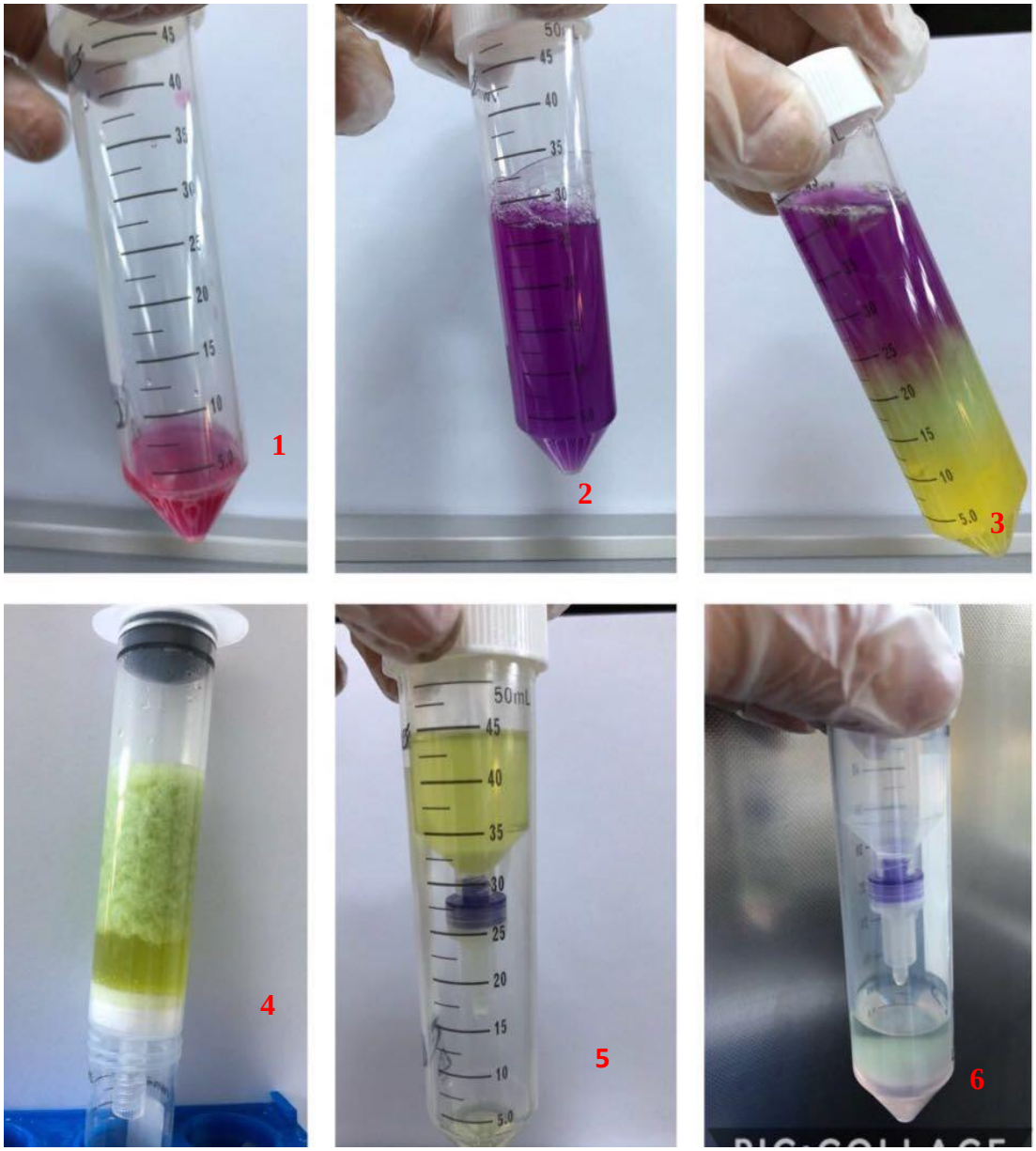
eklenerek 2 dk boyunca tüm lizat mor renk alana kadar beklenildi. Sonrasında Zymopure P3 (Sarı) solüsyondan 14 ml eklenerek ve yavaşça karıştırıldı ve tüm solüsyonun nötralizasyon tamamlanınca sarımsı bir renk ve yoğun bir form alması için beklendi. Nötralizasyon sonrası üst sıvı ve yoğun form ZymoPURE™ şırınga filtre içerisine aktarılarak yeni bir falkon içerisine süzüldü ve 34 ml olan temiz lizat içerisine 14 ml ZymoPURE™ bağlanma solüsyonu eklenerek 10 kez alt üst edildi.



Şekil 2. 8. ZymoPure-endozero plazmid maxi prep kiti (ZymoResearch, USA)

Toplamda 48 ml olan karışım kısım kısım 15 ml konik Reservoir/ZymoSpin™ V-P kolum içerisine yüklendi ve 500xg 2 dk santrifüj edildi. Tüm temiz lizat kolumdan geçirildikten sonra 5 ml yıkama solüsyonu 1 ile yıkandı. Daha sonra 2 kez yıkama solüsyonu 2 ile kolum artık ürünlerden temizlendi. Konik toplama aparatı çıkarılarak kolum alt kısmı ependorfa koyuldu ve 13000xg'de 2 dk santrifüj edildi. Kuruması için beklendi. Üzerine 100 µl 70ºC'de ultra saf su eklenerek 2 dk boyunca katmanlara yayılması için beklenildi ve 13000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Plazmid DNA'sının belirlenmesi için nanodrop ile ölçüm yapıldı ve -

20ºC'de saklandı.

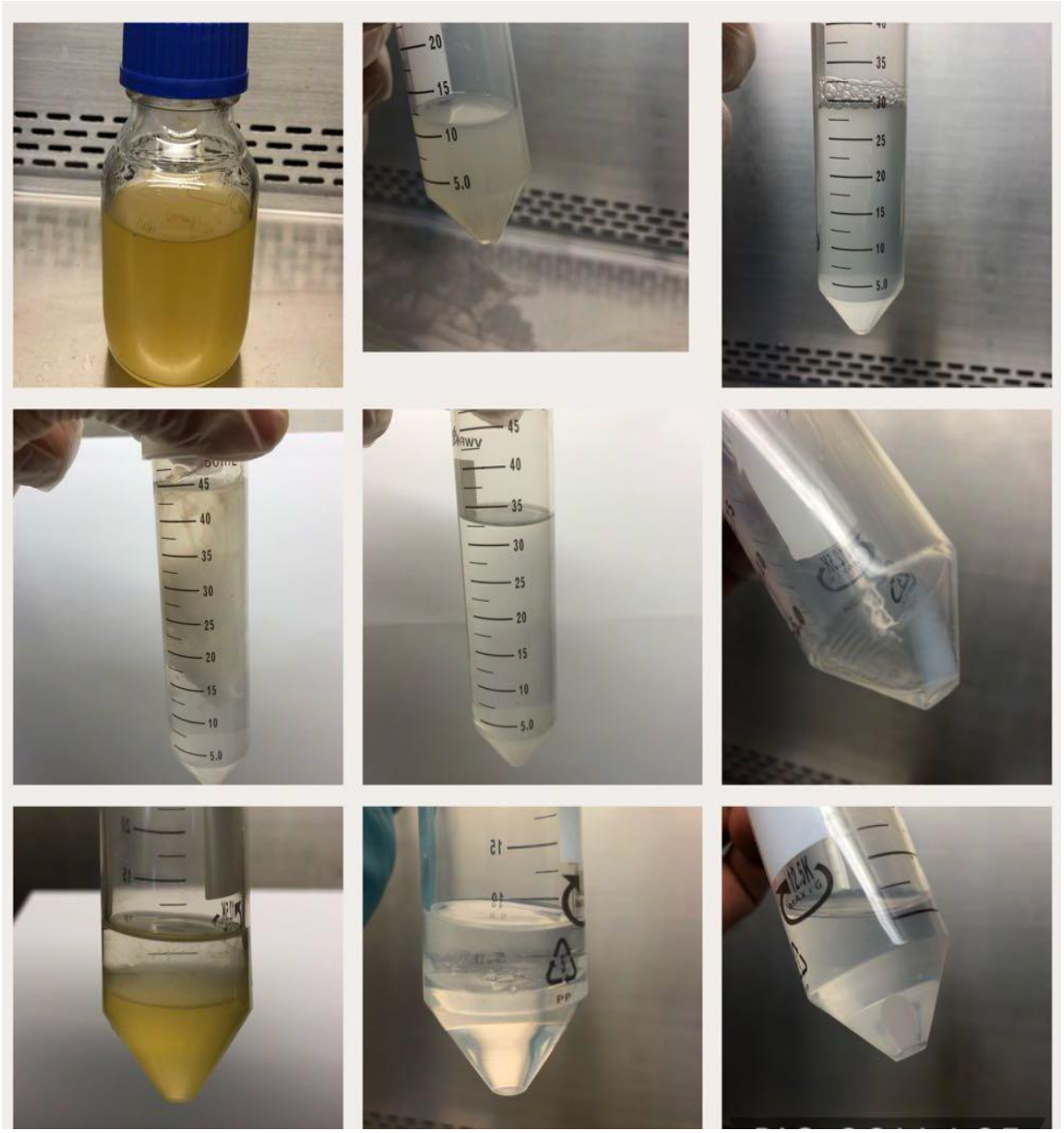


Şekil 2. 9. Maxiprep kiti, mutant vektör eldesi için gerekli aşamalar;1- 200 ml kültür santrifüj sonrası peleti resüspansiyon solüsyonu P1 ilavesi, 2- lizis solüsyonu P2 ilavesi, 3- nötralizasyon solüsyonu P3 ilavesi, 4- lizis sonrası oluşan debrisin filtre sistemi ile vektöre zarar vermeden uzaklaştırılması, 5- süpernatant içindeki vektörün bağlanması için kolum'a yüklenmesi, 6- tuz ve artık proteinlerin kolumdan uzaklaştırılması için yıkama basamakları

Alkalen lizis ile plazmid izolasyonu

8T2 isimli mutant uygun koşullarda 5 kat hacim farkını barındıran 1000 ml bakteri kültürü 12 saat süre ile 37˚C 200 rpm'de çalkayıcılı etüvde inkübe edildi. Sonrasında santrifüj (8000xg'de 10 dk) edildi. Pelet üzerine 20 ml solüsyon I

eklendi ve pipete edilerek homojenize edildi. Karışım üzerine 40 ml solüsyon II eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Üzerine parça buzda bekletilen 30 ml solüsyon III eklendi ve 10 dk parça buz'da bekletildi. Nötralizasyonu tamamlanmış olan karışım santrifüj (8000xg'de 20 dk) edildi. Üst sıvı peletten ayrılıp yeni bir falkona alındı ve tekrar santrifüj (8000xg'de 10 dk) edildi. Tuz ve alkolün plazmidi presipite etmesi için 55 ml isopropanol eklendi ve 10 dk boyunca parça buz içersinde inkübe edildi. Karışım santrifüj (8000xg'de 20 dk) edildi. Üst kısım uzaklaştırıldı ve 10 ml %70 etanol eklendi ve 10 dk boyunca buzda inkübe edildi. karışım santrifüj (8000xg'de 5 dk) edildi. Etüv içerisinde alkol uçurulup pelet kuruyana kadar beklenildi. Pelet 5ml Tris EDTA buffer ile çözdürüldü +4˚C'de 1 gece inkübe edildi. 100 µl RNase A eklenerek 37˚C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Karışıma eşit miktarda fenol kloroform solüsyonu eklendi ve santrifüj (5000xg'de 5 dk) edilerek organik ve sulu faz oluşumu gözlendi. Üstte ki sulu faz yeni bir falkona toplandı. DNA'dan fenol etkisini uzaklaştırmak için 2 ml klorofom ve 40 µl isopropanol eklenerek 13000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Pelet üzerine 2,5 kat %99 etanol ve 1/10 oranında sodyum asetat (pH 5) eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 8000 g'de 20 dk santrifüj edildi. Pelet iki kez soğuk %70 etanol ile yıkanıp kurutulduktan sonra 200 µl ultra saf su ile elüe edildi. İzole edilen plazmid DNA'sı nanodrop ile ölçüldü ve gen aktarımına kadar -20˚C'de saklandı.



Şekil 2. 10. Alkalen lizis protokolü; 1- mutant vektörü içeren kompetant *E. coli* kültürü, 2-santrifüj sonrası peletin resüspansiyon solüsyonu ile homojenize hale getirilmesi, 3- lizis solüsyonu ilavesi, 4- nötralizasyon solüsyonu ilavesi, 5-santrifüj sonrası debristen arındırılan süpernatant'ın yeni falkona aktarılması, 6- santrifüj ile vektör ve protein kalıntılarının dibe çöktürülmesi, 7-fenol kloroform ilavesi ile 3 faza ayrılması (en üst aköz fazda vektör, orta fazda protein ve tuz kalıntıları, alt fazda fenol-kloroform) 8- fenol'den arındırmak için kloroform ilavesi ile 2 faz oluşumu 9- Bir gece boyunca -20ºC derecede etanol ile vektör DNA'sının presipitasyonu

Alkalen lizis metodu ile 200 ml kültürden 4874.1 ng/µl, 500 ml kültürden 8929 ng/µl ve 1000 ml kültürden elde edilen 157975 ng/µl konsantre vektörler bundan sonraki aktarım protokolleri için tercih edildi.

2.2.14. Kompetent Brucella hazırlanması

B.melitensis bv. 1 Rev.1'in sferoplastlaştırılması

Konsatre olarak elde edilen mutant vektörün Brucella'ya en az zararı verecek en etkili şekilde aktarımı gerçekleştirmek için denemeler yapıldı. Brucella'nın Gram-negatif yapıda hücre duvarına sahip olması, kromozomal gen miktarının 3.29 Mb civarında olması ve doğal plazmidinin bulunmaması çalışmayı zorlaştırmıştır. Aktarılacak mutant plazmidin de 6,7 kb (*Backbone* 5,4kb + 1,25kb *İnsert*) büyüklüğünde olması gen aktarımı üzerine etkili bir faktördür.

Deneme grupları için 3 farklı Brucella buyyon içeriği hazırlandı 100 ml Brucella buyyon içerisine 2 gr glisin eklendi ve otoklavda steril hale getirildi. Diğer gruplar için Brucella buyyon otoklavda steril hale getirildi. Sonrasında 100 ml besiyerine 100 µl ampisilin stok solüsyonundan eklenerek son hacimde 10 µg/ml ampisilin, diğer grupta 100 ml besi yerine 10µl penisilin G stok solüsyonundan eklenerek son hacimde 5 µg/ml penisilin G olması sağlandı.

Ana stoktan kanlı agara ekim yapılarak 10-20 adet *B. melitensis* Rev.1 kolonisi 3 farklı Brucella buyyona (20 ml) pasajlandı ve 24 saat boyunca 37ºC 160 rpm'de inkübe edildi. OD 600 değerleri 0.220 olarak belirlendi. 8000xg'de 5 dk santrifüj edildi. Peletler yine aynı hacimde, ampisilin (10 µg/ml) Brucella buyyon, glisin (%2) Brucella buyyon ve penisilin G (5 µg/ml) Brucella buyyon içerisine pasajlandı ve çalkalayıcı etüvde 80 rpm 37ºC'de 72 saat süre ile inkübe edildi. Bu 3 sferoplast grubu ile beraber 24 saat'lik genç *Brucella* kültürü ve 96 saatlik yaşlı *Brucella* kültürüde deneme için alındı (Hines ve ark 1964, 1964, Gheibi ve ark 2019).

Sferoplast Brucella'nın elektroporasyon kompetenti haline getirilmesi

Tüm deneme kültürleri ikiye bölünerek 5000xg'de 8 dk santrifüj edildi. Peletler 10'ar ml buzda bekletilmiş %10 gliserol ile çözdürüldü ve 30 dk buzda inkübe edildi. Bu işlem buzda inkübasyon süresi her seferinde 5 dk azalacak şekilde 4 defa daha tekrarlandı. Son inkübasyon periyodu (10 dk) ardından aynı şekilde santrifüj edildi. En son aşamada kompetent Brucella pelleti 600 µl %10 gliserol ile

çözdürüldü ve elektroporasyon işlemine kadar -80ºC de saklandı. Yapılan sayımlarda bu süspansiyonlar içerisinde yaklaşık $5x10^{10}$ CFU/ml bakteri bulunduğu tespit edildi.



Şekil 2. 11. *B. melitensis* Rev.1'in elektroporasyona uygun kompetent hücre haline getirilmesi

2.2.15. Elektroporasyon

Birçok ön çalışma ile elektroporasyon duyarlı hale getirilmeye çalışıldı. Ana hedef istenen elektirik akımının 20 msn boyunca devam etmesiydi. Bu sebep ile öncelikle *time costant* protokol seçilerek direnç 100 Ω ile 1000 Ω arasında değiştirildi. Ancak 1000 Ω dirence maruz bırakıldığında 20 msn aktarım süresine ulaşılabildi.

Ön çalışmalarda çok yoğun plazmid kullanıldığında vektör DNA'sı içerisinde bulunan ve arındırılamayan tuz parçacıklarının Arc hatasına sebep olduğu tespit edildi.

Bu çalışmada temel metod olarak önerilen protokol takip edildi ve sonuçlara göre modifikasyonlar uygulanarak protokeller takip edildi (McQuiston ve ark 1995, Ficht ve ark 2010, Potter ve Heller 2018).

İstenen değerleri verebilecek *exponential* protokolü protokolü olan Gene Pulser Xcell (Bio Rad) ile denemelere devam edildi.



Şekil 2. 12. Elektroporasyon denemelerinde kullanılan Gene Pulser Xcell (BioRad) cihazı



Şekil 2. 13. Elektroporasyon sonuçları; 1- exponential protokol cihaza uygulama girişi, 2- elektroporasyon 5-3 exponential protokol cihaz sonucu, 3-time constant protokol cihaza girişi 4- elektroporasyon 6.1 time constant protokol cihaz sonucu 5- elektroporasyon 3.7 time constant protokol cihaz sonucu 6- elektroporasyon 6.6 time constant protokol cihaz sonucu

1- Elektroporasyon küveti içerisinde Vektör DNA miktarı, kompetent miktarının 1/10'u kadar olacak şekilde oranlandı (200 µl kompetent için 20 µl vektör),
2- Vektör DNA'sı en az 1 µg olacak şekilde elektroporasyona başlandı (yaklaşık olarak 250 ng/µl)
3- Plazmid DNA'sı tuz ve alkolden arındırıldı,
4- Küvet (0.2 cm boşluklu) aktarımın güçlenmesi için aktarım öncesi buzda inkübe edildi,
5- Kompetent ve vektör karıştırıldıktan sonra 20 dkbuz içerisinde inkübe edildi,
6- Elektroporasyon parametreleri, time costant 2500 V, 200 Ω, 20 msn boyunca akım devam etmesine özen gösterildi eğer exponential decay protkolde ise 2500 V, 400 Ω, 25 µF tercih edildiğinde yine akım 20 msn devam etti (Çizelge 2.9),
7- Elektroporasyon sonrası bakteriler ısıtılmış 200 ul SOC medium ve 800 µl TSB ile karıştırıldı ve 24 saat süre ile 160 rpm 37ºC'de inkube edildi,
8- Antibiyotik direnci yönünden seleksiyona tabi tutuldu. Geri canlandırma ile edilen kültürden 100 µl gentamisin içeren Brucella agara ekimi, aynı zamanda antibiyotiksiz Brucella agar veya kanlı agara ekimleri yapılarak işlem sonrası bakteri canlılıkları kontrol edildi.
9- Dört gün boyunca petriler kontrol edildi.

Çizelge 2.9. *Exponential* protokol bugluları

Elektroporasyon Deneme Sayısı	Kompetent Özelliği	Küvette Bulunan Plazmid İzolasyon Yöntemi	Küvette Bulunan Kompetent	Küvette Bulunan Vektör Miktar	Cihaza girilen değerler	Pulzasyon sayısı	Cihazın verdiği değerler
1	24 saatlik genç kültür	Alkalen Lizis	200 µl	1µl 5µg / µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2469 V 18.6 msn
2	24 saatlik genç kültür	Alkalen Lizis	200 µl	1µl 10µg / µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2470 V 19.5 msn
3	24 saatlik genç kültür	Maxiprep Kit	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2470 V 19.3 msn
4	96 saatlik yaşlı kültür	Alkalen Lizis 5µg	200 µl	1µl 5µg / µl	2500 V 400 Ω 525 µF 0.2 cm	1	2469 V 18.6 msn
5	96 saatlik yaşlı kültür	Alkalen Lizis 10µg	200 µl	1µl 10µg / µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2469 V 18.6 msn
6	96 saatlik yaşlı kültür	Maxiprep Kit 1 µg	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2470 V 19.3 msn
13	sferoplast 5µg/ml Penisilin G 48 saat	Alkalen Lizis 5µg	200 µl	1µl 5µg / µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2470 V 19.3 msn
14	sferoplast 5µg/ml Penisilin G 48 saat	Alkalen Lizis 10µg	200 µl	1µl 10µg / µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2469 V 17.8 msn
15	sferoplast 5µg/ml Penisilin G 48 saat	Maxiprep Kit 1 µg	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2468 V 17.5 msn
16	sferoplast %2 Glisin 48 saat	Alkalen Lizis 5µg	200 µl	1µl 5µg / µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2468 V 17.1 msn
17	sferoplast %2 Glisin 48 saat	Alkalen Lizis 10µg	200 µl	1µl 10µg / µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2470 V 19.3 msn
18	sferoplast %2 Glisin 48 saat	Maxiprep Kit 1 µg	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2500 V 400 Ω 25 µF	1	2470 V 19.9 msn

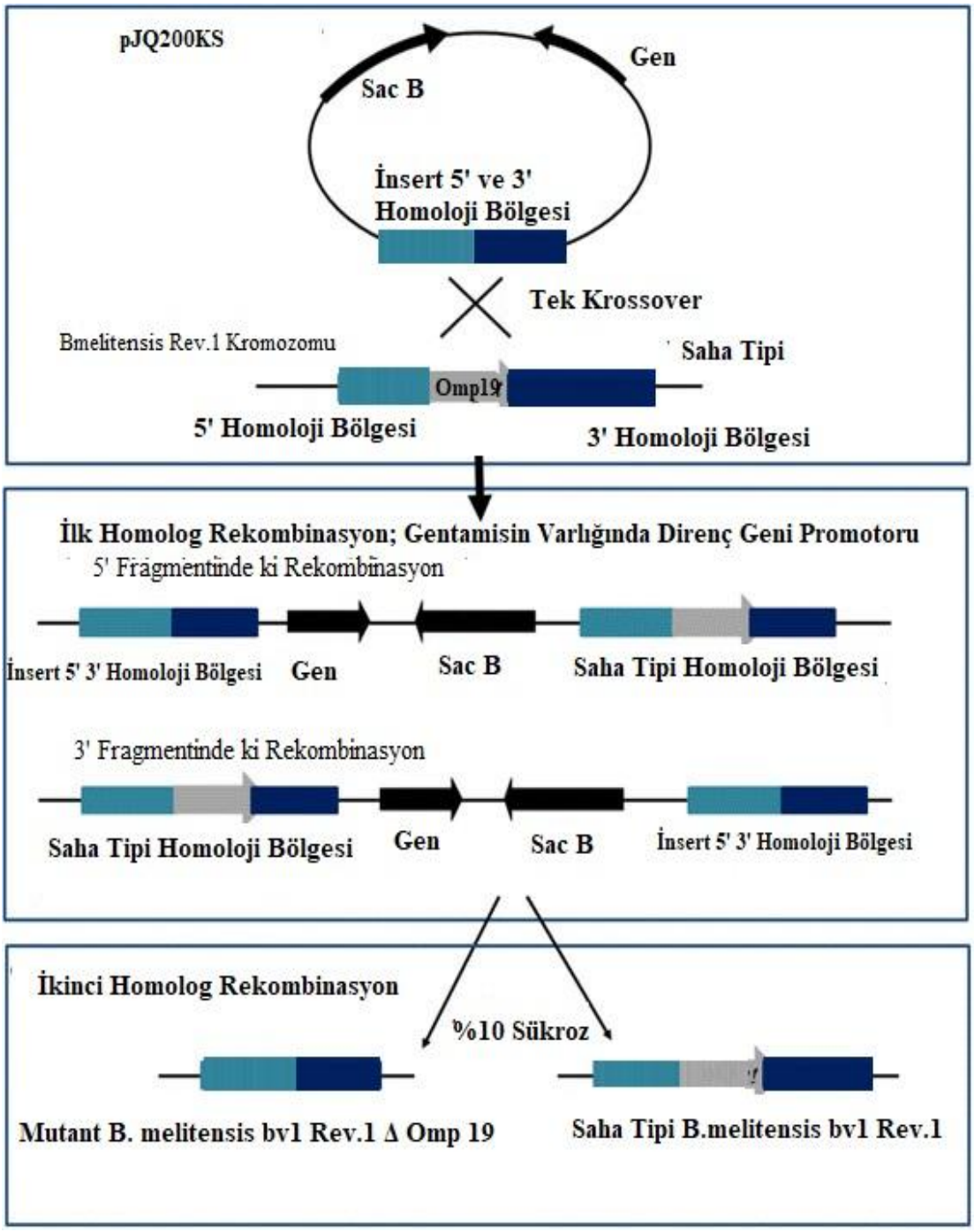
Çizelge 2.9. (Devam) *Exponential* protokol bugluları

Elektroporasyon Deneme Sayısı	Kompetent Özelliği	Küvette Bulunan Plazmid İzolasyon Yöntemi	Küvette Bulunan Kompetent	Küvette Bulunan Vektör Miktar	Cihaza girilen değerler	Pulzasyon sayısı	Cihazın verdiği değerler
19	sferoplast 10µg/ml Ampisilin 48 saat	Alkalen Lizis 5µg	200 µl	1µl 5µg / µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2469 V 18.5 msn
20	sferoplast 10µg/ml Ampisilin 48 saat	Alkalen Lizis 10µg	200 µl	1µl 10µg / µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2469 V 18.5 msn
21	sferoplast 10µg/ml Ampisilin 48 saat	Maxiprep Kit 1 µg	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2470 V 19.9 msn
40	sferoplast 5µg/ml Penisilin G 72 saat	Alkalen Lizis 5µg	200 µl	1µl 5µg / µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2468 V 17.2 msn
41	sferoplast 5µg/ml Penisilin G 72 saat	Alkalen Lizis 10µg	200 µl	1µl 10µg / µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2469 V 18.4 msn
42	sferoplast 5µg/ml Penisilin G 72 saat	Maxiprep Kit 1 µg	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2470 V 18.7 msn
43	sferoplast %2 Glisin 72 saat	Alkalen Lizis 5µg	200 µl	1µl 5µg / µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2469 V 18.3 msn
44	sferoplast %2 Glisin 72 saat	Alkalen Lizis 10µg	200 µl	1µl 10µg / µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2469 V 18.3 msn
45	sferoplast %2 Glisin 72 saat	Maxiprep Kit 1 µg	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2470 V 19.1 msn
46	sferoplast 10µg/ml Ampisilin 72 saat	Alkalen Lizis 5µg	200 µl	1µl 5µg / µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2469 V 16.0 msn
47	sferoplast 10µg/ml Ampisilin 72 saat	Alkalen Lizis 10µg	200 µl	1µl 10µg / µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2469 V 18.0 msn
48	sferoplast 10µg/ml Ampisilin 72 saat	Maxiprep Kit 1 µg	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2500 V 400 Ω 25 µF 0.2 cm	1	2470 V 19.1 msn

2.2.16. Allelik değişim

İlk kross-over beraberinde antibiyotik direnç ortamında merodiploid yapı oluşumu ile üreme görülen petrilerden rastgele seçilen koloniler, %10 sükroz içeren ve tuz içermeyen Brucella agarda sükroz direncine maruz bırakıldı. Gram-negatif bakteriler sükroz bulunan bu ortamda normal şartlarda üreyememektedir. İntihar plazmidin bu yoğun sükroz içeren ortamda ikinci kross over'ı şekillendirerek ortamdaki varlığını kaybetmesi (suicide = intihar) ve seçilen Omp19 gen bölgesi ile yer değiştirerek sükroz direnci sağlarken gen bölgesini silinmesi beklendi.

Vektör içerisindeki direnç geni 15 ug/ml konsantrasyonuna kadar gentamisine dirençlidir. Normal *B. melitensis* Rev.1. için MIC yapıldı. Selektif direnç 15 ug/ml'ten başlanarak ve 1,87 ug/ml'e kadar düşürüldü. Bu değerde Rev.1 koloni gelişimi göstermez iken elektroporasyon sonrası mutant *B. melitensis* bv.1 Rev.1 suşu yukarda belirtilen 15 ug/ml gentamisin içeren Brucella agar içerisinde koloni gözlendi.



Şekil 2. 14. İntihar vektörü allel değişimi sonucuda gen delesyonu

Sükrozlu ortamda üreme görülen petrilerden rastgele seçilen Brucella kolonileri tekrar hem sükroz besi yerine hem de antibiyotikli besi yerine ekimi yapıldı. İntihar vektör kaybından dolayı antibiyotik direnci de ortadan kalktı. İnkübasyon süresi sonunda sükrozlu besiyerinde üreyen ve gentamisinli besi yerinde üremeyen kolonide PZR testi ile delesyonun şekillendiği doğrulandı.

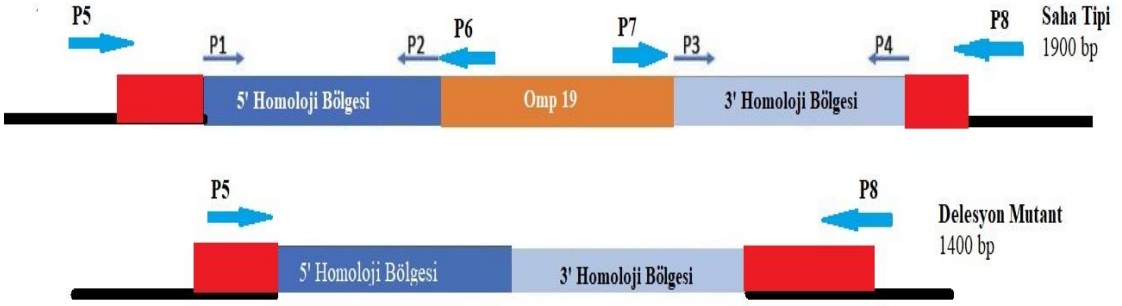
Antibiyotik direnç ortamında bulunan şüpheli kolonilerden 10'ar koloni alınara tuzsuz sükrozsuz Brucella buyyonda 3 gün inkübe edildi. Sonrasında %10 sükrozlu tuzsuz Brucella agara pasajlandı ve 37ºC'de 4 gün inkübe edildikten sonra sükroz direnci gösteren *B. melitensis* bv.1 Rev.1 ΔOmp19 kolonileri tespit edildi.

2.2.17. Elde edilen mutantta gen delesyonunun doğrulanması

Sükrozlu ortama dirençli hale gelen mutant *B. melitensis* bv.1 Rev.1 kolonileri içerisindeki Sac B geni sükrozlu ortamda üreyebilmek için gentamisin direnç genide yitirildi. Gen intiharı ve beraberinde şekillenen Omp19 delesyonu bu yöntemle tespit edildi. Bunun için; %10 sükroz'lu ortamda üreyen kolonilerden 10'ar koloni Brucella buyyon içerisine pasajlanarak 72 saat süre ile 200 rpm 37ºC'de çalkalayıcılı etüvde inkübe edildi. Kültürden Brucella agara, tuzsuz %10 sükroz içeren Brucella agara ve 15 µg/ml gentamisin içeren Brucella agara ekimleri yapıldı ve 96 saat boyunca koloni gelişimi yönünden gözlendi.

PZR ile gen delesyonunun doğrulanması

Gen delesyonu doğrulanan %10 sükroz dirençli ancak 15 µg/ml gentamisin'e duyarlı hale gelen kolonilerden DNA izolasyonu yapıldı. Homoloji bölgelerini ve Omp19 ORF'ını içerisine alan 1800 bp'lık bölge 5' homoloji bölgesinin için ileri primer 5'HB-729bp F ve 3'homoloji bölgesi geri primer 3'HB-749bp R kullanılarak tüm bölge amplifiye edildi. Homoloji bölge primerleri benzer Tm değerlerine sahip oldukları için amplifikasyon her PZR tüpünde 20 µl olacak şekilde yapıldı. Primerlerinden toplam 4 µl (10'ar pmol), master mix 5x'ten 4 µl, steril ultra saf sudan 7 µl ve DNA'dan kullanılarak hazırlandı. Bu karışım ısı döngü cihazında, 95°C'de 5 dk ön denatürasyondan sonra her döngüsü 95°C'de 30 sn, 58,3°C'de 90 sn ve 72°C'de 90 sn adımlardan oluşan 35 döngülük bir reaksiyon ile çoğaltıldı. Son uzatma olarak DNA'lar 72°C'de 6 dk tutuldu (Şekil 2.15).



Şekil 2. 15. Meydana gelen delesyonu doğrulayan primer 5 ve primer 8'in amplifiye ettiği bölge şeması

Delesyonlu ve saha tipi Brucella ayrımında kullanılan primer bağlanma bölgelerinin PZR ürünleri 0,5 µg/ml etidyum bromid içeren % 1'lik agaroz jelde elektroforeze edildi. Marker olarak 100 bp marker kullanıldı. Yaklaşık 1900 bp büyüklüğündeki bantlar Omp19 gen varlığının delesyona tabi olmadığını 729 bp 5' homoloji bölgesi ortada Not I kesim enzimi ve 749 bp 3' homoloji bölgesi 1400 bp'lık bantlar homoloji bölgeleri arasında yaşanan 534 bp'lık Omp 19 bölgesinin delesyon ile kayıp olduğunu göstermektedi. Pozitif kontrol olarak *B. melitensis* bv.1 Rev. 1, negatif kontrol olarak ise steril ultra saf su kullanıldı.

Delesyonun dizi analizi ile doğrulanması

Mutant bakterilerin sahip olduğu gen delesyonu; Homoloji bölge 5'HB-729bp F ve 3'HB-749bp R primer çifti ile çoğaltılarak PZR ürünlerine 0,5 µg/ml etidyum bromid ve % 1'lik agaroz jelde elektroforeze edildi. Marker olarak 100 bp marker kullanıldı. Mutasyon şekillenmemiş saha tipi kolonilerin oluşturduğu 1800 bp'lik band ve Omp19 gen delesyonunun şekillendiği mutant kolonilerin oluşturduğu 1400 bp'lık band UV altında bistüri ile agaroz jelden kesilerek 1,5 ml'lik DNase-RNase free ependorf tüplere aktarıldı. Ependorf tüpünde bulunan her 100 mg jel üzerine jel PCR Clean up kiti (Macherey-Nagel Gmbh, Germany) eritici solüsyonundan 200 µl ilave edilerek 70ºC'de 5 dk su banyosunda (Memmert, WNB14, Germany) jel erinceye kadar bekletildi. NucleoSpin® jel ve PZR temizleme kolum içerisine aktarıldı ve 11000xg 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildikten sonra kolona iki kez 700 µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 11000xg 1 dk santrifüj yapıldı. DNA eldesi için son aşamada 100 µl DNA sulandırma solüsyonu kolona ilave edilerek

16000xg 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildikten sonra herhangi bir solüsyon eklenmeksizin 11000xg 2 dk santrifüj edildi ve kolum kurumaya bırakılıdı. Steril ependorfa alınıp 20 µl elüsyon buffer eklendi ve 11000xg 1 dk santrifüj edildi. Tüpün dip kısmında biriken DNA, nanodrop belirlendi. Her bir reaksiyon için primer çiftlerinden 10'ar pmol/µl ve her bir plazmid DNA'sından en az 20 ng/µl dizi analizi için soğuk zincirde elde edilen 6 mutant ve aynı sayıda PZR tespit edilip numaralandırılan saha tipi koloni ve pozitif kontrol *B. melitensis* bv.1 Rev.1 dizi analizleri, hizmet alımı yoluyla yardım alınan çift yönlü 1900 baz'a kadar dizi okuma kapasitesine sahip BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Sti. (Ankara) gönderildi. Dizi analizi sonucunda elde edilen grafiksel sonuç çift yönlü okumaları birleştirerek tek bir dizi elde etmek için Codoncode Aligner, dizi mutasyonları olup olmadığını okuma hatalarını görmek için MEGA 7 programı kullanıldı. Dizi analizi sonucu çıkan veriler NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) gen bankası *B. melitensis* bv1. Rev.1 verileri ile karşılaştırıldı.

2.2.18. Aşı çalışması

Ticari *B.melitensis* Rev.1'lerin hazırlanması

Türkiye'de piyasada bulunan üç *B. melitensis* bv.1 Rev.1 aşısı da çalışma gruplarına referans aşılar olarak dahil edildi. Birbirleri arasında etkinlik yönünden kıyaslamaları yapıldı. Özel izin ile alınan liyofize halde ki aşılar sulandırma sıvısı ile çözdürüldü. Brucella agara ekimleri yapıldı. İzole edilen üç ticari aşı ve mutant aşı suşları Brucella agar içeren yatık kültür şişesinde beş gün inkübe edildi. Süre sonunda 10 ml PBS ile yüzeyden kaldırılan bakteriler toplanıldı. Üretilen referans suşlar PBS içerisinde 10'luk sulandırma sisteminde 10^{-12}'ye kadar sulandırıldı. Canlı koloni sayım metodu ile 10^{-6} sulandırmadan 10^{-12}'ye kadar çift paralel 100 µl hacimlerinde Brucella agara ekimleri yapıldı ve 5 gün boyunca 37ºC inkübe edildi. Oluşan koloniler sayılarak ortalaması alındı. Saf kültürün 1 ml'si içerisindeki toplam bakteri sayısı hesaplandı. Saf kültür 0,1 ml'de $5x10^5$ CFU içerecek şekilde PBS ile sulandırıldı.

ΔOmp19 mutantı *B.melitensis* Rev.1'lerin farelerde aday aşı olarak hazırlanması

Mutant aşı suşları (17, 19, 43, 44-10, 44-12, 45, 46) Brucella agar içeren yatık kültür şişesinde beş gün inkübe edildi. Süre sonunda 10 ml PBS ile yüzeyden kaldırılan bakteriler toplanıldı. Üretilen referans suşlar PBS içerisinde 10'luk sulandırma sisteminde 10^{-12}'ye kadar sulandırıldı. Canlı koloni sayım metodu ile 10^{-6} sulandırmadan 10^{-12}'ye kadar çift paralel 100 µl haciminde Brucella agara ekimleri yapıldı ve 5 gün boyunca 37ºC inkübe edildi. Oluşan koloniler sayılarak ortalaması alındı. Saf kültürün 1 ml'si içerisindeki toplam bakteri sayısı hesaplandı. Saf kültür 0,1 ml içinde $5x10^5$ CFU içerecek şekilde PBS ile sulandırıldı. Sayımları yapılarak toplam bakteri varlığı belirlenen deneme grupları; kültür içerisindeki sayı 0,1 ml içerisinde 10^5 CFU olacak şekilde sulandırıldı ve farelere derialtı yolla enjekte edildi. Enjekte edilen miktar Brucella agara pasajlanarak verilen sayı kontrol edildi (Çizelge 2.10).

Çizelge 2.10. Aşı potens deneme grupları

Çalışma grupları	**Veriliş yolu**	**Antijen miktarı**	**Fare Sayısı**	
			Seropotens	**Çelınç**
Ticari 1	Deri altı	$5x10^5$ CFU	6	6
Ticari 2	Deri altı	$5x10^5$ CFU	6	6
Ticari 3	Deri altı	$5x10^5$ CFU	6	6
Sub unit Omp19	Deri altı	10 µg protein+IFA	6	6
İnaktif H38	Deri altı	İnaktif $5x10^5$ CFU +IFA	6	6
Mutant 17	Deri altı	$5x10^5$ CFU	6	6
Mutant 19	Deri altı	$5x10^5$ CFU	6	6
Mutant 43	Deri altı	$5x10^5$ CFU	6	6
Mutant 44-10	Deri altı	$5x10^5$ CFU	6	6
Mutant 44-12	Deri altı	$5x10^5$ CFU	6	6
Mutant 45	Deri altı	$5x10^5$ CFU	6	6
Mutant 46	Deri altı	$5x10^5$ CFU	6	6

OIE farelerde immünojenite kısmında belirtildiği üzere her deneme grubunda 5-7 haftalık yaşta ve 18-23 gr ağırlığında 6 adet Brown swiss albino dişi fare ile denemelere başlandı (OIE 2009).

Patojenite grupları

H38 suşunun patojenitesinin belirlenmesi için kültür içerisindeki sayı 0,1 ml içerisinde 10^5 CFU olacak şekilde sulandırıldı ve farelere $5x10^5$ ve $5x10^{12}$ dozda derialtı yolla ve $5x10^5$ dozda periton içi enjekte edildilerek enfeksiyon grubu oluşturulmaya çalışıldı. Enjekte edilen miktar Brucella agara pasajlanarak verilen sayı kontrol edildi (Çizelge 2.11). Negatif kontrol grubu için 0,1 ml PBS deri altı yolla enfekte edildi. Pozitif kontrol oluşturmak amacıyla standard çelınç suşu *B. melitensis* H38 seçildi. Antijenle hiç karşılaşmamış 7 haftalık farelere deri altı yol ile 10^5 CFU, 10^{12} CFU deri altı ve 10^5 CFU periton içi yolla verildi. Çeşitli çalışmalar ve OIE Brucella'da fare modeli kısımlara göre periton içi uyarımın farelerde enfeksiyon oluşturmada etkin olduğu, deri altı yolun ise aşı kontrol denemelerinde etkinliğin belirlenmesinde uygun olduğu belirtilmiştir (Grilló ve ark 2012). Bu bilgilerden yola çıkarak doğal enfeksiyon grubu oluşturmada 3 farklı grubun antikor yanıtı kıyaslandı.

Çizelge 2.11. Patojenite çalışmasında doğal enfeksiyon ve negatif kontrol grupları

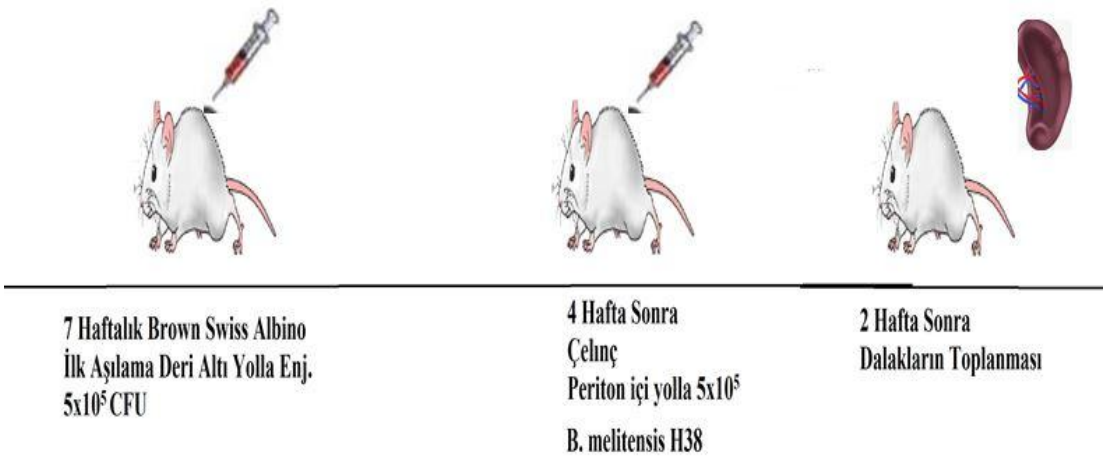
Çalışma grubu	**Veriliş yolu**	**Doz sayısı**	**Antijen miktarı**	**Fare Sayısı**	
				Seropotens*	**Çelınç***
Doğal enfeksiyon	Deri altı	Tek	$5x10^5$ CFU	6	0
Doğal enfeksiyon	Deri altı	Tek	$5x10^{12}$ CFU	6	0
Doğal enfeksiyon	Periton içi	Tek	$5x10^5$ CFU	6	0
Negatif kontrol	Deri altı	Tek	PBS	6	6

*Fare modellerinde deri altı ve periton içi uyarım farkını ortaya koymak için

Çelınç grupları

Seropotens grubu ile beraber aşılanan çelinç grubu son aşılamadan 30 gün sonra *B. melitensis* H38 ile çelınça tabi tutuldu. Kültür 0,1 ml $5x10^5$ CFU içerecek şekilde PBS ile sulandırıldı ve periton içi yolla tüm çelınç gruplarına enjekte edildi. Enjeksiyondan 15 gün sonra fareler servikal dislokasyon ile uyutuldu ve dalakları steril epondorf tüplere alınarak tartıldı. Sayım yapılana kadar -20ºC'de saklandı.

Dalaklar steril şekilde homojenize edildi. Gramajının 9 katı kadar PBS eklenerek 10^1 sulandırma elde edildi. Sulandırmadan 10^{-2} ve 10^{-3} sulandırma elde edilerek çift paralel Brucella agara (*B. melitensis* H38 ve *B. melitensis* Rev.1 aşı suşlarının üremesi için) ve ayrıca 2,5µg/ml streptomisin içeren Brucella agar (Sadece *B. melitensis* bv.1 Rev.1 aşı suşlarının üremesi için) ekimleri yapılarak 5 gün boyunca 37ºC'de inkübe edildi. Y=log (X/log X) formülasyonu ile çelinç etkinlik belirlemesi yapıldı.



Şekil 2.16. Aşı gruplarında aşılama, çelınç ve dalakların toplaması

Seropotens grupları

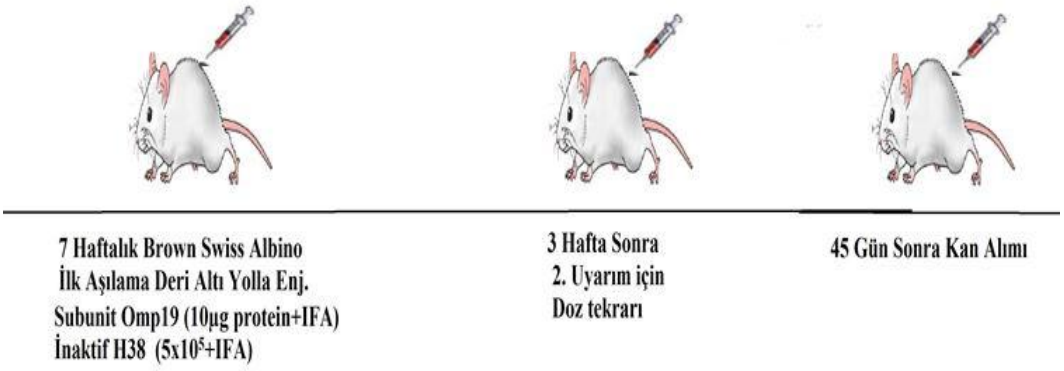
Elde edilen 6 adet mutant grubu uygun şartlarda üretildi. Kültürler, 10'luk sulandırma sistemi 10^{12}'ye kadar sulandırıldı. Canlı koloni sayım metodu ile 10^6 sulandırmadan $10^{12'}$ye kadar çift paralel 100 µl Brucella agara ekimleri yapıldı ve 5 gün boyunca 37ºC inkübe edildi. Oluşan koloniler sayılarak ortalaması alındı. Saf kültürün 1 ml'si içerisindeki total bakteri sayısı hesaplandı. Saf kültür 0,1 ml $5x10^5$ CFU içerecek şekilde PBS ile sulandırıldı. Fareler deri altı yolla 10^5 CFU aşılandı.



Şekil 2. 17. Ticari ve mutant *B. melitensis* bv.1 Rev.1 ΔOmp19 suşlarının seropotens denemesi

İnaktif *B. melitensis* H38 grubu için etken çoğaltıldı. Kültürler, 10'luk sulandırma sistemi 10^{12}'ye kadar sulandırıldı. Canlı koloni sayım metodu ile10^{6} sulandırmadan 10^{12}'ye kadar çift paralel 100 µl Brucella agara ekimleri yapıldı ve 5 gün boyunca 37ºC inkübe edildi. Oluşan koloniler sayılarak ortalaması alındı. Saf kültürün 1 ml'si içerisindeki total bakteri sayısı hesaplandı ve % 0,5 oranında formaldehit ile kültür inaktive edildi. Kültürün inaktive olduğunu doğrulamak için Brucella agara ekim yapıldı. Saf kültür 0,1 ml $5x10^{5}$ CFU içerecek şekilde PBS ile sulandırıldı. Aynı miktarda incomplete freund adjuvant ile eklenerek vortex ile karıştırıldı ve 3 hafta ara ile deri altı yolla fareler aşılandı.

Subunit Omp19 aşısı hazırlanması için 100 µg rekombinant Brucella Omp19 proteini 0,1 ml 20 µg olacak şekilde ultra saf su ile sulandırıldı. Aşı antijeni 1:1 oranında incomplete freund adjuvant eklenerek vortex ile karıştırıldı ve 3 hafta ara ile deri altı yolla fareler aşılandı.



Şekil 2. 18. İnaktif H38 ve subunit Omp19 aşı grupları seropotens denemesi

2.2.19.Aşılı farelerin serumlarında antikor miktarının belirlenmesi

Rose bengal pleyt testi (RBPT)

Fare kan serumları ve antijen oda sıcaklığına (25ºC) getirildikten sonra beyaz bir seramik pleyt üzerine serum örneğinden 20 µl damlatıldı. Üzerine aynı miktarda antijen ilave edilip, daire oluşturacak şekilde antijen ile serum 4 dk boyunca karıştırıldı. Süre sonunda aglütinasyonun gerçekleşmesi Brusellozis yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Alton ve ark 1988, Arda ve ark 1997, Erganis ve İstanbulluoğlu 1999, OIE 2004).

Serum aglütinasyon testi (SAT)

SAT testi için 96 gözlü U tabanlı mikropleytler kullanıldı. Mikropleytin ilk gözlerine 80 µl diğer tüm gözlere 50 µl fizyolojik tuzlu su (FTS) dağıtıldı. Her bir serum örneğinden 20 µl alındı ve mikropleytlerin ilk gözlerine ilave edilip homojen bir şekilde karıştırıldı. İlk gözden ikinci göze 50 µl bir önceki sulandırmadan aktarılmak suretiyle son göze kadar 2 katlı serum sulandırması yapıldı. Daha sonra tüm gözlere eşit miktarda SAT antijeni ilavesiyle 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280 olarak sulandırıldı. Mikropleytler 37ºC de 24 saat bekletildikten sonra sonuçlar değerlendirildi (Alton ve ark 1988).

Daha az sayıda antikor seviyelerinin belirlenmesi ayrıca mikropleytin ilk gözleri boş bırakılarak diğer tüm gözlere 50 µl FTS dağıtıldı. Her bir serum örneğinden 50 µl alındı ve mikropleytlerin ilk gözlerine ilave edilip homojen bir şekilde karıştırıldı. İlk gözden ikinci göze 50 µl bir önceki sulandırmadan aktarılmak suretiyle son göze kadar 2 katlı serum sulandırması yapıldı. Daha sonra tüm gözlere eşit miktarda SAT antijeni ilavesiyle 1/2, 1/4, 1/6, 1/8 olarak sulandırıldı. Mikropleytler 37ºC'de 24 saat bekletildikten sonra sonuçlar değerlendirildi.

Enzim Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

ELISA mikropleyt gözlerinin kaplamasında kullanılacak olan tüm hücre *B.melitensis* H38 ve rekombinant Omp19 antijenlerinin protein miktar tayinleri Bradford yöntemi ile belirlendi. Bovine serum albümin (BSA) kullanılarak 0,1 µg/µl, 2 µg/µl, 4 µg/µl, 6 µg/µl, 8 µg/µl ve 10 µg/µl içeren standart solüsyonlar hazırlandı. Linear eğri için 10 µl standart, 500 µl Bradford solüsyonu eklendi. Renk dağılımı protein yoğunluğuna göre az protein içeren standart yeşil, yoğun protein içeren ise

standart maviye doğru değişim gösterdi. Bradford cihaz kuvetine sırasıyla standartlar yüklendi ve cihaz hafızasına alındı. Kendi örneğimizden 10 µl alınrak 500 µl Bradford solüsyonu ile karıştırıldı ve örnekler okutuldu. İşlem sonrasında protein miktarı belirlenen *B. melitensis* H38 ve rekombinant Omp19 antijenleri ayrı ayrı karbonat-bikarbonat solüsyonu ile sulandırılarak mikropleytin çukurları sırasıyla 1000 µg, 500 µg, 250 µg, 100 µg, 50 µg, 10 µg, 1 µg ve 0,5 µg miktarında antijenle kaplandı. Pleytler 37ºC'de 1 saat, +4ºC'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, 37ºC'de 1 saat inkübe edilerek. Üç kez yıkama işlemi tekrarlandı.

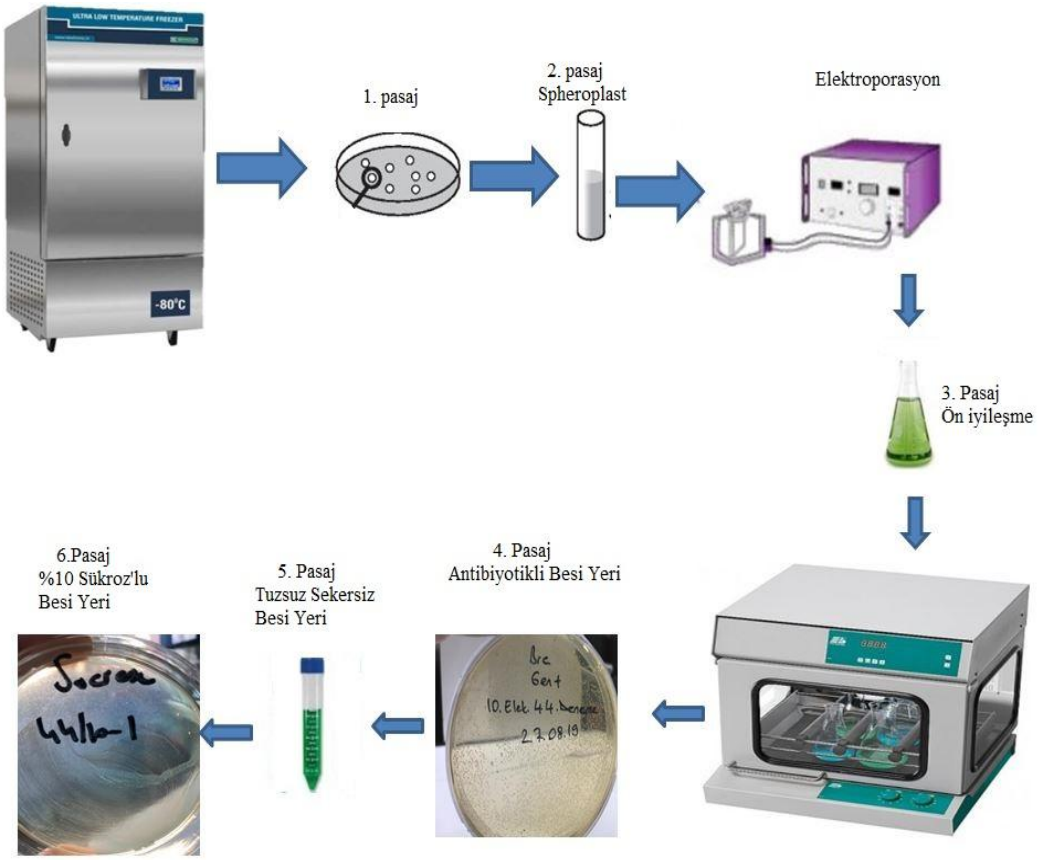
Hayvan deneyleri sonucu elde edilen yüksek antikor titresine sahip olduğu RBPT ve SAT ile doğrulanan doğal enfeksiyon grubunun serumları, pozitif serum olarak kullanıldı. PBS-T ile 6 pozitif serum 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 ve 1/1600 oranlarında sulandırıldıktan sonra antijenle kaplanan mikropleytin çukurlarına sulandırmadan 100'er µl dağıtıldı. Mikropleyt 37ºC'de 1 saat inkübe edildikten sonra PBS-T ile 3 kez yıkandı. Çukurlara 1/40000 oranında sulandırılan 100 µl tavşan anti-fare Ig G horse radish peroksidaz konjugat (Sigma-Aldrich, A9044) ilave edilerek 37ºC'de 1 saat inkübe edildi ve PBS-T ile 3 kez yıkandı. Fosfat-sitrat çözeltisi ile taze olarak hazırlanan δ- fenildiamin dihidroklorid substrat tüm çukurlara 100 µl 0,4 mg/ml substrat eklendi. Pleytler oda ısısında 30 dk inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için 50 µl H_2SO4 (0.5 M) eklenerek vakit geçirmeksizin ELISA okuyucuda 450 nm'de okutuldu.

En uygun serum sulandırması ve protein değeri dama tahtası sonucuna göre belirlendikten sonra pleytler 0,5 µg miktarında antijenle kaplandı. Pleytler 37ºC'de 1 saat, +4ºC'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, 37ºC'de 1 saat inkübe edildi. Yıkama işlemi tekrarlandı. Örnek serumları PBS-T ile 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 oranında sulandırıldıktan sonra antijenle kaplanan mikropleytin çukurlarına sulandırmalardan 100'er µl dağıtıldı. Mikropleyt 37ºC'de 1 saat inkübe edildikten sonra PBS-T ile 3 kez yıkandı. Çukurlara 1/ 40000 oranında sulandırılan 100 µl rabit anti-mouse Ig G horse radish peroksidaz konjugat (Sigma-Aldrich, A9044) 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, ABD) ile taze olarak hazırlanan δ- fenildiamin dihidroklorid substrat (δ- phenylenediamine dihydrochloride tablet Sigma p8287, ABD) tüm çukurlara 100 µl substrat eklendi. Pleytler oda ısısında 30 dk inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için 50 µl H_2SO4 (0,5 M) eklenerek vakit geçirmeksizin ELISA okuyucuda) 450 nm'de okutuldu.

2.2.20. Mutantların pasaj stabilitesi

Ana stoktan çıkarılan Rev.1 suşu ile sferoplast, kompetent hücre haline getirilmesi, ilk kross over sonrası allel değişimine maruz bırakılan suş arasında oluşan pasaj farkının Rev.1 özelliğinde meydana getirebileceği mutasyonlar yönünden incelendi. Bu amaçla delesyon mutantları IS711, *B. melitensis, ve B. abortus* spesifik primerlerle ilk inceleme ile aynı döngüde reaksiyon başlatıldı ve jel elektroforez sonrası 731 bp bandlar *B.melitensis* olarak kabul edildi.



Şekil 2. 16. Delesyon mutant ve master seed arasındaki pasaj farkı

B. melitensis olduğu doğrulanan suşlar, diğer biovarlarından farklı olarak Rev.1'de bulunan ribosomal protein S12 geni, rpsL12 F ve rpsL12 R primerleri ile

(**Gereç ve Yöntem 2.2.2)** protokol ile çoğaltıldı. Jel elektroforez sonrası 218 bp'lık bandlar *B.melitensis* Rev.1 olarak kabul edildi.

İlk referans aşı -80ºC'de saklandı. Tüm gen aktarımı sonucu mutant aşısının sekizinci pasaj olacağı öngörüldü. Mutant *B. melitensis* Rev.1ΔOmp19 suşlarına Dye test **(Gereç ve Yöntem 2.2.1)** protokoldeki gibi uygulandı.

İstatistik

Standardize edilen ELISA'nın negatif eşik değerinin belirlenmesinde, PBS enjekte edilen seropotens grubuyla ayrı kafes aynı şartlarda barındırılan RBPT ve SAT testlerinde negatif olduğu tespit edilmiş 6 adet negatif kontrol grubu fare serumları kullanıldı. Negatif eşik değeri; 6 adet kontrol serumun OD değerlerinin aritmetik ortalaması +3 kat standart sapma değeri (NKORT +3 SD) şeklinde hesaplandı.

Verilerin değerlendirilmesinde SPPS 25 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanıldı. Değişkenler ortalama±standart sapma ve Medyan (Maksimum-Minumum) yüzde ve frekans değerleri olarak belirlendi. Ayrıca parametrik testlerin ön şartlarından varyansların homojenliği "Levene" testi ile kontrol edildi. Normallik varsayımına ise "Shapiro-Wilk" testi ile bakıldı. İki grup arasındaki farklılıklar değerlendirilmek istendiğinde parametrik test ön şartlarını sağladığı durumda "Student's t Test"; sağlamadığında ise "Mann Whitney–U testi" kullanıldı. Ayrıca üç ve daha fazla grup karşılaştırması için Tek Yönlü Varyans Analizi ve çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni testi ile sağlanmadığında ise Kruskal Wallis ve çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni-Dunn testi kullanıldı.

Bir testin performansı, testin tanısal yeterliliği ya da olguları doğru olarak alt gruplara (sağlıklı/hasta vb.) ayırabilme kapasitesi ile tanımlanabilir. Seropotens ELISA grupları için kesim puanları ROC analizi ile değerlendirilmiştir. AUC değeri, duyarlılık, seçicilik değerleri hesaplandı.

İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ ve $p < 0.01$ olarak kabul edildi.

2.2.21. Etik kurul kararı

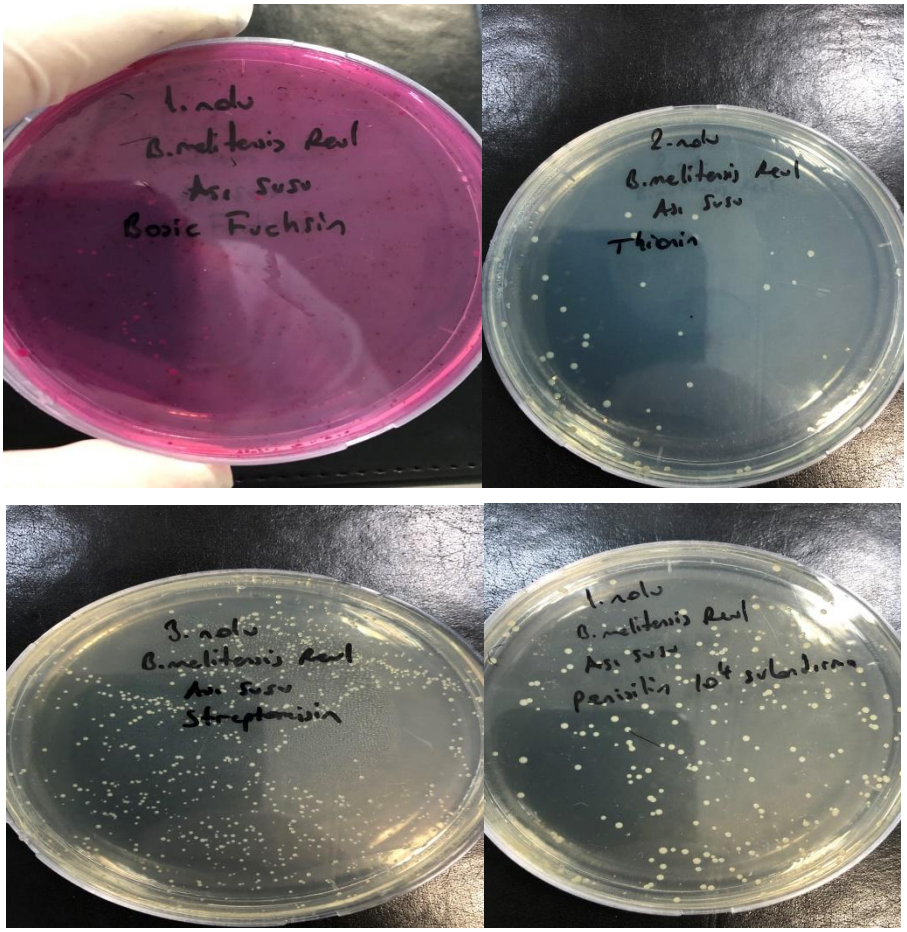
Çalışma için Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi 21.03.2017 tarihli 2017-13 karar sayılı karar ile Etik Kurul onayı alınmışdı.

3.BULGULAR

3.1.*B.melitensis* bv.1 Rev.1 doğrulanması

3.1.1. Dye Test

Dye test sonucunda; bir numaralı *B. melitensis* Rev.1 aşı suşu antibiyotik (streptomisin 2,5 µg/ml, penisilin 5 IU) ve boya varlığına (bazik fuksin 20 µg/ml, tiyonin 20 µg/ml) dirençli bulundu. Diğer aşı suşları streptomisin dirençli bazik fuksin ve tiyonin duyarlı bulundu (Şekil 3.1) (Çizelge 3.1) .



Şekil 3. 1. Bir numaralı *B. melitensis* Rev.1'in Dye test sonucu

Çizelge 3.1. Türkiye'de bulunan aşıların Dye test sonuçları

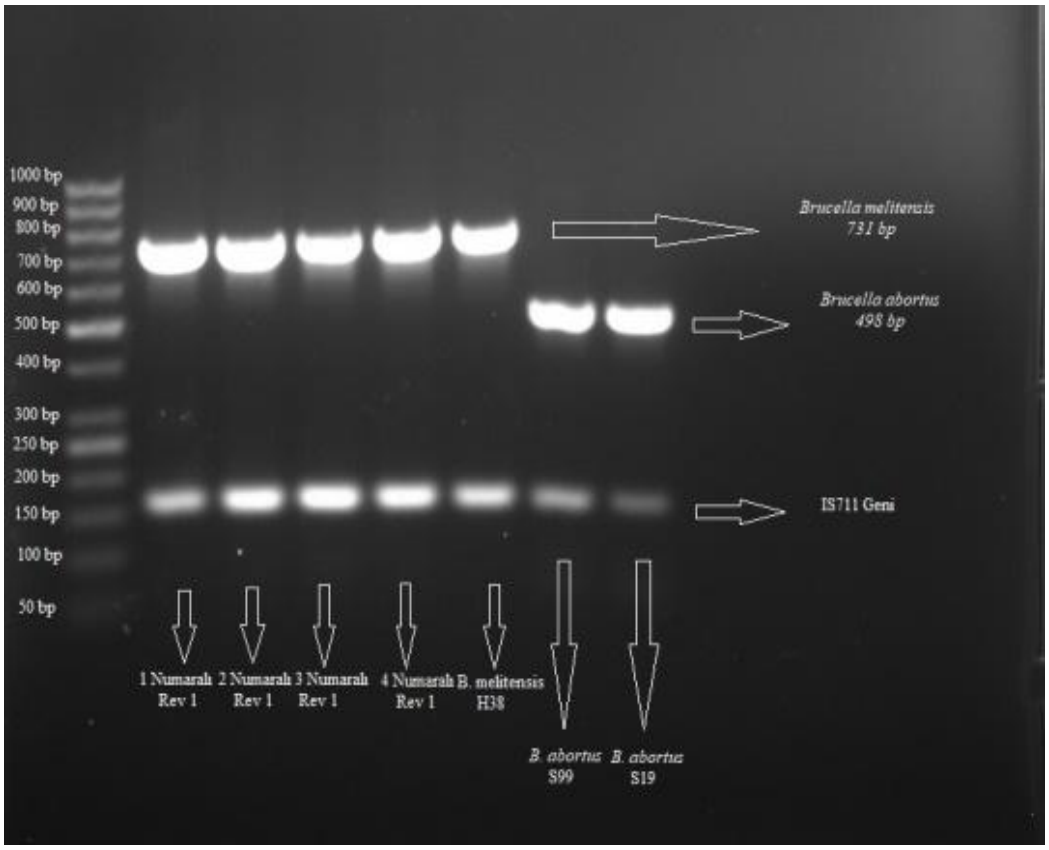
Antibiyotik ve Boya Varlığında Üreme	***B.melitensis* Rev.1**		
	Aşı suşu (1)	**Aşı suşu (2)**	**Aşı suşu (3)**
Tiyonin	+	-	-
Bazik Fuksin	+	-	-
Streptomisin	+	+	+
Penisilin	+	-	-

(+):Dirençli, (-): Duyarlı

3.1.2. Polimeraz zincir reaksiyonu

Aşı suşlarının *B.melitensis* yönünden PZR ile doğrulanması

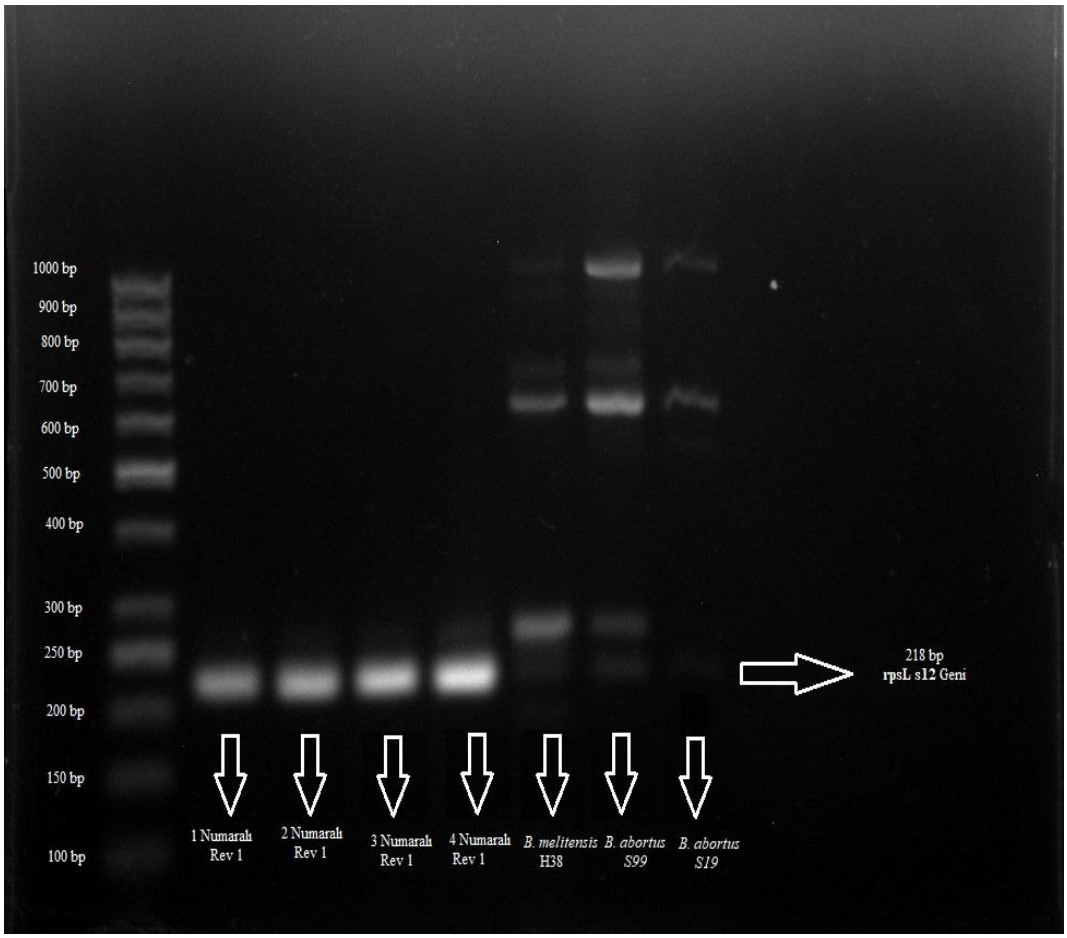
Türkiye'de mevcut kamu (1) ve özel sektör (2) ticari aşı işletmesinden elde edilen aşı suşlarının ön deneme ile çalışmaya uygunluğunun belirlenmesi amacıyla mPZR IS711, Brc-m ve Brc-a primer dizileriyle incelendi ve doğrulandı (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. Türkiye'de mevcut Rev.1 aşılarının *Brucella* spp., *B. melitensis* ve *B. abortus* yönünden primer dizileriyle incelenmesi

B. melitensis ve *B. abortus* yönünden değerlendirilen suşların DNA'ları, Brucella ribozomal s12 gen bölgesi içerisindeki 218 bp'lik bölge *B. melitensis* bv.1 Rev.1'e spesifik olan bölgesi yönünden incelendiğinde yine tüm Rev.1'lerde spesifik band elde edildi. Ancak *B. abortus*'larda spesifik band elde edilemedi.

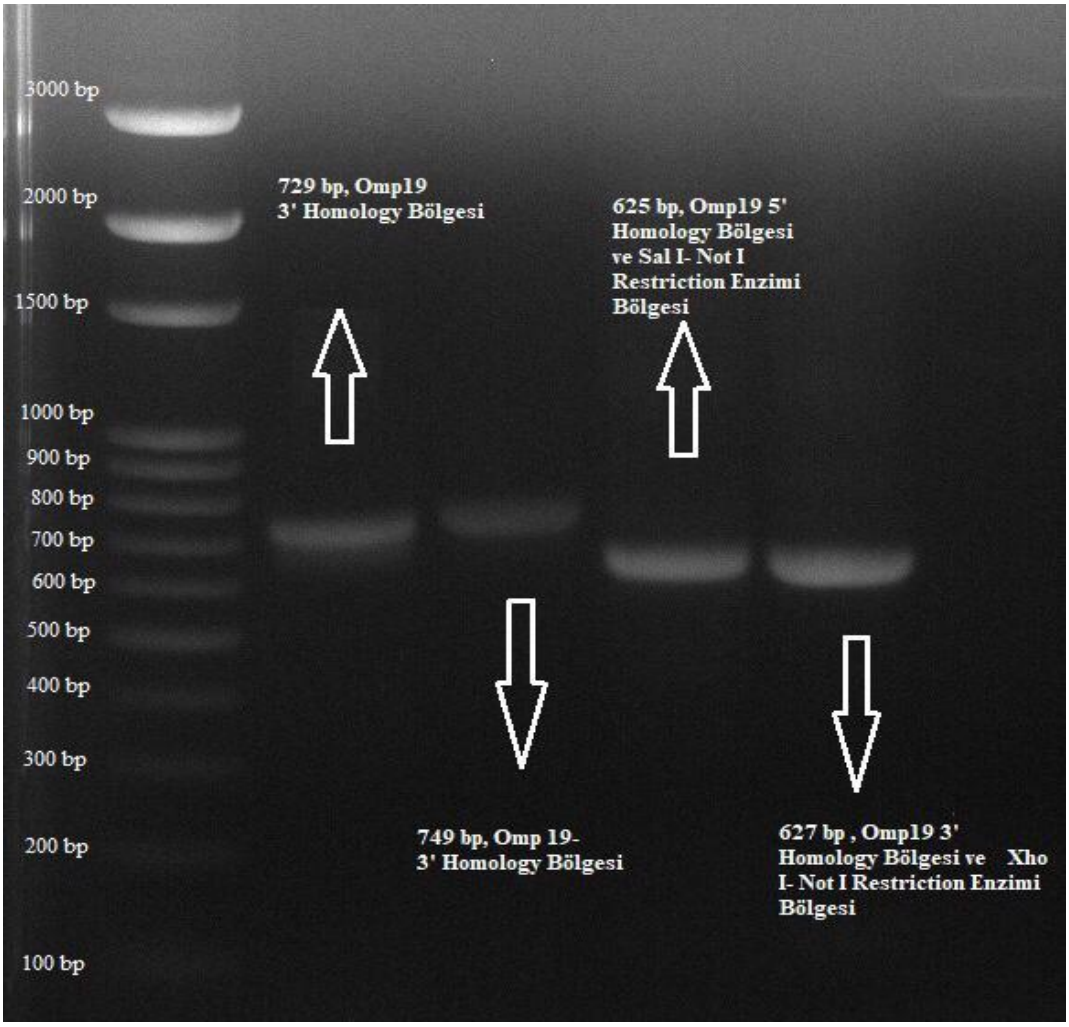
***B.melitensis* bv.1. Rev.1 şuslarının PZR sonuçları**



Şekil 3. 3. Çesitli Brucella türlerinin, Brucella ribozomal S12 gen bölgesi amplifikasyonu yönünden sonuçları

3.2. Omp19 5' ve 3'homoloji bölgelerinin PZR ile amplifikasyonu

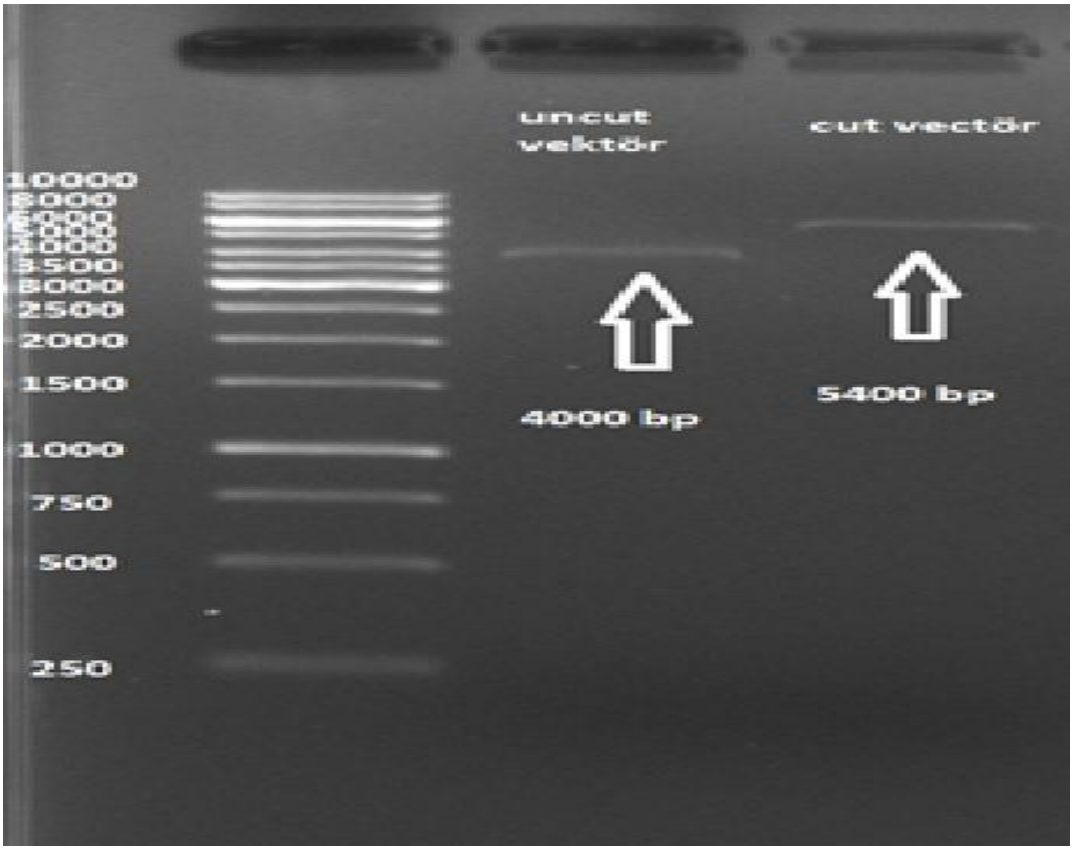
PZR ile doğrulanan *B. melitensis* Rev.1'in DNA'sından Gradient PZR ile uygun amplifikasyon sıcaklığı belirlenip Omp19 ORF 5' homoloji bölgesi 729 bp ve OMP 19 ORF 3' homoloji bölgesi 749 bp isimli iki bölge PZR ile amplifiye edildi ve jelde görüntülendi (Şekil 3.4).



Şekil 3. 4. Yeni kasette dizaynında kullanılan, kesilmemiş daha büyük alanı kaplayan *insert* 5' ve 3' homoloji bölgeleri, restriksiyon enzim bölgeleri içeren homoloji bölgeleri

Elde edilen PZR ürünleri, PZR temizleme kiti ile artık ürünlerden arındırılıp, enzim kesim bölgelerini de içerecek şekilde dizayn edilen primerler (5' HB 625 bp - 3' HB 627 bp) bir ürün sentezleyen 2 çift primer dizisi ile amplifiye edilmesi sonucunda elde görüntülendi (Şekil 3.4).

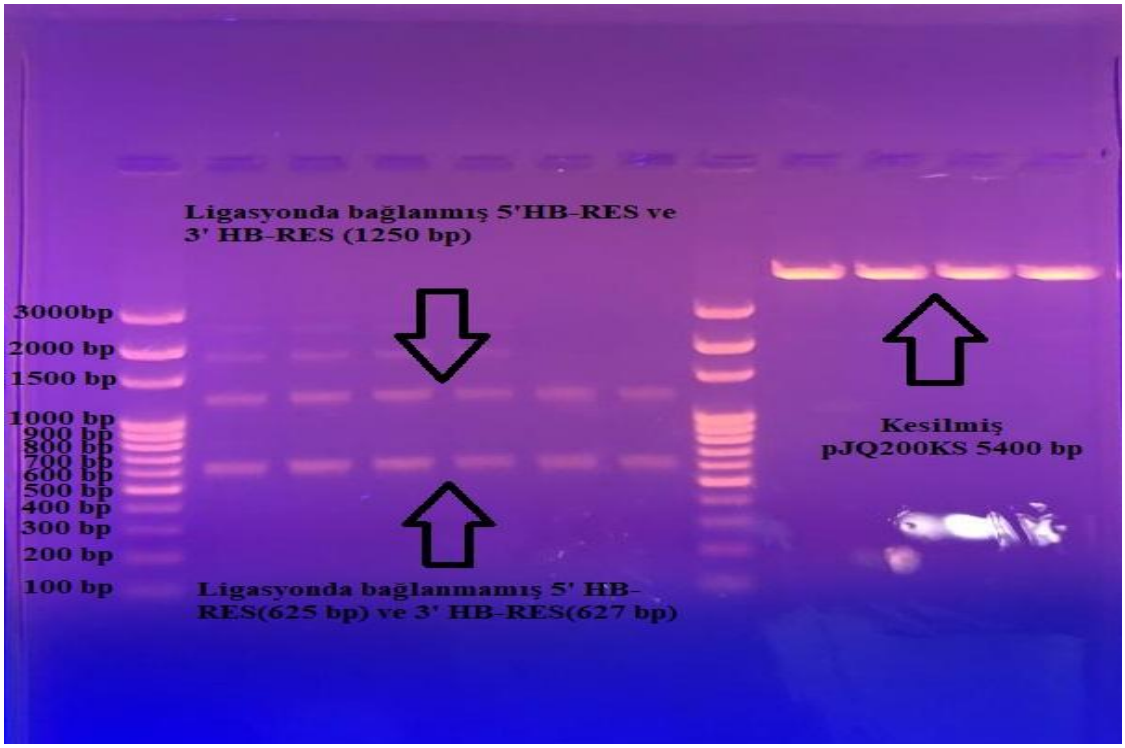
İzole edilen pJQ200KS isimli plazmid Sal I HF ve Xho I enzimleri ile uygun protokolde kesilerek süper yumak ve linear formda band büyüklükleri jelde gösterildi (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5. Kesilmemiş süper yumak tarzında vektör, kesilmiş linear vektör

3.3. Omp 19 5' ve 3'Homoloji bölgelerinin tek bir insert haline getirilmesi

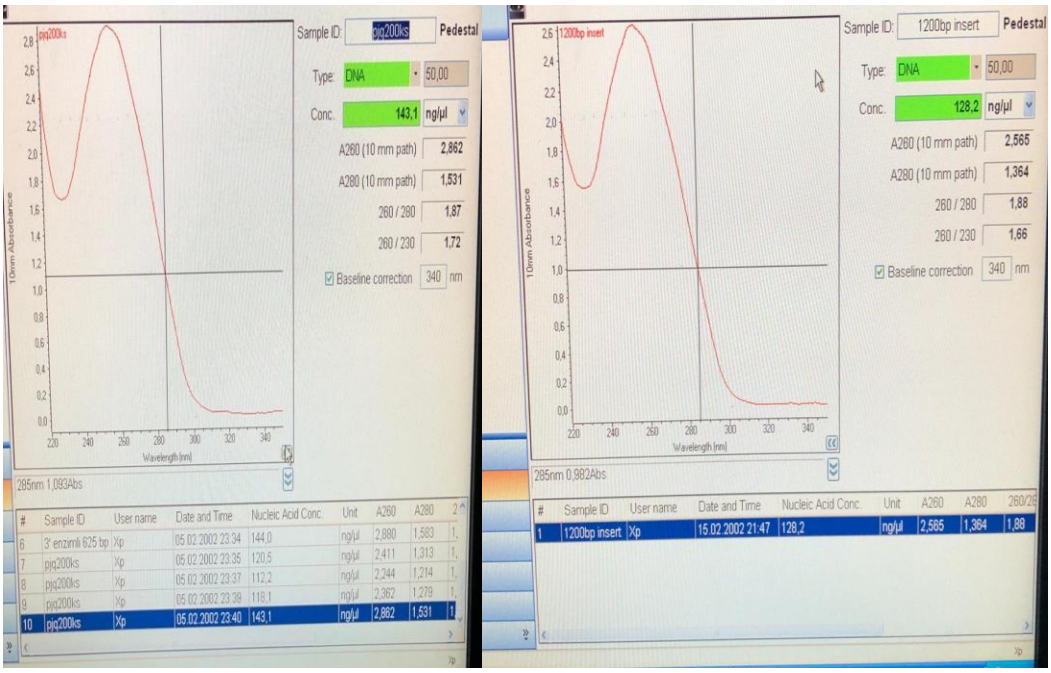
Homoloji bölgelerinin ligasyon ile tek parça haline getirildi (Şekil 3.6).



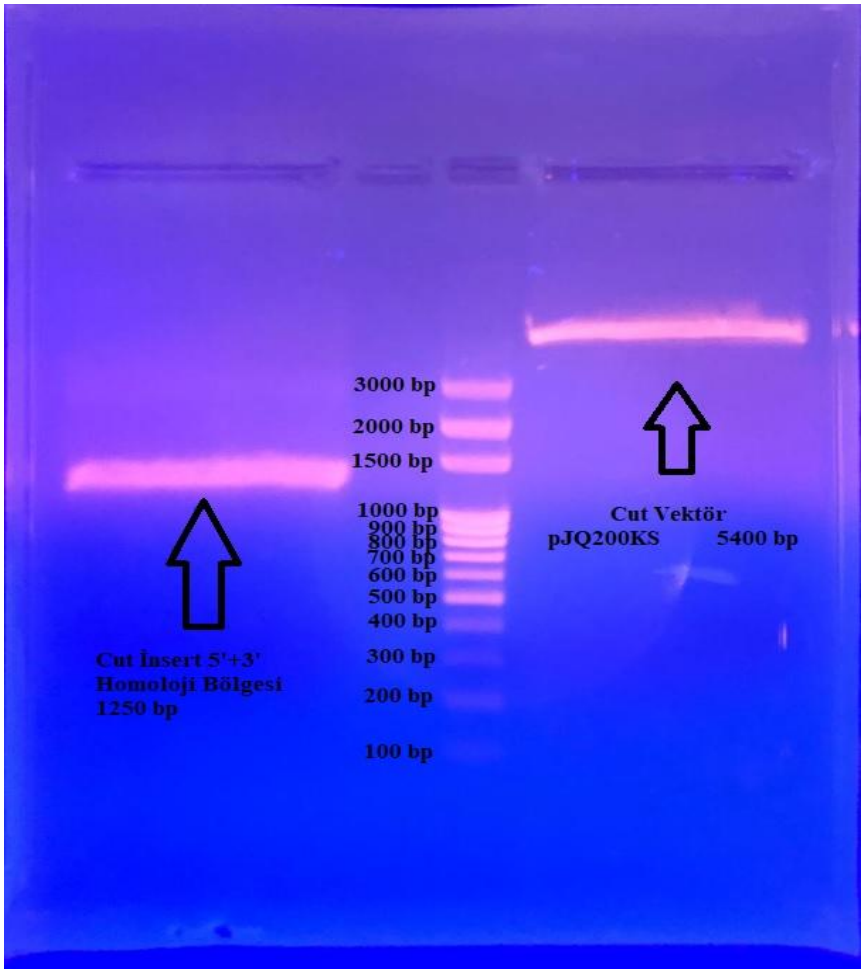
Şekil 3. 6. 5' ve 3' homoloji bölgelerinin arada Omp19 bölgesi olmaksızın ligasyonu

Ligasyonu sağlanarak tek insert haline getirilen 1250 bp bölgelik jelde görüntülendi. Jelden arındırma kiti ile saflaştırıldı. Saflaştırılan 1250 bp insert 5' HB-RES forward primeri ve 3' HB-RES reverse primeri amplifiye edilerek inserte hazır tek bir ürün haline getirildi ve gerektiğinde tekrar geri dönmek için referans olarak stoklandı. Elde edilen 1250 bp'lik yeni insert dizisi ile yapışkan uç elde ederek transformasyon işleminin gerçekleşmesi için insert ve vektörün kesilmesi ve ligasyon basamakları tekrarlandı.

3.4. Vektör ve 5'+3' homoloji bölgesi Sal I- Xho I kesim enzimleri ile muamelesi ve ligasyonu



Şekil 3. 7. İnsert ve plazmid miktarlarının nanodrop ile ölçülmesi

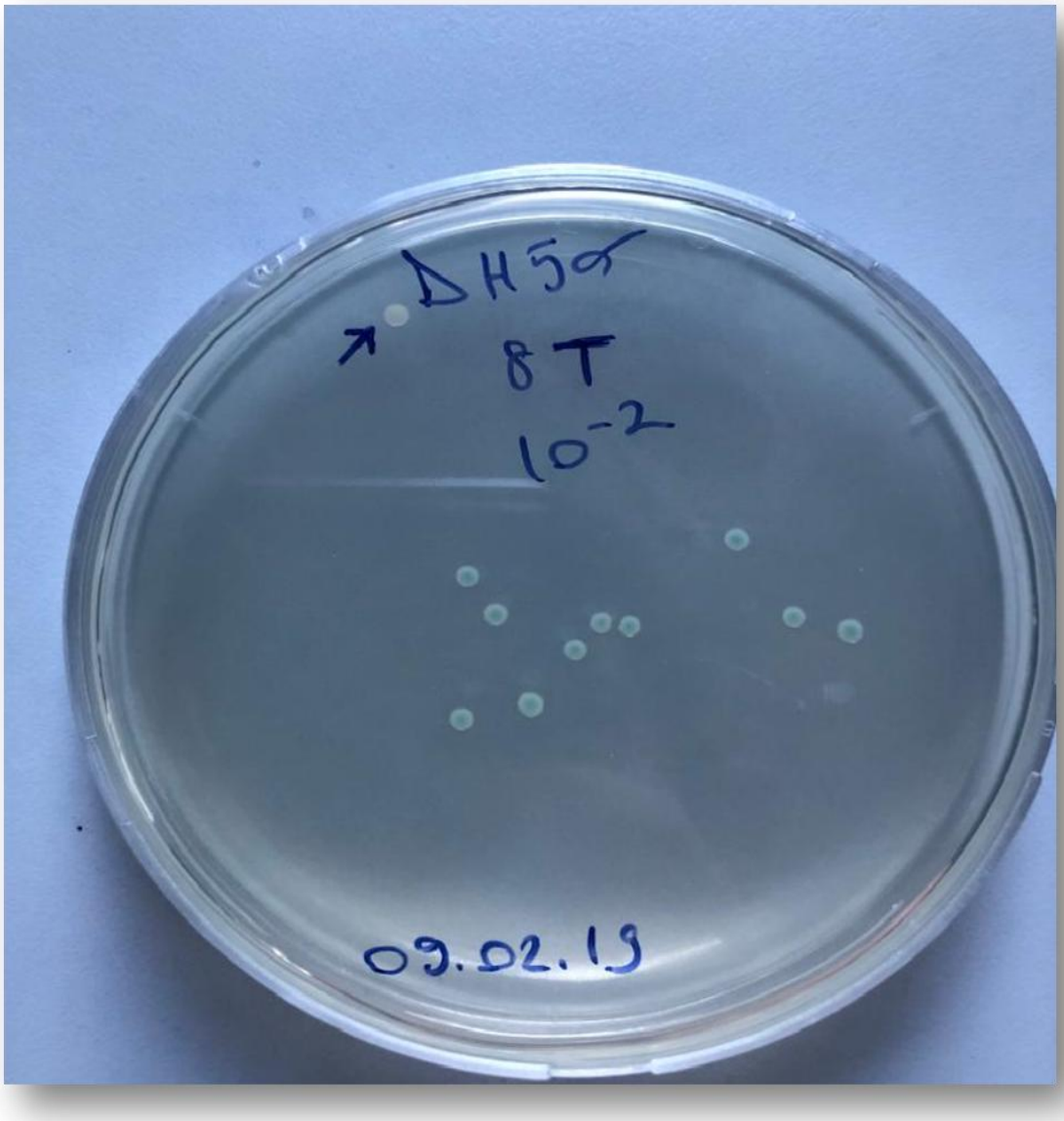


Şekil 3. 8. Kesilmiş insert ve vektörün jelde görüntülenmesi

3.5.Mutant Koloni Doğrulama Sonuçları

3.5.1. Mavi beyaz tarama

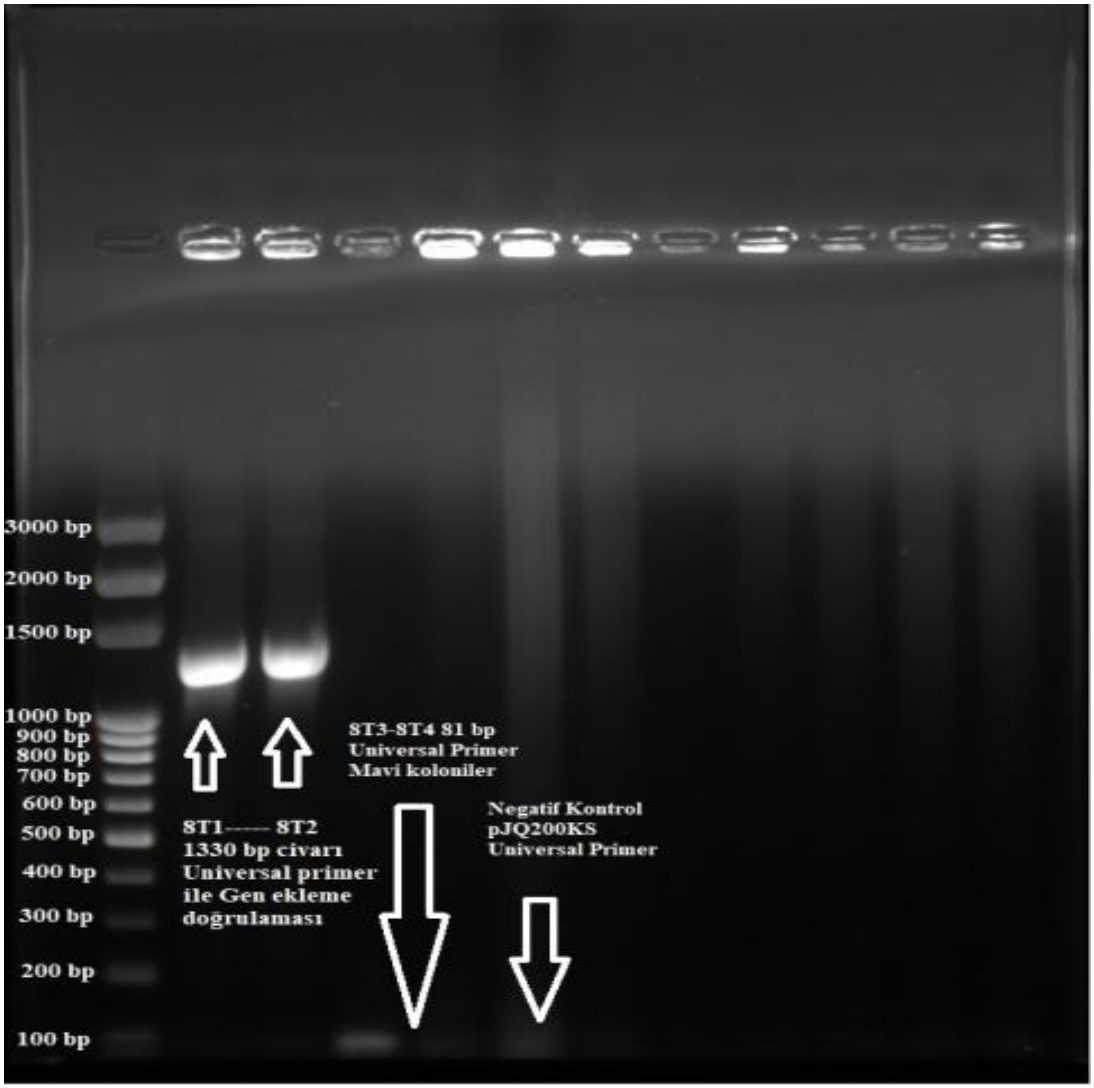
X-gal (20mg/ml) ve IPTG (100mM) ihtiva eden LB agar üzerine bu 2 koloni ekimi yapıldı ve 3 gün sonra mavi beyaz ayrımı gözlendi (Şekil 3.9) **.**



Şekil 3. 9. Transformasyonda Mavi-Beyaz koloni ayrımı ile mutant koloninin belirlenmesi

3.5.2. Mutant kolonilerin PZR ile doğrulanması

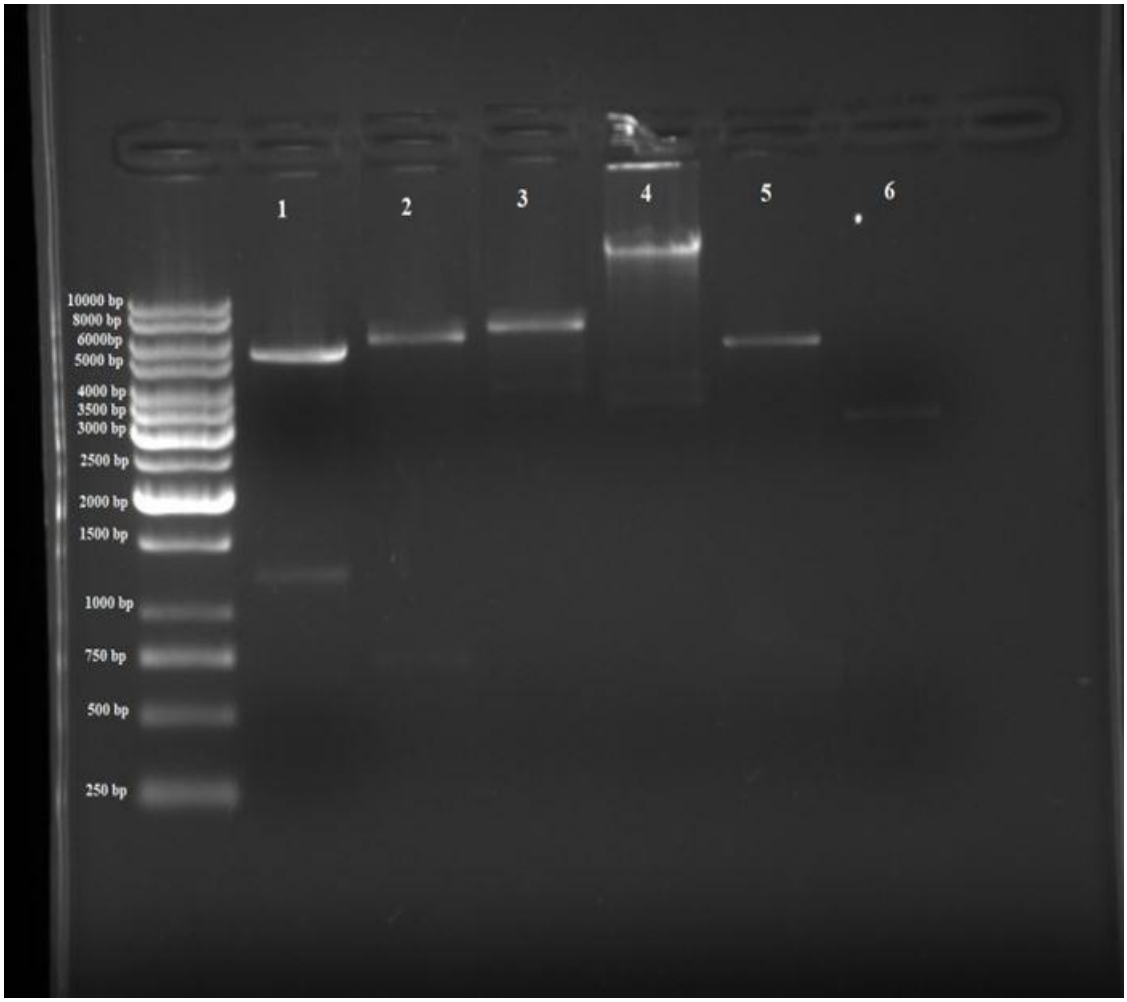
Mavi beyaz ayrımında üreyen 2 koloni seçildi, DNA izolasyonu sonrası universal primerler ile PZR yapıldı ve 2 adet mutant bakterinin mutasyonu doğrulandı (Şekil 3.10).



Şekil 3. 10. 8T1 ve 8T2 isimli mutantların universal primer çifti ile doğrulanması

3.5.3. Vektörün aynı kesim enzimiyle kesilmesi

Mutasyonun doğrulanması için, plazmid izolasyon kiti ile saf mutant vektör 8T2 isimli mutant elde edildi. Nanodrop ile DNA miktarı 15 ng/µl olarak ölçüldü. Kesim işlemi sonucunda hem vektör *backbone* hem de *insert* kısmı görüntüledi (Şekil 3.11).



Şekil 3. 11. Kesim işlemi sonrasında vektör *backbone* ve *insert* kısmının agaroz jelde görüntülenmesi, M-Marker, 1-Sal I Xho I ile kesilmiş cut vektör, 2-tek ezimle kesilmiş mutant Not I, 3-tek ezimle kesilmiş mutant Xho I, 4-uncut mutant 8T2 (süper yumak yapıda 10000 bp büyük), 5-cut pJQ200KS (5400 bp), 6-uncut pJQ200KS (4000 bp süper yumak yapıda)

3.5.4. Sekans analizi

8T2 mutant bakterisi ile doğrulandıktan sonra vektör *backbone* bölgesinden başlayarak *insert* bölgeyi de içerecek şekilde dizayn edilen 1300 bp'lık PZR ürünü MN jel ektraksiyon kiti ile jelden arındırıldı (Şekil 3.12).



Şekil 3. 12. Sekans sonucunun forward ve reverse uyumu ilk ve son okumalardaki hatların gösterilmesi

Sekans sonucu 1250 bp dizilimi mutasyonlarından arındırılığında 1200 bp'lık gen dizilimi elde edildi ve NCBI veri bankasında tarandığında *B.melitensis* ile %99 uyum bulundu (Şekil 3.13), (Şekil 3.14) **.**

BLAST® » blastn suite » RID-MPJ6KFH1015

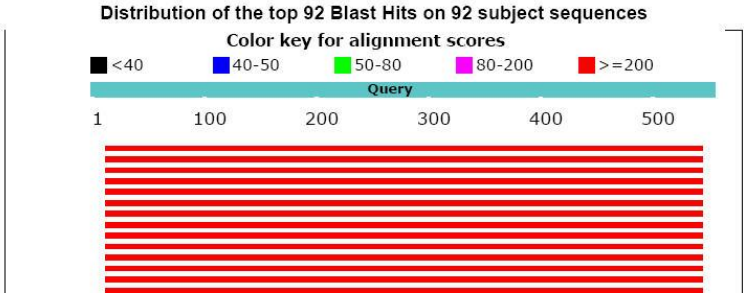
BLAST Results

Questions/comments

Job title: Nucleotide Sequence (540 letters)

RID	MPJ6KFH1015 (Expires on 07-16 21:14 pm)		
Query ID	lcl|Query_233851	**Database Name**	nr
Description	None	**Description**	Nucleotide collection (nt)
Molecule type	nucleic acid	**Program**	BLASTN 2.8.0+
Query Length	540		

Graphic Summary

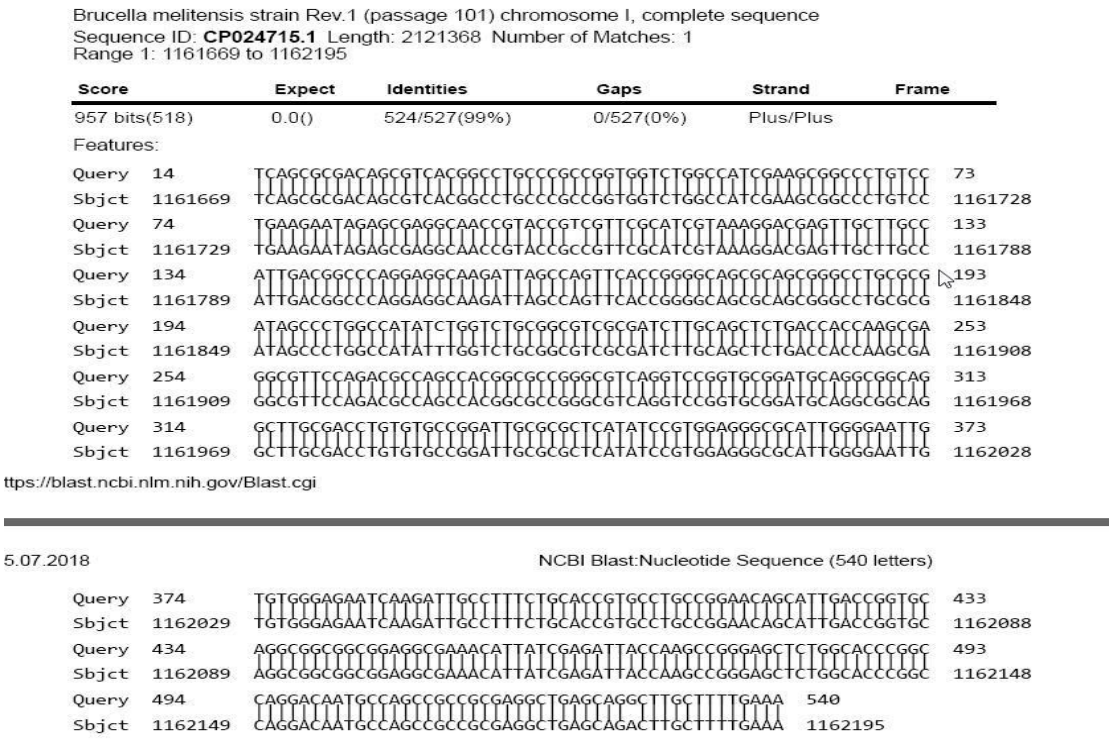


Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Brucella melitensis strain CIIMS-NV-1 chromosome I, complete sequence	957	957	97%	0.0	99%	CP029756.1
Brucella melitensis strain Rev.1 (passage 101) chromosome I, complete sequence	957	957	97%	0.0	99%	CP024715.1
Brucella melitensis strain CIIMS-BH-2 chromosome I, complete sequence	957	957	97%	0.0	99%	CP025680.1
Brucella melitensis strain CIIMS-PH-3 chromosome 1, complete sequence	957	957	97%	0.0	99%	CP026005.1
Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 1	957	957	97%	0.0	99%	LT963350.1
Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 1	957	957	97%	0.0	99%	LT963348.1
Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 1	957	957	97%	0.0	99%	LT962953.1
Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 1	957	957	97%	0.0	99%	LT962951.1
Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 1	957	957	97%	0.0	99%	LT962949.1
Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 1	957	957	97%	0.0	99%	LT962947.1
Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 1	957	957	97%	0.0	99%	LT962945.1
Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 1	957	957	97%	0.0	99%	LT962943.1

Şekil 3. 13. Mutasyonlardan arındırılan sekans sonucunun NCBI veri tabanında tarama sonucu *B. melitensis* ve alt türleri ile olan uyumu



Şekil 3. 14. NCBI veri tabanındaki elde edilen BLAST analinize göre 1200 bp bölge *B. melitensis* Rev.1 DNA'sı ile %99 uyum göstermektedir

Çalışmaların sonucunda 8T2 intihar plazmid içerisine *insert* kısmının düzgün bir şekilde eklendiği doğrulandı.

3.6. Gen Aktarımı

3.6.1. Mutant vektör elde edilmesi

Transfeksiyon için gerekli olan yoğun plazmid içeriği maxiprep kiti ve alkalen lizis ile elde edildi.

Maxiprep kiti sonuçları

Büyük miktarlarda plazmid izolasyonu için kullanılan ticari plazmid izolasyon kiti 100 µl elüsyon hacminde en fazla 322,6 ng/ µl elde edildi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Maxi prep denemelerinden elde edilen vektör DNA'larının miktarları

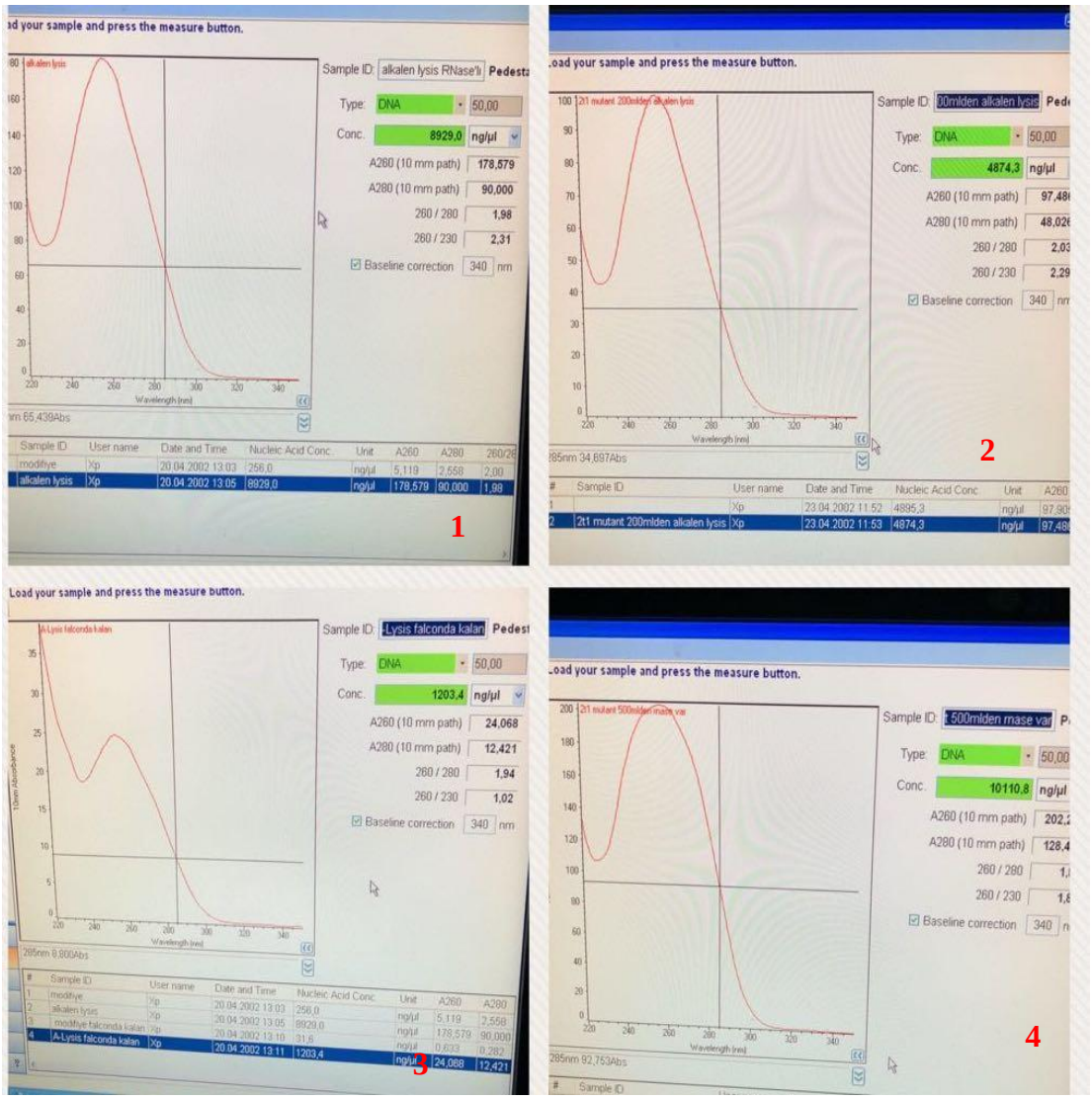
Bakteri kültürü	Elüsyon Miktarı	1. Elüsyon	2. elüsyon	3. elüsyon
1. kit	100 µl	305,8 ng/ µl	220 ng/ µl	150,6 ng/ µl
2. kit	100 µl	129,4 ng/ µl	66,8 ng/ µl	41,6 ng/ µl
3. kit	100 µl	322,6 ng/ µl	210 ng/ µl	138 ng/ µl
4. kit	100 µl	132,2 ng/ µl	54 ng/ µl	43 ng/ µl

Alkalen lizis sonuçları

Yoğun miktarlarda plazmid izolasyonu için tercih edilen alkalen lizis metodunda 1000 ml bakteri kültüründen final 1000 µl elüsyonda en fazla 15795 ng/µl plazmid DNA'sı elde edildi (Çizelge 3.3) (Şekil 3.15).

Çizelge 3.3. Alkalen lizis protokolü sonucunda elde edilen DNA miktarları

Külltür Miktarı	Son elüsyon için MQ miktarı	DNA miktarı ng/µl
200 ml	200 µl	4874 ng/µl
200 ml	100 µl	8929 ng/µl
500 ml	300 µl	10110,8 ng/µl
1000 ml	1000 µl	15795 ng/µl

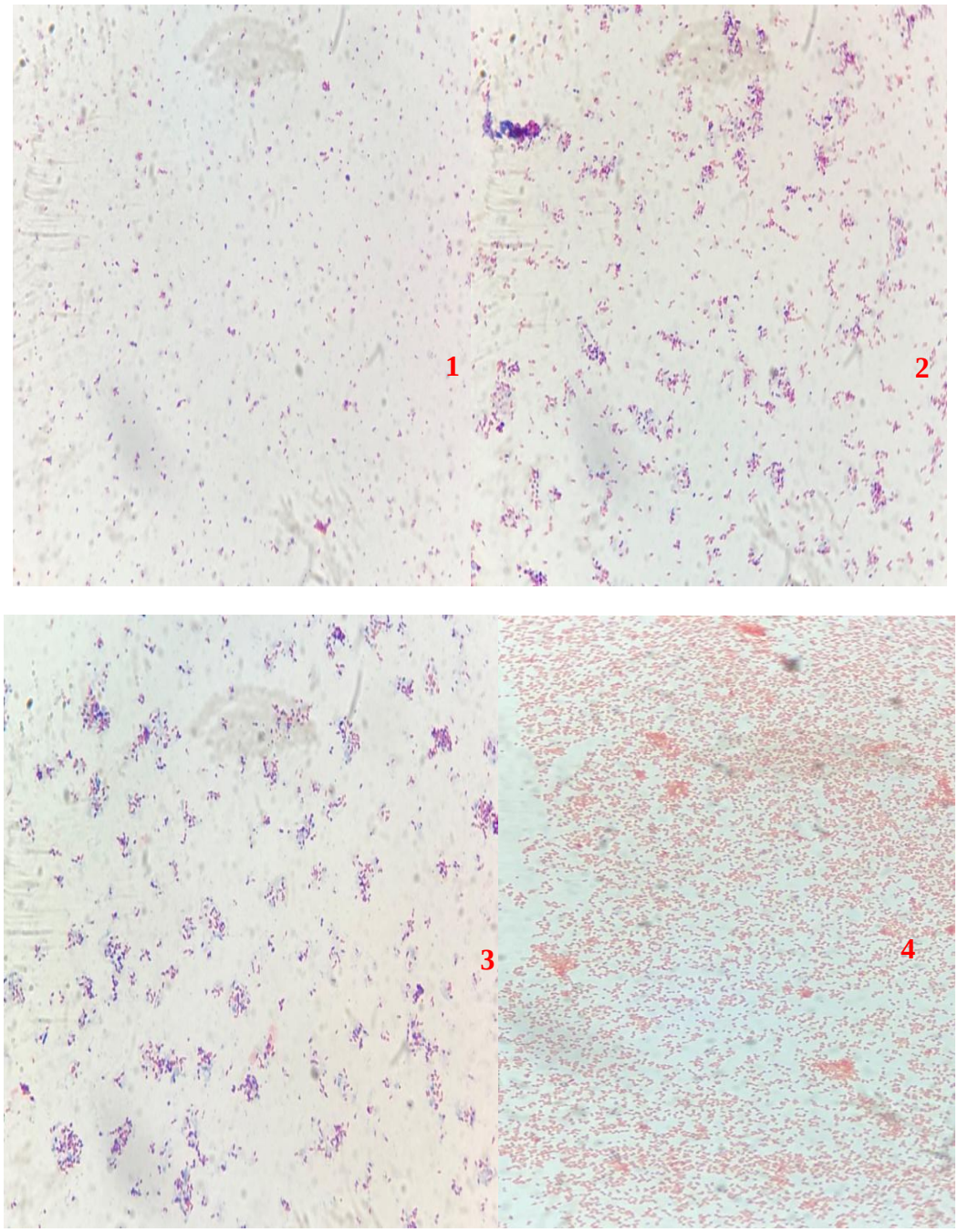


Şekil 3. 15. Alkalen lizis ile kültürlerden elde edilen vektör nanodrop ile ölçülen DNA Miktarları; 1- 200 ml kültürden elde edilen 100 µl ultra saf su ile elüsyondan elde edilen 8929 ng/µl DNA, 2- 200 ml kültürden elde edilen 200 µl ultra saf su ile elüsyondan elde edilen 4874,3 ng/µl, 3- Elüsyon sonrasında falkonda kalan DNA'nın tekrar eldesi ile elde edilen 1203,4 ng/µl DNA, 4- 500 ml kültürden elde edilen 100 µl ultra saf su ile elüsyondan elde edilen en konsatre vektör DNA'sı 15795 ng/µl

3.6.2. Kompetent Brucella hazırlanma sonuçları

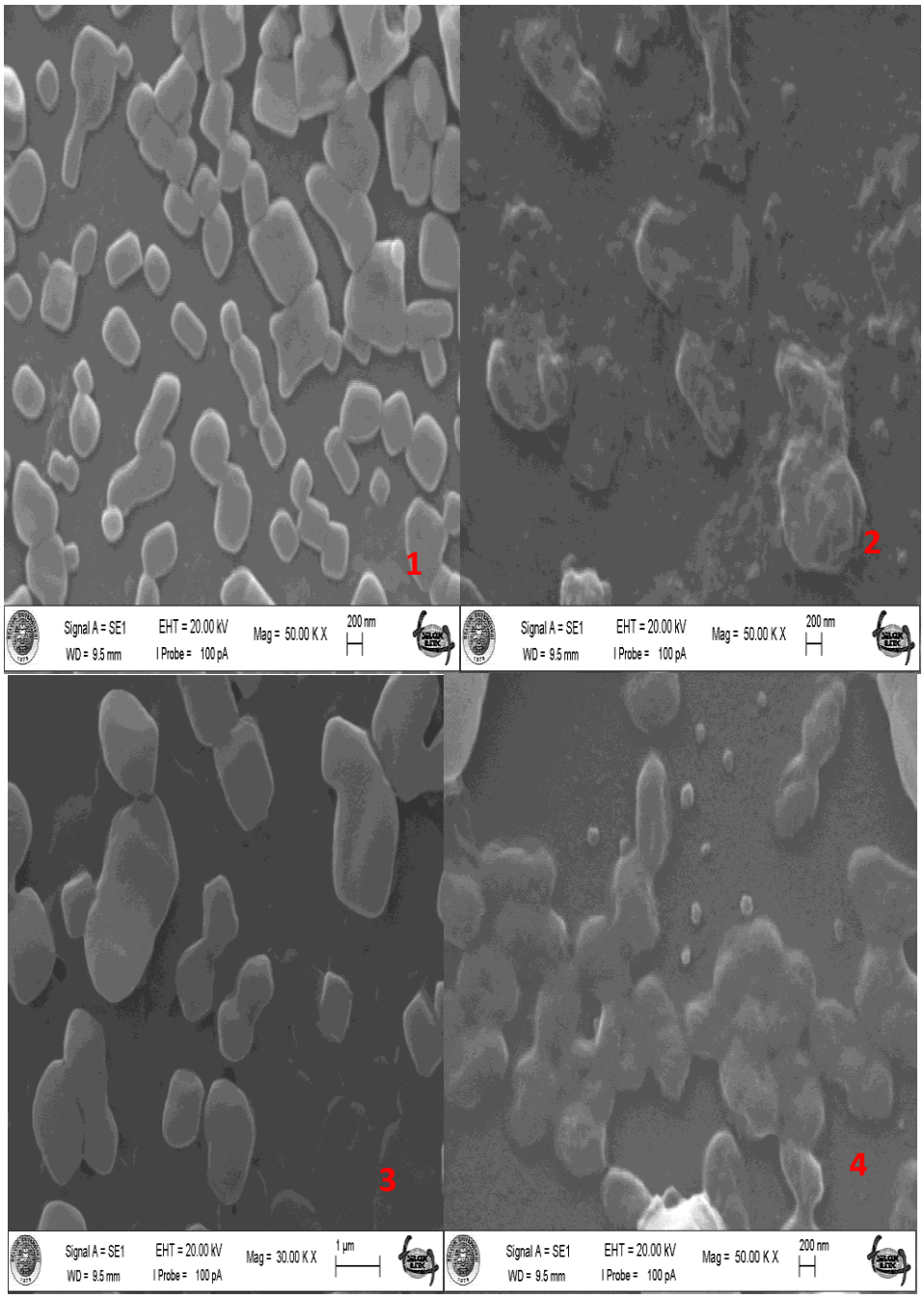
Brucella'nın sferoplast haline dönüştürülmesi

Ampisilin, penisilin ve glisin ile 72 saat uyarılan sferoplast haline getirilen Brucella kültürleri mikroskopta ve elektron mikrosbunda görüntülendi (Şekil 3.17).



Şekil 3. 16. Işık mikroskobi görüntüleri 1-72 saatlik %2'lik glisin sferoplast *B.melitensis* bv.1. Rev.1 kültürü 2- 72 saatlik 5 µg/ml penisilin G sferoplast *B. melitensis* bv.1. Rev.1 kültürü 3-72 saatlik 10 µg/ml ampisilin sferoplast *B. melitensis* bv.1. Rev.1 kültürü 4-96 saatlik *B. melitensis* bv.1. Rev.1 kültürü

Sferoplast Brucella komponentleri hücre zarında meydana gelen değişimler elektron mikroskobunda görüntülendi (Şekil 3.18).



Şekil 3. 17. Elektron mikroskop görüntüleri 1-72 saatlik %2'lik glisin sferoplast *B. melitensis* bv.1 Rev.1 kültürü 2- 72 saatlik 5 µg/ml penisilin G sferoplast *B.melitensis* bv.1 Rev.1 kültürü 3-72 saatlik 10 µg/ml ampisilin sferoplast *B.melitensis* bv.1 Rev.1 kültürü 4-96 saatlik *B. melitensis* bv.1. Rev.1 kültürü

3.6.3. Elektroporasyon sonuçları

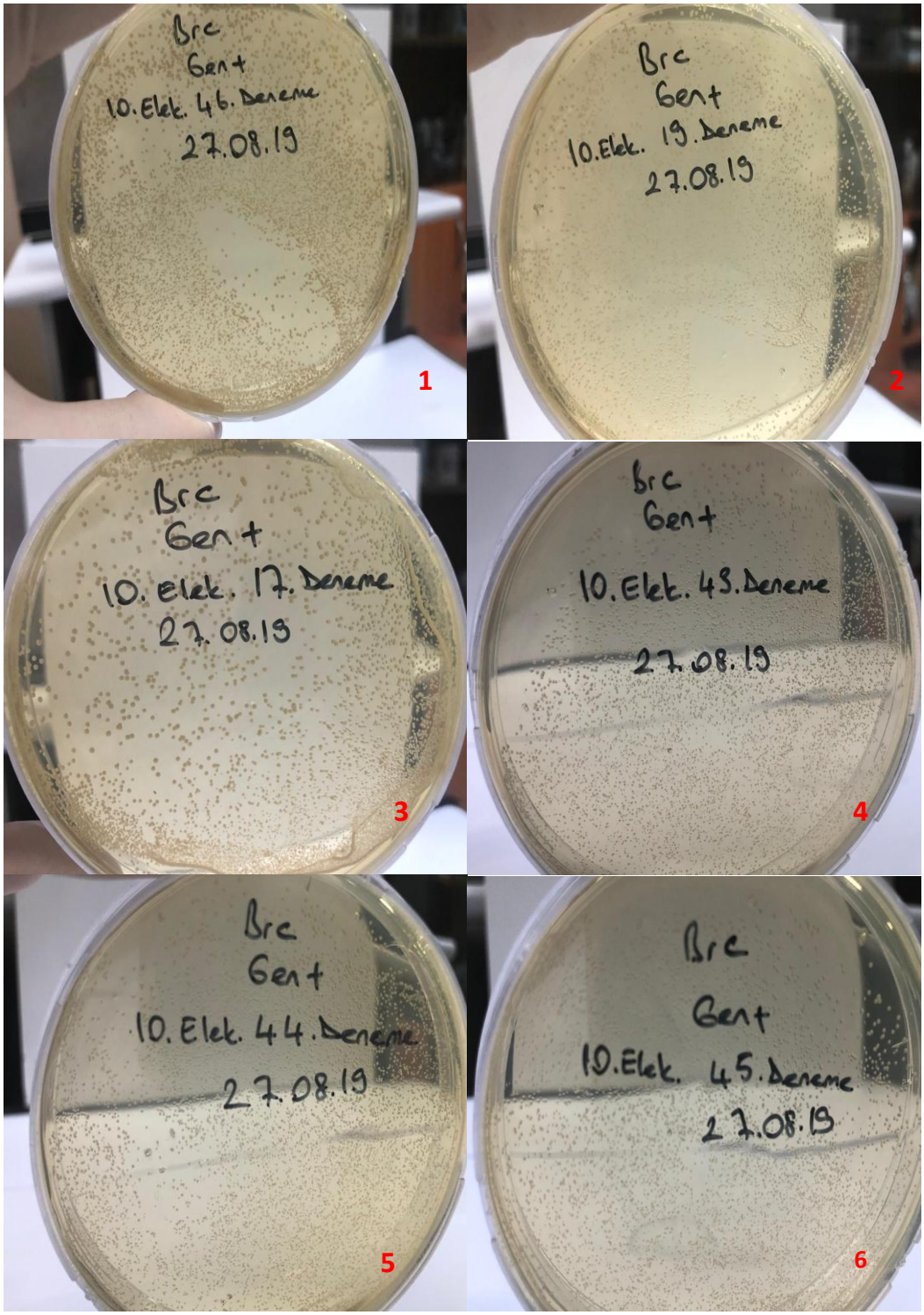
Elektropotör cihazında *"Exponential decay"* modunda 20 msn saniye akım hedeflenen, glisin (%2) ve ampisilin (10µg/ml) ile sferoplast haline komponent *B. melitensis* Rev.1 denemelerinde 17, 19, 43, 44, 45 ve 46 numaralı altı denemede başarılı aktarım sağlandı (Çizelge 3.4) (Şekil 3.19).

Çizelge 3.4. Elektroporasyonda kullanılan kompetent tipi, vektör miktarı ve elde edilen mutant koloni sayıları

Elektroporasyon Deneme Sayısı	Kompetent Özelliği	Küvette Bulunan Plazmid İzolasyon Yöntemi	Küvette Bulunan Kompetent	Küvette Bulunan Vektör Miktar	Uygulanan volt ve süre	Gentamisin Dirençli Koloni Sayısı
1	24 saatlik genç kültür	Alkalen Lysis	200 µl	1µl 5µg / µl	2469 V 18.6 msn	0
2	24 saatlik genç kültür	Alkalen Lysis	200 µl	1µl 10µg / µl	2470 V 19.5 msn	0
3	24 saatlik genç kültür	Maxiprep Kit	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2470 V 19.3 msn	0
4	96 saatlik yaşlı kültür	Alkalen Lysis 5µg	200 µl	1µl 5µg / µl	2469 V 18.6 msn	0
5	96 saatlik yaşlı kültür	Alkalen Lysis 10µg	200 µl	1µl 10µg / µl	2469 V 18.6 msn	0
6	96 saatlik yaşlı kültür	Maxiprep Kit 1 µg	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2470 V 19.3 msn	0
13	sferoplast 5µg/ml Penisilin G 48 saat	Alkalen Lysis 5µg	200 µl	1µl 5µg / µl	2470 V 19.3 msn	0
14	sferoplast 5µg/ml Penisilin G 48 saat	Alkalen Lysis 10µg	200 µl	1µl 10µg / µl	2469 V 17.8 msn	0
15	sferoplast 5µg/ml Penisilin G 48 saat	Maxiprep Kit 1 µg	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2468 V 17.5 msn	0
16	sferoplast %2 Glisin 48 saat	Alkalen Lysis 5µg	200 µl	1µl 5µg / µl	2468 V 17.1 msn	0
17	sferoplast %2 Glisin 48 saat	Alkalen Lysis 10µg	200 µl	1µl 10µg / µl	2470 V 19.3 msn	354
18	sferoplast %2 Glisin 48 saat	Maxiprep Kit 1 µg	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2470 V 19.9 msn	0

Çizelge 3.4. (Devam) Elektroporasyonda kullanılan kompetent tipi, vektör miktarı ve elde edilen mutant koloni sayıları

Elektroporasyon Deneme Sayısı	Kompetent Özelliği	Küvette Bulunan Plazmid İzolasyon Yöntemi	Küvette Bulunan Kompetent	Küvette Bulunan Vektör Miktar	Uygulanan volt ve süre	Gentamisin Dirençli Koloni Sayısı
19	sferoplast 10µg/ml Ampisilin 48 saat	Alkalen Lysis 5µg	200 µl	1µl 5µg / µl	2469 V 18.5 msn	695
20	sferoplast 10µg/ml Ampisilin 48 saat	Alkalen Lysis 10µg	200 µl	1µl 10µg / µl	2469 V 18.5 msn	0
21	sferoplast 10µg/ml Ampisilin 48 saat	Maxiprep Kit 1 µg	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2470 V 19.9 msn	0
40	sferoplast 5µg/ml Penisilin G 72 saat	Alkalen Lysis 5µg	200 µl	1µl 5µg / µl	2468 V 17.2 msn	0
41	sferoplast 5µg/ml Penisilin G 72 saat	Alkalen Lysis 10µg	200 µl	1µl 10µg / µl	2469 V 18.4 msn	0
42	sferoplast 5µg/ml Penisilin G 72 saat	Maxiprep Kit 1 µg	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2470 V 18.7 msn	0
43	sferoplast %2 Glisin 72 saat	Alkalen Lysis 5µg	200 µl	1µl 5µg / µl	2469 V 18.3 msn	1350
44	sferoplast %2 Glisin 72 saat	Alkalen Lysis 10µg	200 µl	1µl 10µg / µl	2469 V 18.3 msn	2154
45	sferoplast %2 Glisin 72 saat	Maxiprep Kit 1 µg	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2470 V 19.1 msn	530
46	sferoplast 10µg/ml Ampisilin 72 saat	Alkalen Lysis 5µg	200 µl	1µl 5µg / µl	2469 V 16.0 msn	958
47	sferoplast 10µg/ml Ampisilin 72 saat	Alkalen Lysis 10µg	200 µl	1µl 10µg / µl	2469 V 18.0 msn	0
48	sferoplast 10µg/ml Ampisilin 72 saat	Maxiprep Kit 1 µg	200 µl	5µl 305.8ng/ µl	2470 V 19.1 msn	0



Şekil 3. 18. Elektroporasyon sonucunda 15µg/ml gentamisin içeren besi yerinde üreyebilen *B.*bv.1 Rev.1 kolonileri; 1-46 numaralı mutant, 2-19 numaralı mutant, 3-17 numaralı mutant, 4- 43 numaralı mutant görüntüleri, 5-44 numaralı mutant, 6-45 numaralı mutant

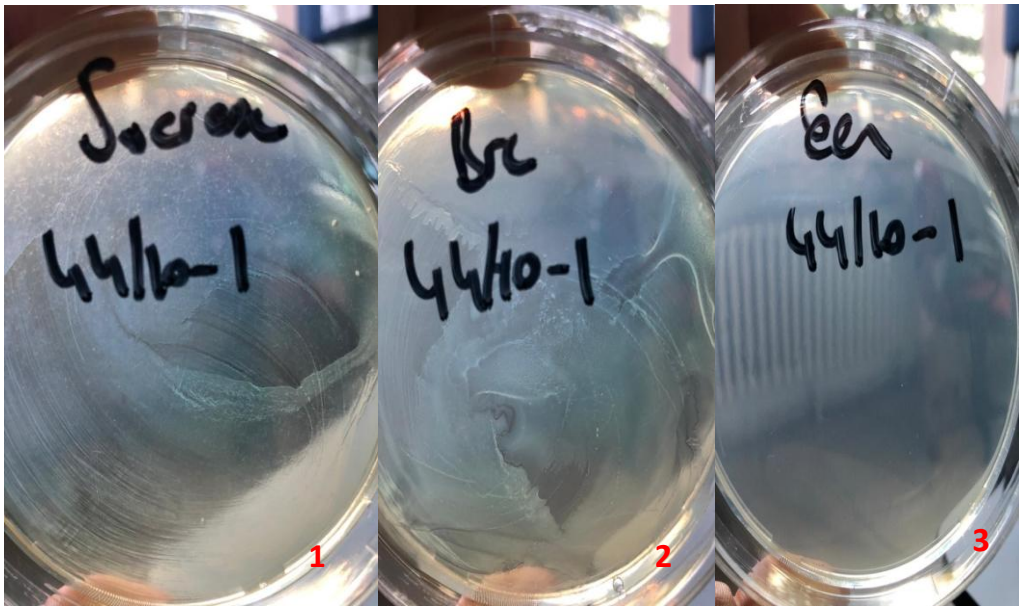
3.7.Allel değişimi

Bu aşamada; ilk kross-over beraberinde antibiyotik direnç ortamında merodiploid yapı oluşumu ile üreme görülen petrilerden rast gele seçilen koloniler, %10 sükroz içeren tuz içermeyen Brucella Agarda sükroz direncine maruz bırakıldı. İntihar plazmidin bu yoğun ortamda ikinci kross over'ı şekillendirerek ortamdan varlığını kaybetmesive seçilen Omp19 gen bölgesi ile yer değiştirerek sükroz direnci sağlarken gen bölgesini silindi.

Antibiyotik direnç ortamında bulunan şüpheli kolonilerden 10'ar adet koloni steril tek koloni halinde tuzsuz, sükrozsuz Brucella buyyonda 1 gece inkübe edildi. Mutasyonu tespit eden 5'HB Forward ve 3' HB Reverse primerleri ile çoğaltıp jelde görüntülenerek saha tipi ve delesyonlu mutant ayrımı yapıldı.

3.7.1. B.melitensis Rev.1 ΔOmp19 gen delesyonunun doğrulanması

Allel değişiminin meydana geldiği mutant suşlar artık gentamisinli Brucella agarda üremedi (Şekil 3.20)(Çizelge 3.5).



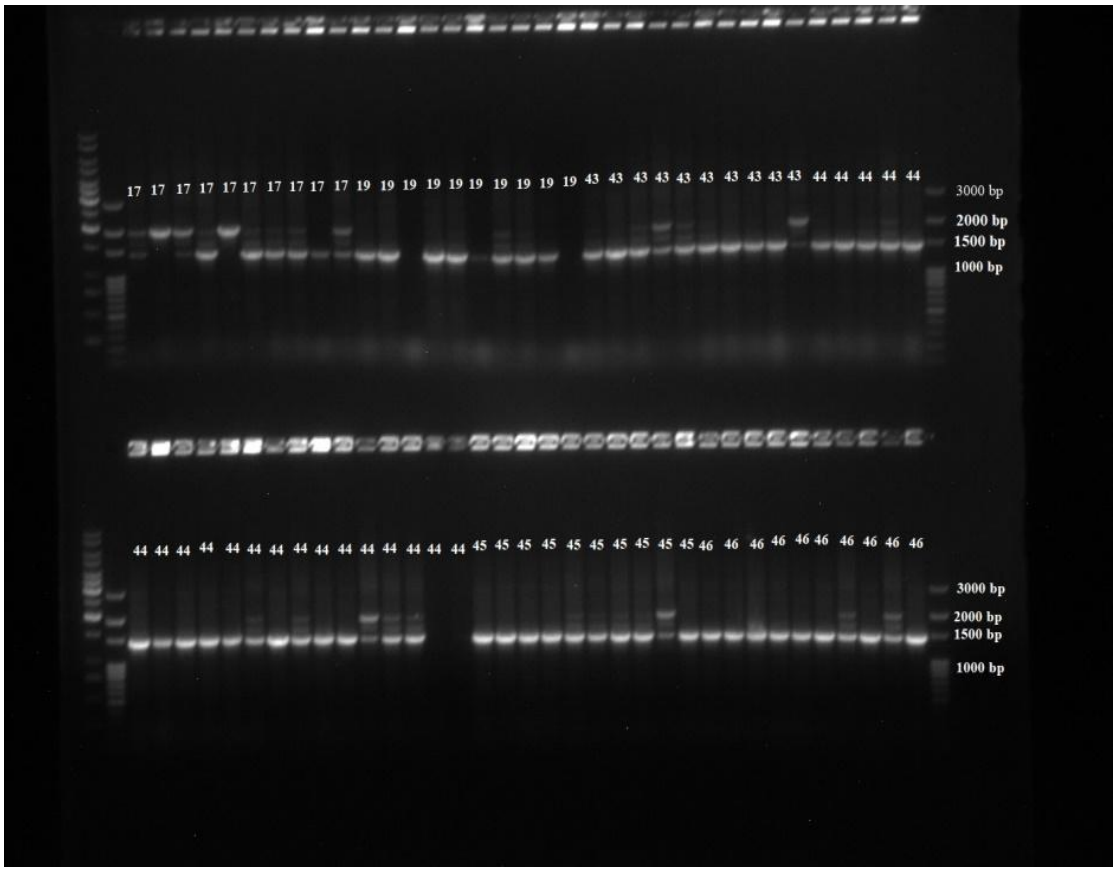
Şekil 3. 19. Allel değişiminin meydana geldiği ve gen intiharı sonucu antibiyotik direnç genini kaybeden 44-10 numaralı mutant

Çizelge 3.5. Gen delesyonu PZR'da doğrulanan mutantların besiyerinde allel değişim sonuçları

Delesyon pozitif seçilen koloni numaraları	Brucella agar	%10 Sükroz	Gentamisin
17/2-1	+	+	-
17/2-2	+	+	-
17/2-3	+	+	-
17/6-1	+	+	-
17/6-2	+	+	-
17/6-3	+	+	-
19/1-1	+	+	-
19/1-2	+	+	-
19/1-3	+	+	-
19/2-1	+	+	-
19/2-2	+	+	-
19/2-3	+	+	-
43/2-1	+	+	-
43/2-2	+	+	-
43/2-3	+	+	-
43/10-1	+	+	-
43/10-2	+	+	-
43/10-3	+	+	-
44/10-1	+	+	-
44/10-2	+	+	-
44/10-3	+	+	-
44/12-1	+	+	-
44/12-2	+	+	-
44/12-3	+	+	-
45/1-1	+	+	-
45/1-2	+	+	-
45/1-3	+	+	-
45/6-1	+	+	-
45/6-2	+	+	-
45/6-3	+	+	-
46/4-1	+	+	-
46/4-2	+	+	-
46/4-3	+	+	-
46/5-1	+	+	-
46/5-2	+	+	-
46/5-3	+	+	-

3.7.2. PZR ile gen delesyonunun doğrulanması

Allel değişiminin sükrozlu besi yerinde üreme sonrası doğrulandığı mutant suşlar PZR ile mutant (1470 bp) ve saha (1900 bp) olarak ayrıldı (Şekil 3.21).



Şekil 3. 20. 6 mutant içerisinde Allel değişimi sonrası 10'ar adet koloniden tek krossover'un şekillendiğini gösteren delesyonlu kolonilerin PZR ile belirlenmesi (1470 bp band delesyon, 1900 bp band saha tipi bakteriyi göstermektedir)

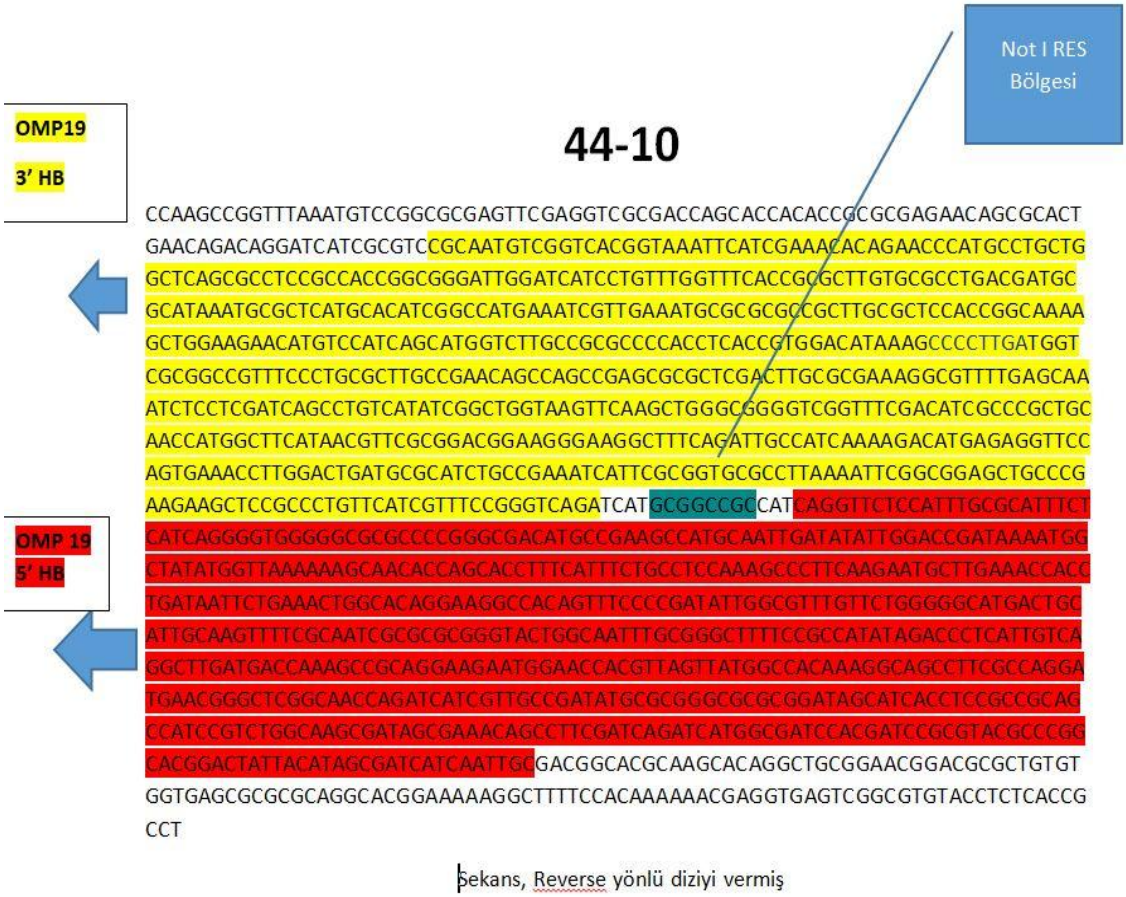
3.7.3. Delesyonun dizi analizi ile doğrulanması

Delesyon mutantları dizi analizi

Allel değişim ve PZR sonuçlarında delesyon olarak tespit edilen 1470 bp bandları dizi analizleri "*codoncode aligner"* programında ileri ve geri yönlü primer çifti okumaları baz kaliteleri yönünden değerlendirildi (Şekil 3.22). FASTA olarak elde edilen baz dizilimlerinde Omp19 ORF olmadığı ve yerine Not I kesim enzimi baz dizisinin bulundu tespit edildi (Şekil 3.23).



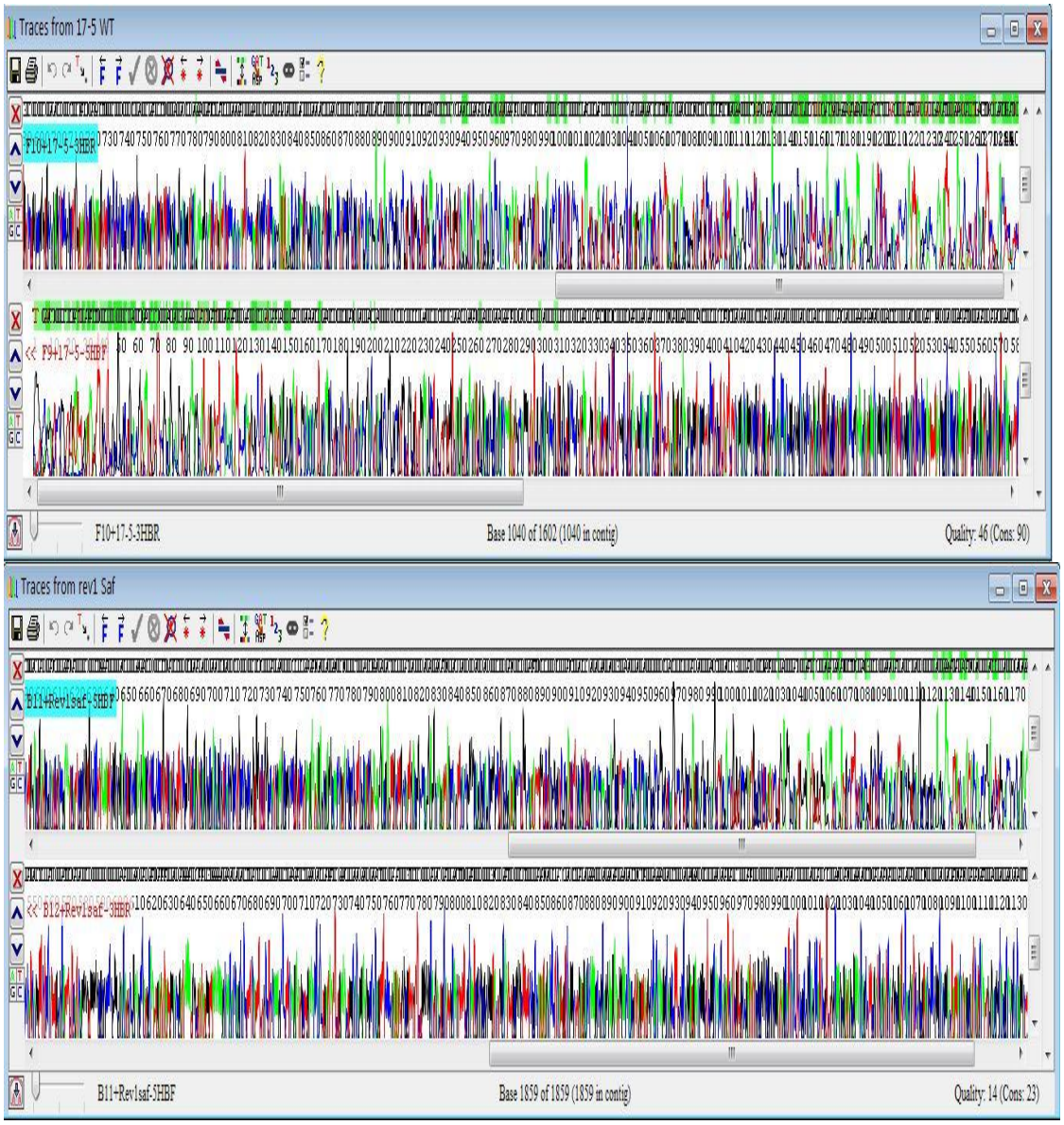
Şekil 3. 21. "*Codoncode aligner*" programı 44-12 ve 19-1 numaralı mutantların dizi analizi sonuçları



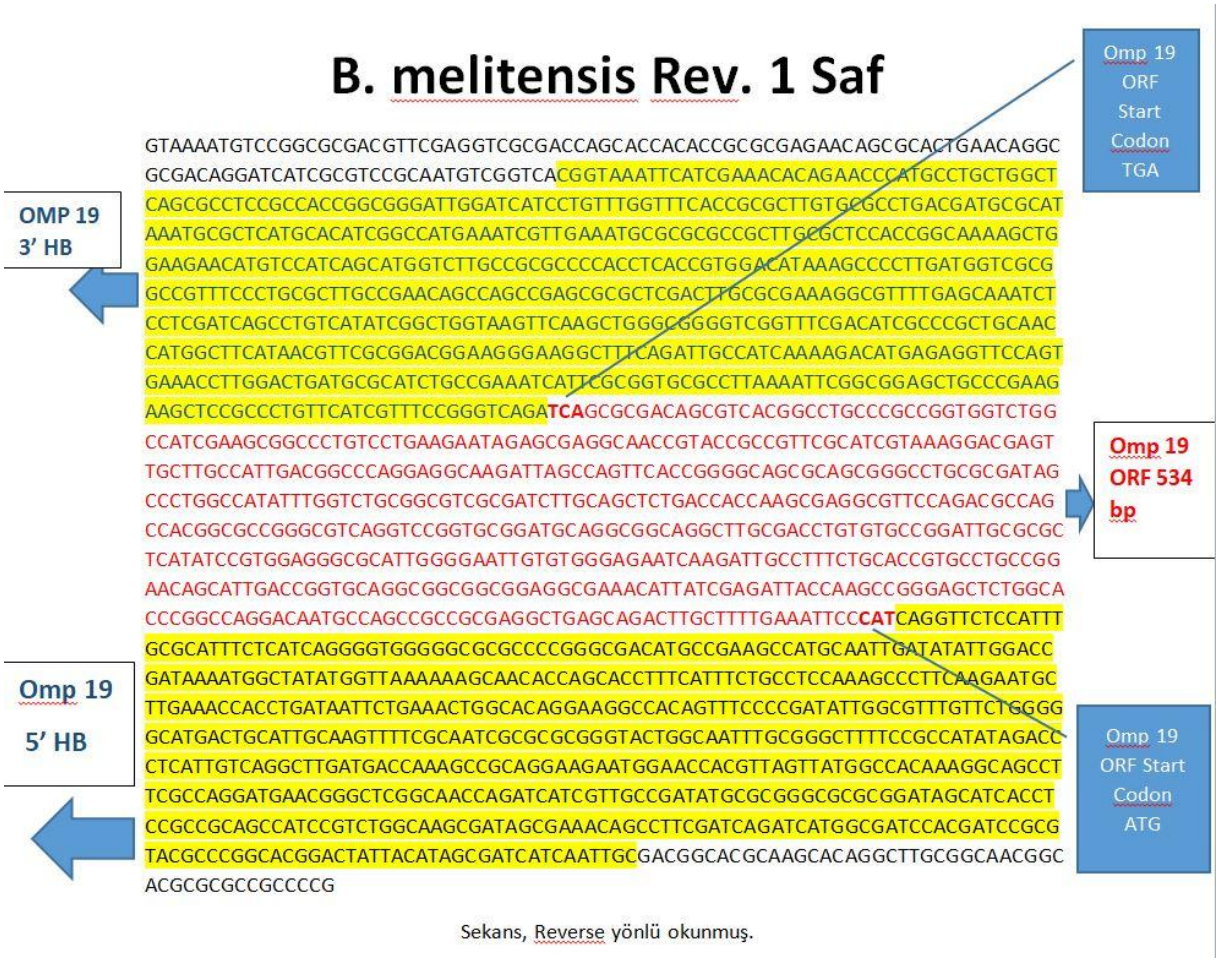
Şekil 3. 22. 44-10 numaralı mutant dizi analizi baz dizilimleri

Delesyonun şekillenmediği mutantları dizi analizi

Allel değişim sonucunda, PZR ile 1900 bp'lik band gösteren saha tipi alleller ile pozitif kontrol *B. melitensis* Rev.1'in dizi analizleri "*codoncode aligner"* programında ileri ve geri yönlü primer çifti okumaları baz kaliteleri yönünden değerlendirildi (Şekil 3.24). FASTA olarak elde edilen baz dizilimlerinde Omp19 ORF'mına sahip olduğu tespit edildi (Şekil 3.25).



Şekil 3. 23. 17-5 numaralı ve *B. melitensis* Rev.1 saha tipi bakterilerin dizi analizi sonuçları



Şekil 3. 24. *B. melitensis* Rev.1 dizi analizi baz dizilimleri

3.8. Hayvan Deneyleri Sonuçları

3.8.1. Seropotens sonuçları

SAT sonuçları

Tüm seropotens gruplarından alınan serum örneklerinin SAT sonuçları karşılaştırıldı.

Çizelge 3.6. Gruplara göre SAT sonuçları

Grup Adı	SAT Sonuçları
Doğal Enfeksiyon Periton İçi	9,83
Negatif Kontrol	0
Ticari 1	6
Ticari 2	4,33
Ticari 3	2,66
İnaktif H38	0
Omp19	0
Mutant 17	0
Mutant 19	3
Mutant 43	0
Mutant 44-10	2,66
Mutant 44-12	0
Mutant 45	0
Mutant 46	0
Doğal Enfeksiyon Deri Altı	3,5
Doğal Enfeksiyon Deri Altı 10^{12}	4,5

*Sonuçlar; 1/2=1, 1/4=2, 1/6=3, 1/8=4, 1/10=5, 1/20=6, 1/40=7, 1/80=8, 1/160=9, 1/320=10, 1/640=11, 1/1280=12 şekilde kategorize edildi ve aritmetik ortalamaları eklendi. Yöntemin kategorize edilmesinde bölüm önceki çalışmaları temel alındı (Erganiş ve ark 2002).

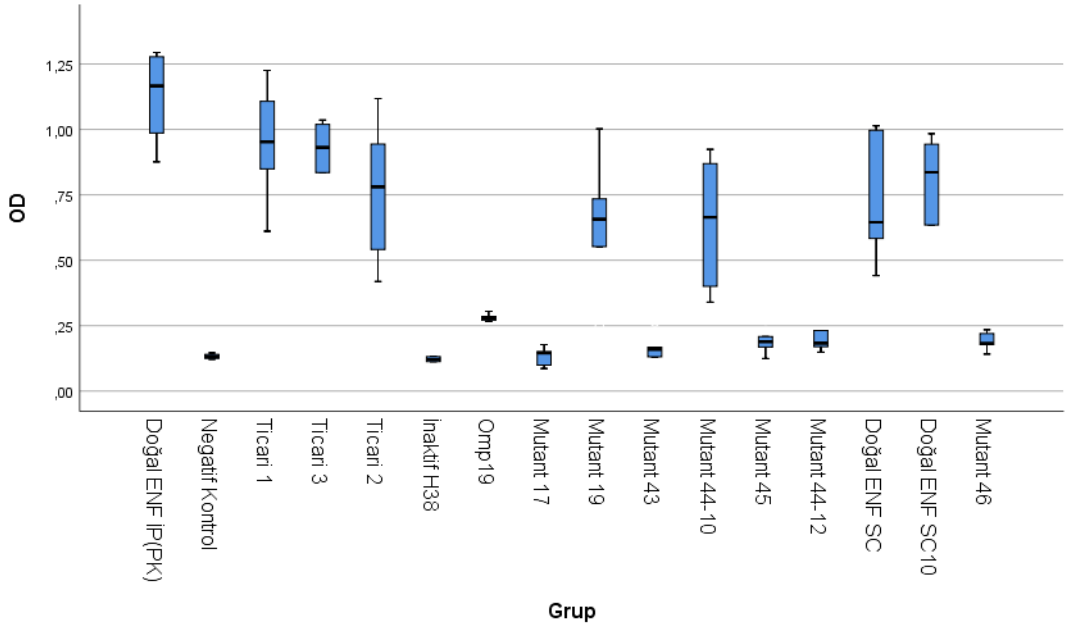
ELISA sonuçları

Tüm hücre ile yapılan ELISA sonuçlarına göre, rekombinant Omp19 proteinin antikor oluşturma gücü doğal enfeksiyonlarda ve ticari aşılarda oluşan antikor titrelerinin çok altında kalmış olsa da inaktif H38 tüm hücre proteinlerine karşı hazırlanan cut off değerine göre aşıdan daha etkin antikor yanıt oluşturduğu tespit edildi. Tüm hücre ve saf Omp19 proteini ile hazırlanan ELISA sonuçlarına göre 10 µg Omp19 proteininin uyardığı antikor etkisi canlı aşılar kadar yüksek olmasa da inaktif aşıdan yüksek olduğu belirlendi (Şekil 3.26). Tüm hücre ve Omp19 proteini ile yapılan ELISA testi OD değerleri kıyasladı .Özellikle mutant 19 ve 44-10 tüm hücre ELISA testinde OD değeri ile referans Rev.1 arasında anlamlı fark bulunmadı. Aynı mutantların Omp19 proteini ile yapılan ELISA testinde OD değeri ile negatif kontrol arasında anlamlı fark bulunmadı (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. ELISA'da elde edilen ortalama OD değerleri ve standart sapmaları

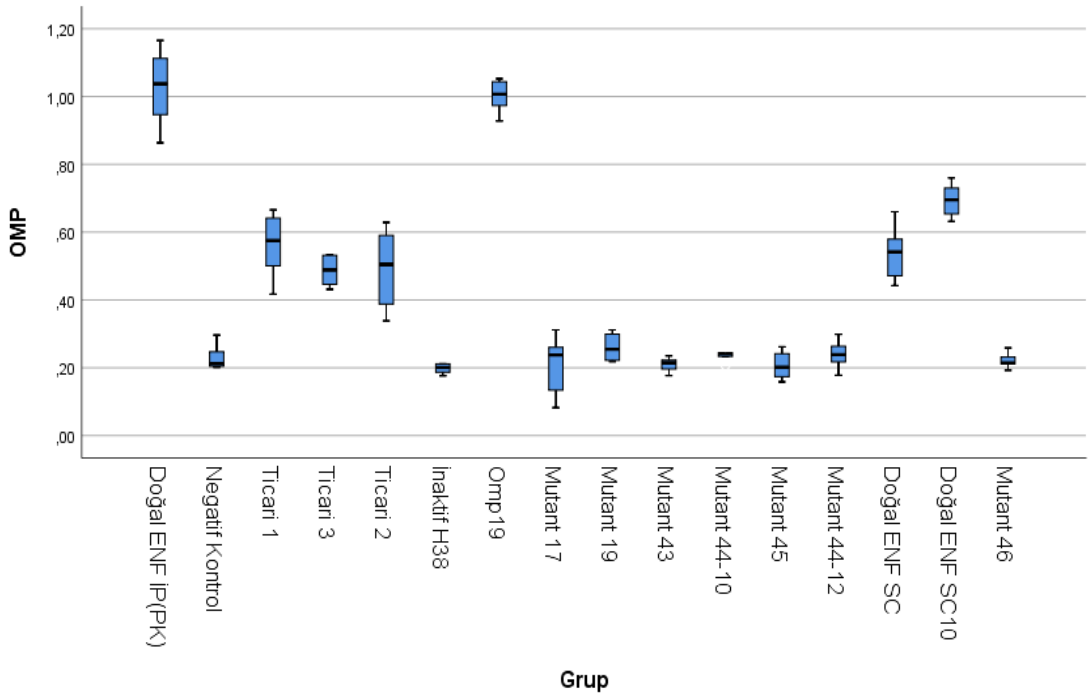
Gruplar	OD Ortalama ∓ Standart Sapma (Min-Mak)	OMP Ortalama ∓ Standart Sapma (Min-Mak)
Doğal Enfeksiyon (PK)	1,127∓0,167 (0,88-1,29)	1,027∓0,116 (0,86-1,17)
Negatif Kontrol	0,132∓0,008 [a]	0,228∓0,03[a]
Ticari 1	0,949∓0,212[abe]	0,562∓0,093 [ab]
Ticari 3	0,80∓0,356[abe]	0,486∓0,042 [ab]
Ticari 2	0,763∓0,255 [abe]	0,492∓0,112 [ab]
İnaktif H38	0,147∓0,067 [acde]	0,217∓0,055 [ac]
Omp19	0,281∓0,013 [acde]	1,001∓0,046[bc]
Mutant 17	0,134∓0,034 [a]	0,210∓0,046 [acf]
Mutant 19	0,641∓0,248 [ae]	0,260∓0,038 [acf]
Mutant 43	0,168∓0,049 [a]	0,210∓0,020 [acf]
Mutant 44-10	0,643∓0,238 [ae]	0,238∓0,017 [acf]
Mutant 44-12	0,207∓0,064 [a]	0,239∓0,041 [acf]
Mutant 45	0,191∓0,048 [a]	0,206∓0,039 [acf]
Mutant 46	0,189∓0,033 [a]	0,220∓0,022 [acf]
Doğal Enfeksiyon SC	0,720∓0,233 [a]	0,539∓0,079 [abdf]
Doğal Enfeksiyon SC 10^{12}	0,811∓0,156 [a]	0,694∓0,050 [abcdf]
P	0,001	0,001

a: Doğal Enfeksiyon (PK)'dan farklı
b:Negatif Kontrolden farklı
c: Ticari 1-2-3' den farklı
d: Antikor yanıtı oluşturan Mutant 19-(44-10)'dan farklı
e: Antikor yanıtı oluşturmayan Mutant 17-43-(44-12)-45-46
f: OMP 19'dan farklı



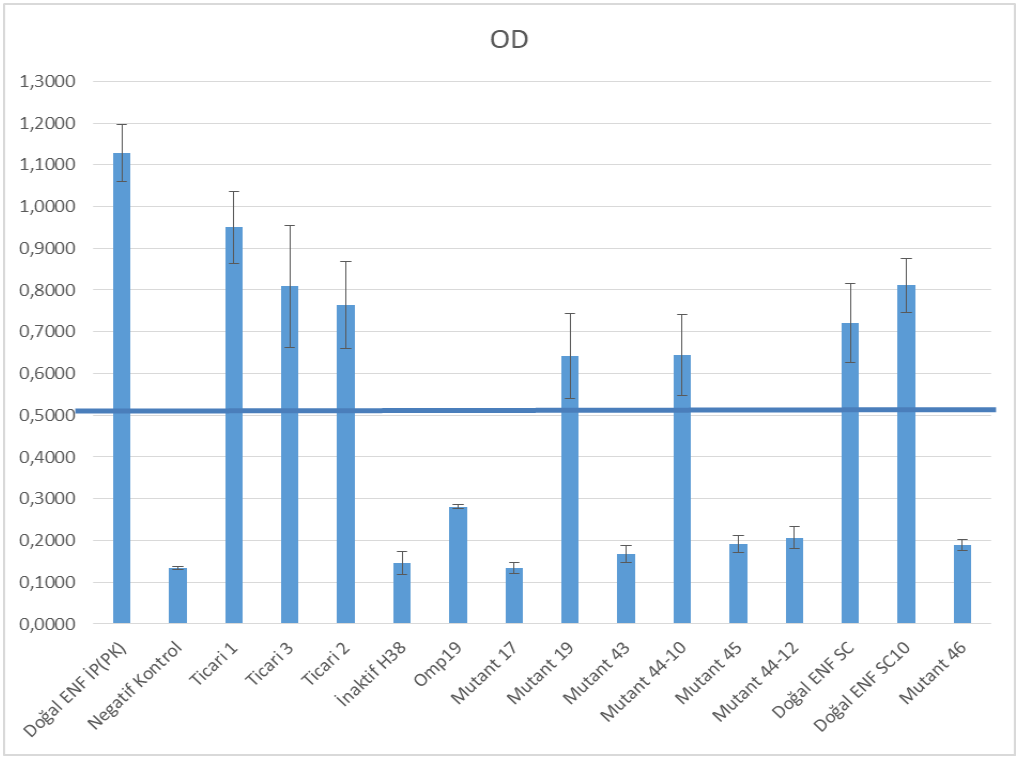
Şekil 3. 25. Seropotens grupları antikor oluşturma güçlerinin tüm hücre antijen temelli ELISA belirlenmesi

Negatif kontrol grubuna göre rekombinant Omp19 protein ile yapılan ELISA sonuçlarında doğal enfeksiyon grubu ile rekombinant Omp19 aşı grubu aynı düzeyde antikor uyarımı sağlandığı tespit edildi. Piyasada bulunan ticari aşı gruplarına göre ise oluşan uyarım farkı anlamlı bulundu ($p<0.05$) (Şekil 3.27).

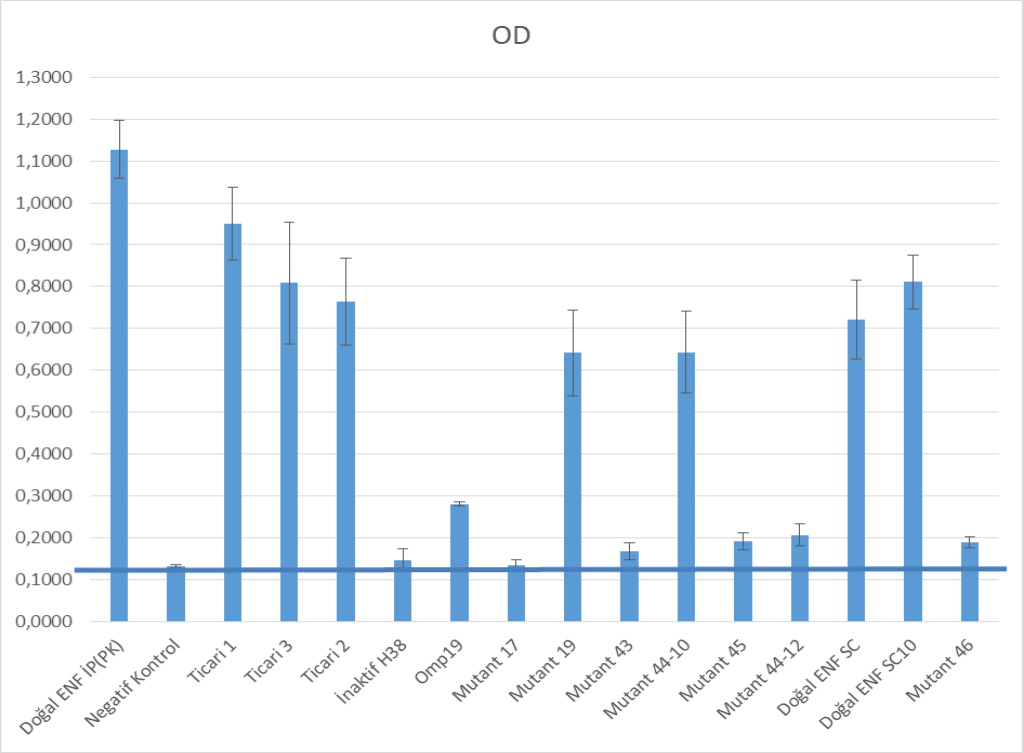


Şekil 3. 26. Seropotens grupları Omp19 proteinine bağlanma güçleri

Cutoff değeri ROC analizine göre 0,5108, negatif kontrol OD değerleri ortalması+3 standart sapma ile 0,159504 olarak belirlendi (Şekil 3.28) (Şekil 3.29).



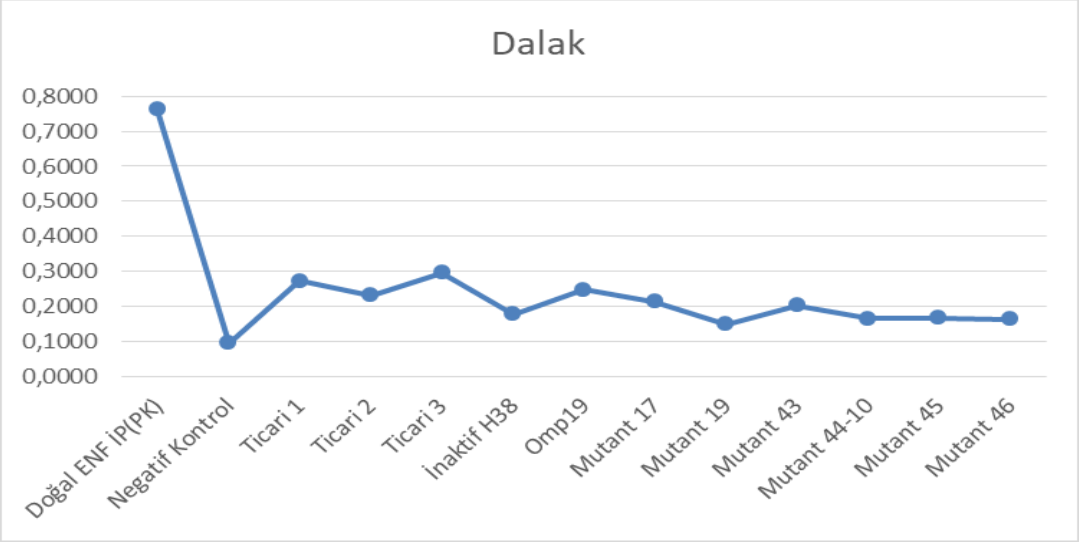
Şekil 3. 27. ROC analizine göre %100 sensivite ve %100 spesifite ile belirlenen Cut off değerine (0,5108) göre sonuçlar



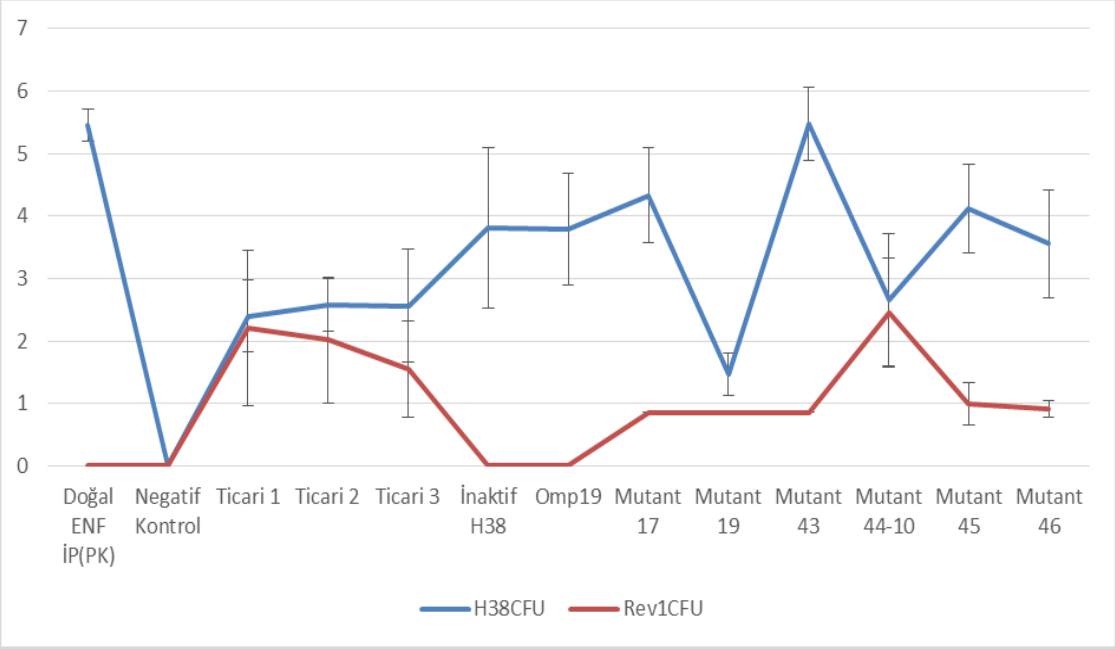
Şekil 3. 28. Negatif kontrol değerlerine göre Ort+3 standart sapma ile belirlenen cut off değerine (0,159504) göre sonuçların dağılımı

3.8.Çelınç

Çelınç patojenite grubu en yüksek dalak gramajına (0,76 gr) sahip grup olarak tespit edildi. Aşı gruplarına da patojenite gruplarına çelınçta aynı bakteri sayısı ($5x10^5$CFU) dalak gramajının ve bakteri sayının doğal enfeksiyon grubunda ki kadar artmadığı tespit edildi (Şekil 3.30)(Şekil 3.31).



Şekil 3. 29. Gruplara göre dalak ağırlıklarının dağılımı



Şekil 3. 30. Çelınç için verilen H38'ın Log 10 tabanına İmmun temizleme gücünün belirlenmesi

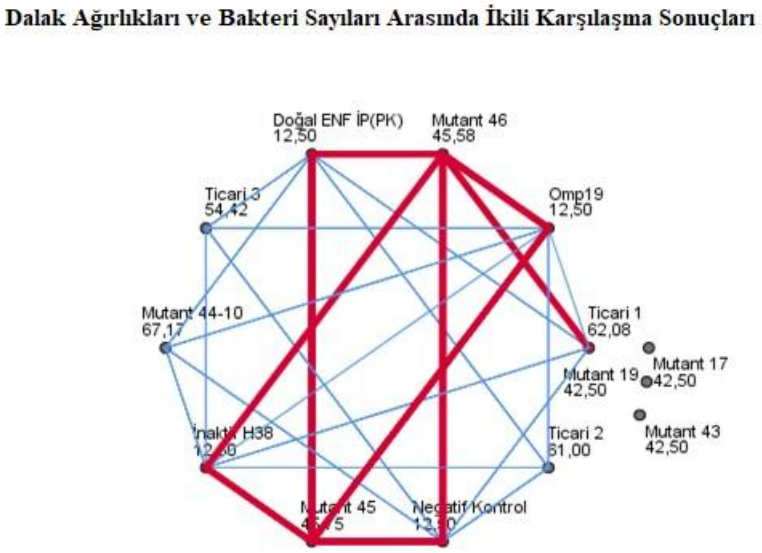
Aşı etkinlik gücünün belirlenmesi için fare modellerinde dalaktan CFU bazında immün temizleme gücü ölçüldü. Mutant 19 ve 44-10 immün temizleme gücü ve dalak gramı ile ticari *B. melitensis* Rev.1 grupları arasında anlamlı fark bulunamadı (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Çelınç sonrası *B. melitensis* Rev.1 aşı gruplarının immün temizlik güçlerinin belirlenmesi

Gruplar	Dalak Ağırlığı Ortalama ∓ Standart Sapma (Min-Mak)	Bakteri Sayısı (log(x/logx)) Ortalama ∓ Standart Sapma (Min-Mak)
Doğal Enfeksiyon (PK)	0,7617 ∓0,16043	5,4577∓0,26066
Negatif Kontrol	0,0950∓0,00837[a]	0,0000∓0,00000
Ticari 1	0,2717∓0,09131 [ab]	2,3976∓0,57104 [a]
Ticari 2	0,2317∓0,02401 [ab]	2,5801∓0,42767 [a]
Ticari 3	0,2950∓0,09566 [ab]	2,5587∓0,90578 [a]
İnaktif H38	0,1767∓0,04457 [a]	3,8055∓1,28236 [ac]
Omp19	0,2467∓0,09873 [ab]	3,7864∓0,90165 [ac]
Mutant 17	0,2133∓0,04546 [ac]	4,3328∓0,75831 [acd]
Mutant 19	0,1483∓0,01722 [ac]	1,4662∓0,34230 [af]
Mutant 43	0,2017∓0,02858 [ac]	5,4741∓0,58741 [acd]
Mutant 44-10	0,1650∓0,02258 [ac]	2,6510∓1,06478 [af]
Mutant 45	0,1667∓0,04367 [ac]	4,1170∓0,71762 [acd]
Mutant 46	0,1633∓0,03266 [ac]	3,5563∓0,86787 [acd]
P	0,001	0,001

a: Doğal Enfeksiyon (PK)'dan farklı
b:Negatif Kontrolden farklı
c: Ticari 1-2-3' den farklı
d: Antikor yanıtı oluşturan Mutant 19-(44-10)'dan farklı
e: Antikor yanıtı oluşturmayan Mutant 17-43-(44-12)-45-46
f: OMP 19'dan farklı

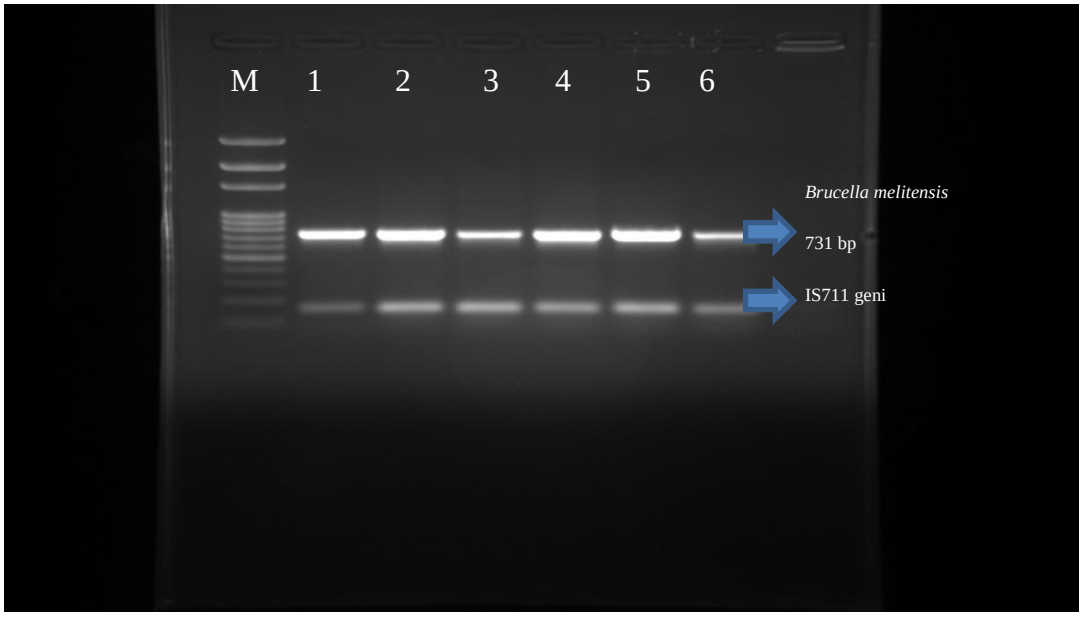
Dalak ağırlığı artıkça bakteri sayısının da aynı oranda artığını gösteren bir ilişki tespit edildi (Şekil 3.32).



Şekil 3. 31.Dalak ağırlığı ve bakteri sayılarının arasındaki çoklu karşılaştırma grafiği

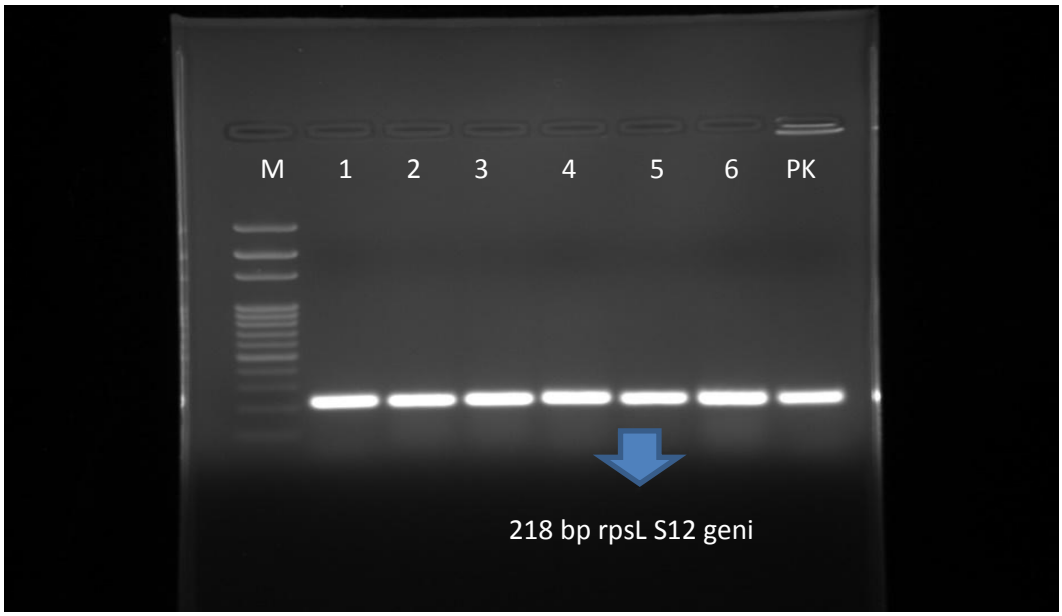
3.9. Mutantların pasaj stabilitesi

Ticari *B. melitensis* Rev.1 ile arasında 7 pasaj fark bulunduran 6 mutant izolatta (17, 19, 43, 44, 45 ve 46) mPZR ile 731 bp ve IS711 bandı tespit edildi ve B. melitensis olarak doğrulandı (Şekil 3.33).



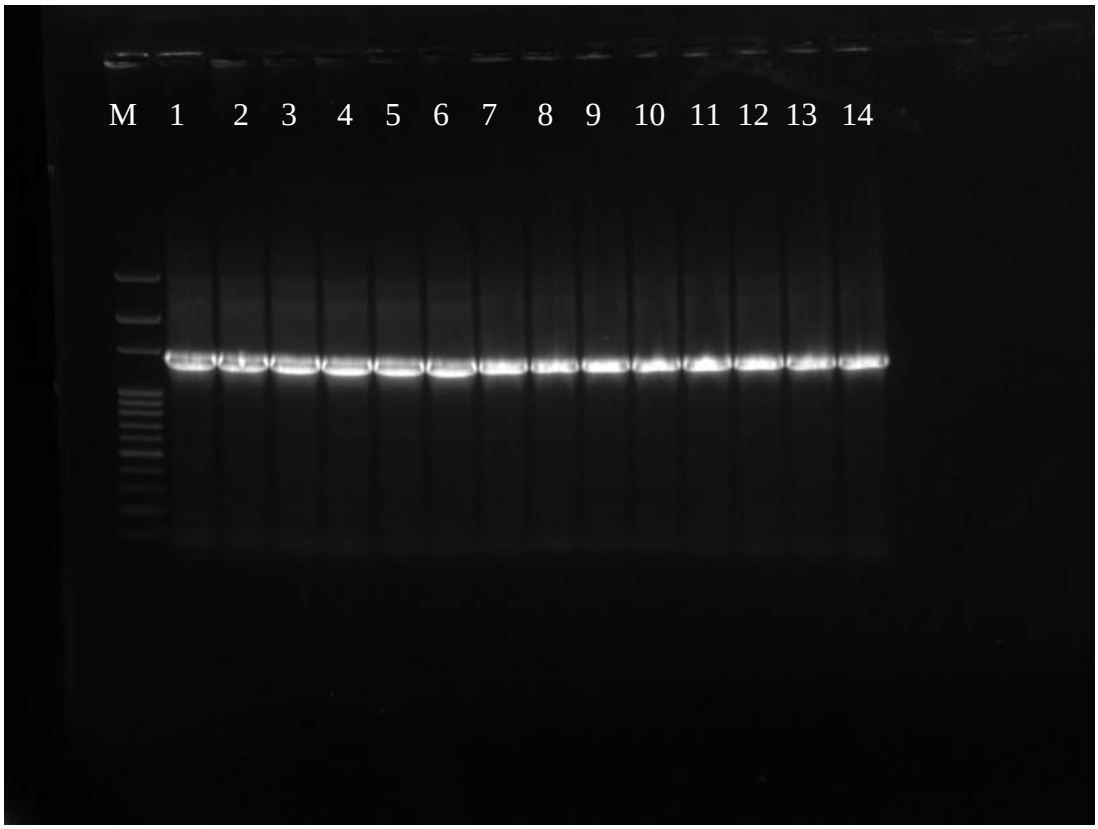
Şekil 3. 32.Delesyon mutantlarının *B. melitensis* olarak doğrulanması, (1-17 izolat, 2-19 izolat, 3-43 izolat, 4-44 izolat, 5-45 izolat, 6-46 numaralı mutantlar)

Mutant izolatlarda 7 pasajlık farkın *B. melitensis* Rev.1'e özgü bölgede değişime sebep olmadığı PZR ile tespit edildi (Şekil 3.34).



Şekil 3. 33. Delesyon mutantları *B. melitensis* Rev.1 gen özelliği yönünden doğrulanması, M:Marker, PK: Pozitif kontrol,1: Mutant 17, 2: Mutant 19, 3: Mutant 43, 4: Mutant 44, 5: Mutant 45, 6: Mutant 46

Seropotens ve çelınç gruplarındaki başarısı sebebiyle seçilen 44 numaralı mutant 14 defa Brucella agara pasajlanmasının sonunda kromozomda meydana gelen Omp19 ORF'ında oluşan gen delesyonunu tüm pasajlarda korundu (Şekil 3.35).



Şekil 3. 34. *B. melitensis* Rev.1 ΔOmp19-44 isimli mutantın 14 pasaj sonunda hala gen delesyon stabil kalması, M:Marker, 1-1.pasaj, 2-2.pasaj, 3-3.pasaj, 4-4.pasaj, 5-5.pasaj, 6-6.pasaj, 7-7.pasaj, 8-8.pasaj, 9-9.pasaj, 10-10.pasaj, 11-11.pasaj, 12-12. pasaj, 13-13.pasaj, 14-14.pasaj

4.TARTIŞMA

Zoonoz, hücre içi patojen olan Brusellozis'in abort süt verim kayıpları ile yarattığı ekonomik kaybın yanı sıra halkın tedavisi ve korunma kontrol amaçlı aşılama kampanyalarında ciddi rakamlar harcanmaktadır. Çiftlik hayvanlarında Brusella'dan ari olan A.B.D, eğer eradikasyon programını bugün durdursa 10 yıl içerisinde et ve süt üretim maliyetinin her yıl 80 milyon dolar şeklinde katlanarak artacağını bildirmiştir (Grannis ve Bruch 2006).

Türkiye hastalıkla 1969 yılından beri etkin şekilde mücadele etmektedir. TOB'lığı hastalığın eradikasyonu için 1984, 2012 ve 2019 yıllarında **"Ulusal Brusella Kontrol ve Eradikasyon Projesi"** genelgeleri yayınlamıştır (TOB 2019).

İlk enjektabıl olarak ergin ve genç aşılama yapılan süreçte, aşılama sırasında oluşan iş kazaları sonucu aşıdan korkma, kalabalık hayvan varlığına sahip sürülerde aşıların işletme sahiplerine elden verilmesi, aşının abort yaptırdığına ve hastalık oluşturduğuna dair söylemler, işletmeler arasında hastalık kontrolü olmadan yapılan damızlık hayvan geçişleri, pozitif mihraklarda uygulanan esnek karantina ve mihraklarda seropozitif hayvanların tazminatsız yöntemlerle kesime gitmesi aşılama stratejilerinin başarısız olmasına sebep olmuştur.

Sonraki dönemde gelen ithal hayvanlar, 4-5 yaşlı ineklerin aşılama yapılmaması sebebiyle enfeksiyona açık hale gelmesi, endemik bölgelerde bulunan ari işletmelerde "aşısız arilik" ile hayvanların bağışıklanmaması, hastalık mihraklarında seropozitif hayvanların kesime gönderilmesi ancak tazminat yapılmaması, Veteriner Hekimlere verilen aşı priminin bu süreçte bir dönem kaldırılması, konjuktival aşının kısa dönemli bağışıklığı, hayvan zapt-ı raptının iyi sağlanamadığı durumlarda aşılama sırasında meydana gelen dozlama hataları, kontrolsüz hayvan hareketleri bu dönemde başarısızlığın olası sebepleridir (TOB 2009, TVHB 2017). Aşılama statejisi ile eradikasyonu sağlayan ülkelerde Brusella aşılarının ortalama %70 koruma sağladığı bilinmektedir. Eradikasyon planlarının daha kaliteli yürütülmesi için çiftlik hayvanlarında patojen her hastalıkta olduğu gibi Brusella ile mücadeledede marker aşılara ihtiyaç duyulmaktadır.

4.1.Refarans *B.melitensis* Rev.1'lerinin doğrulanması

Yapılan PZR testlerinde Ticari 1 isimli *B. melitensis* bv.1. Rev.1 hem melitensis hem de Rev.1 gen varlığı yönünden doğrulandı. Türkiye'de üretimi devam eden ve Ticari 1 olarak isimlendirilen ve Dye test sonucuna göre diğer aşı suşlarından farklı olarak penisiline dirençli ve boya varlığında (bazik fuksin, tiyonin) varlığında üreyebiliyor olması ise yapılan pasaj sayısının fazla olmasına bağlı olabileceğinden düşünüldü. WHO tarafından hazırlanan Brucella'da laboratuvar teknikleri 55 numaralı monografisi *B. melitensis* Rev.1 aşısı hazırlanması kısmında ideal Rev.1 özellikleri olarak Streptomisin 2,5 µg/ml dirençli ayrıca penisilin 5 IU, Bazik fuksin 20 µg/ml ve Tiyonin 20 µg/ml duyarlı olması gerektiğinden bahsetmiştir (Alton ve ark 1975). *B. melitensis* biovar 1'lerin 10 µg/ml ve 5 µg/ml boya varlığında (bazik fuksin, tiyonin) üreyebildikleri bilinmektedir (Banai ve ark 1990). Ancak ticari 1 isimli Rev.1 suşunun 20 µg/ml boya varlığında gelişim göstermesi suş yapısında pasaja meydana gelen mutasyonu göstermektedir. Keçiler üzerinde master seed ile başlanan ve 6 pasaj sonrasına kadar devam edilen denemede aşı suşunun mutasyonla enfeksiyona sebep olabileceği ön görülmüştür (Alton ve ark 1967). Rev.1 pasajları ile yürütülen çalışmada 12 pasaja kadar olan çözdürülüp tekrar liyofilize 5 ticari aşıdan 3'ünün alt kültürü penisilin direnci kazandığı rapor edilmiştir (Bosseray 1991). Dünya üzerinde de penisilin direnci gösteren Rev.1 suşları tespit edilmiştir. İspanyada 6 fark laboratuvardan alınıp incelenen *B. melitensis* Rev.1 aşı suşlarından birinin 5 penisiline IU dirençli olduğu tespit edilmiştir (Grilló ve ark 2000). *B. melitensis* biovarlarında meydana gelen penisilin direncinin rpoB geni mutasyonuna bağlı oluşacağı bildirilmiştir (Sayan ve ark 2009).

4.2.Mavi-Beyaz koloni doğrulanması

Kompetent *E. coli* DH5α suşlarının 16-24 saat içerisinde koloni oluşturduğu bilinmektedir. Çeşitli mavi beyaz ayrımı protokollerinde 24-48 saat içerisinde mavi koloni oluştuğu belirtilmesine rağmen bu çalışma esnasında mavi koloniler ancak 72 saat kültür sonucunda net olarak ayrılabildi. Çeşitli çalışmalarda X-gal miktarının artırılmasının mavi koloni oluşumundaki olumlu etkisi bildirilmiştir (Maas 1999). LB buyyon içerisindeki X-gal miktarının 20 mg/ml'den 40 mg/ml çıkarılması mavi renk oluşumunu ve renk yoğunluğunu artırmaktadır (Sherwood 2003). X-gal'ın pahalı olması ve tercih edilen yoğunluğun 20 mg/ml olması sebebiyle bu miktarda

kullanıldı ve kullanılan bu miktarda bir günden daha fazla inkübasyona ihtiyaç duyulmaktadır.

4.3. Yoğun plazmid eldesinin değerlendirilmesi

Kompetent haline gelmiş Brucella'ya gen aktarımı için temiz, yoğun ve konsantre olarak minimum 1 µg plazmid elde etmek gerekmektedir. Bunu gerçekleştirmek için ZymoPURE™ II plazmid maxiprep kit protokolünde 1,2 mg kadar plazmid DNA'sından elde edile bildiğinden bahsedilse de yapılan çalışmalarda 30-40 µg kadar plazmid DNA'sı elde edilebildi. Bazı denemelerde 150 ml-500 ml arasında başlangıç kültürü kullanılsa da ancak miniprep kiti ile 100 ng/µl DNA elde edilmiştir. Bazı çalışmalarda benzer miktarlarda plazmid DNA'sı elde edilmiş olması ZymoPURE™ II plazmid maxiprep kit belirtilen miktarlarda plazmid DNA'sı elde edemediğini kit ömrü geçtikçe RNase aktivitesini kaybettiği için elüe edilen miktarların düşük olabileceği yada elüsyon için elüsyon buffer yerine ultra saf suyun kullanımına bağlı olarak kolon'da uygun pH değişimini meydana getirememesine bağlı olarak toplam yükün kolondan elüe edilemediği düşünülmektedir (Cheng ve ark 2020, Nguyen ve ark 2020).

Alkalen liziz ile DNA kalitesi düşük de olsa yoğun ve çok miktarda plazmid DNA'sı (15 mg/ml) elde edilmiştir. Yapılan bir çalışma alkalen lizis ile, maxiprep kite göre kıyaslanamayacak kadar yoğun miktarda plazmid elde edildiği ortaya konmuştur (Li ve ark 2008). Bu çalışmada elektroporasyon sırasında arc hatası alınmaması için tuzdan ve alkolden ari DNA elde etmek ve plazmid izolasyon kiti kullanılmıştır Çalışmada ayrıca alkalen lizis ile izole edilen DNA'larda çeşitli konsantrasyonlarda kullanıldı.

4.4. Kompetent Brucella gen aktarımı değerlendirilmesi

Quandt ve Hynes (1993) çalışmasında kullanılan pJQ200KS isimli plazmid, *Rhizobium leguminosarum* için dizayn edilmiş bir intihar plazmididir. Rhizobium ve Brucella'nın α-proteobacteria türü içerisinde yer alması nedeniyle *B.melitensis* bv.1. Rev.1'den yapılacak gen silinmesi işlemi içinde uyumlu olacağı düşünüldü. Diğer intihar plazmidlerinde bulunan delesyon kasedinde yer alan sükroz direnci ile ilişkili Sac B genine, Lac operatörünü içeren pBlueIIKS plazmid *backbone*'nuna ve pJQ plazmid *backbone*'nuna sahiptir (Hynes ve ark 1989). Sahip olduğu kaset ile ilk

merodiploid yapının oluşmasında ve kross over basamaklarının şekillenmesinde delesyona yön vereceği düşünüldü. *B. ovis* ile yapılan LPS delesyonu çalışmasında ve *B. abortus* 2308'ten galE geni dizilimi için kütüphane oluşturulmasında pJQ200KS plazmidinin kullanılması, *B. melitensis* Rev.1'den yapılacak gen delesyonunda bu plazmidin etkili olacağı fikrini ortaya çıkarmıştır (Scupham ve Triplett 1997, Soler-Lloréns ve ark 2014). Çalışmada elde edilen bulgular neticesinde ortaya sürüen bu fikrin doğruluğu kanıtlanmıştır.

Dizi analizi sonucunda Omp19 ORF yerinde Not I kesim enzimi gen dizisinin bulunması gen silinmesinin yapıldığı yaşanan bölgeye gen eklenmesinin de yapılabileceğini göstermiştir.

Brucella'larda doğal plazmidinin bulunmadığından plazmid kayynaklı mutasyonlara çok açık değildir (Corbel 1997). LPS'de oluşan mutasyonu ile rough koloni haline gelme, streptomisine dirençli Rev.1 ve rifampisin varlığında elde edilen RB51 uzun pasajlar sonrası bakteriyel adaptasyon ile elde edilmiş mutantlardır (Smith ve Heffron 1987). Konjugasyon, lipofectamin ve elektroporasyon ile yapılmış gen aktarım çalışmaları mevcuttur (Lai ve ark 1990, McQuiston ve ark 1995, Cassataro ve ark 2005, Soler-Lloréns ve ark 2014). Bu çalışmada kullanılan pJQ200KS isimli intihar plazmidinde konjugasyon için gerekli λ pir gen bölgesi bulunmadığı için konjugasyonla başarılamamaktadır. Bu sebeple en mantıklı olarak seçilen elektroporasyon protokollü ile yapılan ön çalışmalarda başarı elde edilememiştir.

Bu çalışmada Brucella'nın kompetent hale getirilerek gen aktarımının elektroporasyon ile kolaylaşması için hücreler, çeşitli yöntemlerle ile sferoplast haline getirildi. Brucella'nın sferoplast yapıya dönüşmesi için yapılan iki çalışma bulunmaktadır. Gen aktarımı amacı bulunmaksızın Brucella'dan sferoplast eldesi için yapılan çalışmada 24 saat ön kültür sonrası 48 saat sferoplast için penisilin, ampisilin ve glisin uyarımına maruz bırakılarak sferoplast haline gelmiş hücreler kontrol edilmiş ve en etkin uyarım yolu olarak penisilin ve glisin alınmıştır (Hines ve ark 1964). Gheibi ve ark (2019) yaptığı çalışmada 24 saat ön kültür sonrası 24 saat sferoplast için ampisilin ve glisin uyarıma maruz bırakılarak elektroporasyona alınmış ve başarı oranının ampisilinde yüksek olduğu belirtilmiştir.

Veriler göz önüne alınarak çalışma dizayn edilmiş ancak belirtilen sürelerde mikroskobik olarak bile sferoplast yapı elde edilemedi. Bunun üzerine Brucella koloni morfolojisinin 3-4 gün de oluşmasından yola çıkarak farklı uyarım protokolleri çeşitli süre modifikasyonları yapılarak uygulandığında en etkili sürenin ön kültür ve sferoplast uyarım süresinin toplam 96 saat olduğu kültürlerde başarı mutantlar elde edildi (17, 19, 43, 44, 45, 46). Ancak elektroporasyonda en etkili kültürün 24 saat ön kültür sonrası 72 saat sferoplast uyarımı yapılan denemelerde oluştuğu gözlenmiştir. Ancak Hines ve ark (1964) aksine penisilin ile sferoplast uyarım hücre zarının fazlaca ortadan kaldırılmasında dolayısıyla hücrelerde lizise neden olmaktadır. Elde edilen hücreler ayrıca elektron mikroskobunda incelenerek meydana gelen yıkım görüntülenmiştir. Başarılı sferoplast denemeleri elektron mikroskobunda da görüntülerek etkinlikleri doğrulanmıştır. Hem elektroporasyon etkiliği olarak hem de görsel olarak en etkin sferoplast metodu olarak glisin ile uyarım metodunun olduğu belirlendi.

Ancak Brucella ile yapılan gen aktarım çalışmalarında, plazmid'in taşıdığı gen büyüdükçe gen aktarımının zorlaştığı ifade edilmiştir. Gheibi ve ark (2019) yaptıkları çalışmada *B. abortus* RB51'e 4 kb'lık plazmid aktarımında normal Brucella kompetent lerinin gen aktarımında başarı oranı 1µg DNA için 60 koloni civarında iken, plazmid 7kb'a çıkarıldığında elektroporasyon ile başarı sağlanamadığını tespit etmişlerdir. Mcquiston ve ark (1995) Brucella'ya intihar plazmidi aktarımı için hazırladıkları protokolde kullanılan plazmid 4,7 kb'dır. Lalsiamthara ve ark (2015) *B. abortus* per geni delesyonu için dizayn ettikleri intihar plazmidi 5,6 kb'dır. Çalışmada kullanılan pJQ200KS plazmidi boş iken 5.4 kb büyüklüğünde olup delesyon için kullanılan homoloji bölgesi gen *insert*ü (1.3 kb) ile birlikte 6,7 kb büyüklüğünde bir plazmide dönüşmektedir. Gheibi ve ark (2019) verileri ile kıyaslandığında, bu çalışmada kullanılan yaklaşık 7 kb büyüklüğünde mutant plazmid pJQ200KS ile yaşanan gen aktarımı problemleri tutarlı gözükmektedir. Bunun yanı sıra *B. abortus* ile yapılan bazı çalışmalarda 8 kb ve 13,7 kb büyüklüğünde plazmidlerin elektroporasyonda 200 Ω 3,7 msn gibi değerlerle başarılı mutant elde ettiklerini bildirmişlerdir (Lai ve ark 1990, Halling ve ark 1991). Çalışma bulguları ve önerilen protokollerde başarılı Brucella mutantı için, 400 Ω dirençte en az 20 msn elektrik akımına maruz kalması tavsiye edilmektedir. Elde

edilen veriler ile konu hakkında yapılan çalışma sonuçları kıyaslandığında uyumsuzluğu göze çarpmaktadır.

Mutant 43, Mutant 44 ve Mutant 45, 24 saat ön kültür sonrası 72 saat %2 glisin içeren ortamda uyarıldı. Kompetent Brucella'lardan 1 µg, 5 µg ve 10 µg plazmid DNA'sı içeren tüm gruplarda elde edilen bu başarısı glisin ile sferoplast hale gelen komponetin hücre duvarında meydana gelen bozulma ile 1 µg plazmid DNA'sına kadar etkin sonuç verdiğini gösterdi.

Mutant 19 ve 46, ampisilin (10 µg/ml) ile 96 saatlik kültürlerde hazırlanan sferoplast yapıları yüksek (10 µg) ve düşük (1 µg) plazmid DNA'sı varlığında etkinlik gösteremediği ve her iki grubunda 5 µg plazmid DNA'sı varlığında ideal şekilde etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Sferoplast için %2 glisin uyarımından sonra 4 ve 10 µg/ml ampisilin uyarımından ise iki mutant elde edilmiş olması glisin ile oluşturulan sferoplastların gen alım kapasitesinin yüksek olduğunu göstermiştir. Hipotezin kurulmasında etkili olan çalışmada Gheibi ve ark (2019) elektroporasyon ile gen aktarımında sferoplast *B.abortus* RB51'i kompetent hale getirmişler, aralarında çok anlamlı fark bulunmasa da ampisilin ile elde edilen sferoplast hücrelerinin glisine göre daha etkin olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada da benzer gruplarda mutant elde edilmiş olması çalışmaların tutarlılığını göstermekte olup penisilin grubunda başarı sağlanamaması bu çalışmayı etkin kılmaktadır.

4.5. Delesyon mutantlarının potensi

Seropotens sonuçları, SAT ve tüm hücre ELISA açısından tutarlı bulunmamıştır. Çelinç sonrası antikor yanıtın (antijen antikor bağlanması sonucu) azalacağı düşünülmüştür. Doğal enfeksiyon grubunda periton içi enjeksiyon sonrası elde edilen değer ile aynı dozda hatta 10^{12} dozda bile deri altı enjeksiyon ile elde edilen değerler kıyaslandığında farelerde antikor yanıt oluşturmada deri altı yolun çok etkin olmadığı tespit edilmiştir. Ancak OIE yeni aşıların fare modellerinde kıyaslanmasında deri altı yolla enjeksiyonun uygun olduğunu belirtmiştir (OIE 2009). Dolayısıyla ana etkinlik dalakta yoğunlaşan bakteri sayısı üzerinden yapıldı ve seropotens sonuçları ile kıyaslanmıştır. Farelerde Brucella modellerinde damar içi ve periton içi enjeksiyonun organizmada hızlı kolonizasyona sebep olması

dolayısıyla enfeksiyon modeli oluşturmada tercih edildiği ve deri altı ve patiden yapılan enjeksiyonların daha düşük seviyede enfeksiyona sebep olduğu belirtilmiştir (Chen ve Elberg 1970, Rajashekara ve ark 2005, Grilló ve ark 2012). Ticari veya mutant Rev.1 aşı gruplarında dalaktaki bakteri kolonizasyon sayılarının da az olması, oluşan antikor yanıtın doğal enfeksiyon grubuna kıyasla az olmasının sebebini açıklamaktadır.

SAT sonucuna göre doğal enfeksiyon grubunda yüksek titreli (1/320-1/160) bu şekilde bulunan serum örnekleri, tüm hücre *B. melitensis* H38 ile hazırlanan ELISA testinde Rev.1 grupları ile yaklaşık olarak aynı OD değerini vermiştir. Bu durumun dalak hücrelerinde kolonizasyona bağlı oluşan yüksek antikor yanıtı ve *B. abortus* ve *B. melitensis* antijenik yapıları aynı olsa da SAT antijenin hazırlanmasında kullanılan *B. abortus* S99 antijenik yapısı kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Yapılan daha düşük oranlı sulandırmalarda elde edilen dantele görüntüsü ile bu durum kanıtlanmıştır. Fare modellerinde Rev.1 aşı gruplarında elde edilen antikor yanıtın SAT ve ELISA testleri arasında pozitif bir kolerasyon bulunamamıştır. Bu durum doğal enfeksiyon grubunda ve Rev.1 aşı gruplarında oluşan OD değerlerinin benzer seviyelerde olması, SAT titreleri ve ELISA OD sonuçları arasında geçişi sağlayan bir formülasyon kurulmasını engellemiştir.

Subunit Omp19 ve H38 inaktif aşı grupları RBPT ve SAT antijenleri ile reaksiyona girebilecek antikor yanıtı oluşturmamıştır. Ancak subunit Omp19 tüm hücre ELISA testi sonuçlarına göre negatif OD değerleri baz alınarak hesaplanan cut-off değerine göre etkin düzeyde antikor yanıtı oluşturduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen 17, 43, 44-12, 45 ve 46 numaralı delesyon mutantlarında seropotens aşamalarında hiçbir antikor yanıt tespit edilememiştir. Bu durum kromozom içerisinde Omp19 ORF'si ile etkileşiminde olan diğer immünprotektif ve virülans genlerin, Omp19 geni delesyonu sonucu kromozomda meydana gelen mutasyon ile bu genlerdeki susmaya bağlı olarak Brucella'nın dalakta kolonizasyon yetilerini kaybetmesi sonucu oluşabileceğini düşündürmüştür. Fare modellerinde bu mutantlarda kolonizasyon sayısının düşük olması ve antikor yanıt oluşturmaması başarısızlık olarak değerlendirilmiş ancak bununla birlikte hedef hayvanda yapılacak denemelerde düşük kolonizasyondan yola çıkarak kısa süreli antikor yanıtın avantaja dönüştürülebileceği düşünülmüştür.

Attenüe aşı suşlarının bağışıklık sistemi tarafından uzaklaştırılmadan önce etkili immün cevap oluşumu için belirli bir süre organizmada kolonize olması gerekmektedir. Rev.1 aşıları, hücrelerde uzun süre ve yüksek sayıda rezidüel aktiviteye sahiptir. Etkili antikor yanıtın uzun süre etkili olmasını sağlamaktadır (Kahl-McDonagh ve Ficht 2006). Bu çalışmada fare modellerinde Rev.1 gruplarında dalakta tespit edilen yüksek aktivite bunu kanıtlamıştır. OIE, aşı denemeleri fare immünpotens kısmında, çelınç sonrası dalaktaki rezidüel bakteri sayısının, protektif log sayısına dönüştürülme formülasyonu (Y=log(X/logX) ve referans aşı suşunda protektif log sayısının 2,5 altında, pozitif kontrol grubunda (doğal enfeksiyon) ise en az 4,5 olması gerektiğini açıkça belirtmiştir (OIE 2009). Elde edilen delesyon mutantlarından 19 numaralı mutantın oluşturduğu immün yanıt ve dalak protektif log sayısı (log 0,85) en düşük Rev.1 grubundan (log 1,549) daha az bulunmuştur. Diğer bir etkin potense sahip 44-10 numaralı mutantın protektif log sayısı (log 2,46) en yüksek Ticari Rev.1 (2,20) grubuna yakın bulunmuştur. *B. abortus* S19 aşısı ve *B.abortus* S19Δper ile yapılan delesyon mutant çalışmasında, protektif log sayısı grup içi ortalama *B.abortus* S19'da log 2,97, S19Δper grubunda ise log 3,20 bulunmuştur (Lalsiamthara ve ark 2015). Koyun Brusellozisine karşı hazırlanan *B. melitensis* Rev.1ΔOmp31-bp26 delesyon mutantı fare denemesinde protektif log sayıları sırasıyla; Rev.1 aşısında 1,97, Rev.1ΔOmp31 mutantında 2,35, Rev.1Δbp mutantında 2,43 ve her iki bölge delesyon mutantı Rev.1ΔOmp31-bp26'da 3,27'ye yükselmiştir (Cloeckaert ve ark 2004). Bölge delesyonu artıkça protektif log sayısının, dalakta yerleşen rezidüel Brucella sayısı ile orantılı olarak artığı ve koruyucu etkinin ise azaldığı görülmektedir.

Türkiye'de koyun Brusellozisine karşın kullanımda olan üç ticari aşı kendi arasında kıyaslandığında Ticari 1 isimli Rev.1. suşu SAT sonucunda altı hayvanın üçünde 1/80 oranında antikor yanıta sebep olmuştur. Çelınç sonuçları oluşan antikor yanıtların normal seyirlerde olmasına karşın dalakta kolonize olan bakteri sayısı diğer aşı gruplarına göre yüksek bulunmuştur. Bu durumun penisilin ve boya direnci geliştirmesi sonucu suş yapısında meydana gelen mutasyonla ilgili olabileceği düşünülmüştür. Tüm ticari Rev.1 gruplarının değerleri OIE'ye uygun olarak 2,5 altındadır.

Brucella immün proteinleri ve özellikle *outer membran* proteinlerinin delesyonu üzerine birçok çalışma mevcuttur (Tatum ve ark 1992, Cloeckaert ve ark

2004, Cassataro ve ark 2005). Yapılan delesyon çalışmaları başarıya ulaştıktan sonra bir kısmı projeyi ileri götürüp differentiating infected from vaccinated animal (D.I.V.A) konsepti ile sürü içinde aşılı hayvanların enfekte hayvanlardan ayrımı amaçlandı. Willett ve ark (2016) *B. abortus* ΔrpoE1 ile saha suşunun periton içi enjeksiyonlarının fare modellerinde antikor, γ interferon ve dalak ağırlığı olarak kıyaslamış, immün yanıt oluşturmada etkin olduğunu belirtmişlerdir. Ancak delesyon mutantlarına karşı oluşan antikor yanıtta rekombinant rpoE1 proteinine karşı oluşan spesifik antikor yanıt ölçülememiştir. *B. abortus* S19Δper OPS yapısında per geni delesyonuna bağlı LPS yapısı değişen Brucella daha küçük koloni yapısı oluşturmuştur. Bu durumda S19 Δper karşı oluşmuş antikorlarda daha az çökelme olurken S19 antijeni ile kuvvetli bir çökelme oluşturmuştur. S19 ve S19 Δper potens yanıtı fare modellerinde T hücre bazlı antikor yanıt, γ İnterferon cevabı ve dalak ağırlığı olarak kıyaslanarak etkin bulunmuştur. DIVA etkisini göstermek için çelınç suşu S544 ve S19 Δper mutantları ile aşılı fare ve tavşan serumları 60 gün sonunda RBPT ile kıyaslamış, delesyon mutantlarında orta dereceli aglütinasyonu aşılı hayvanların ayrımında başarı olarak almıştır. Sadece LPS yapısında meydana gelen mutasyon ile daha az aglütinasyon şekillendirdiği savunulmuştur (Lalsiamthara ve ark 2015). Ancak sahada rough Brucella biovarlar bulunabilmekte yada meydana gelen aglütinasyon görece olarak değişebilmektedir. Tüm aşı gruplarında antikor cevabı sağlıklı şekilde kıyaslansa da rekombinant per proteinine karşı oluşan antikor yanıt S19, S544 ve S19 Δper mutantlarında kıyaslanamamıştır. Yang ve ark (2016) ΔnorD, ΔznuA *B. abortus*-lac*Z* çinko pompası delesyon mutantına Lac Z gen operatörü eklemiş ve mutantlarda βgal salgılanmasını sağlayarak oluşan β gal antikor cevabı RB51'den yüksek olduğunu bildirmişler ve DIVA olarak değerlendirmişlerdir. Başka bir çalışmada H38 ve Rev.1 ile koyun grupları enfekte edilmiş ve aşılanmıştır. Oluşan antikor yanıt çeşitli immün ve antijenik rekombinant proteinlere bağlanma güçleri kıyaslanarak değerlendirilmiştir. BP26 proteinine karşı ve LPS yapısına karşı olan bağlanma gücü hem H38 hem de Rev.1 deneme gruplarında yüksek bulunarak gelecek çalışmalar için DIVA etkinliğini sağlayacak aşı olarak *B. melitensis* Rev.1 ΔBP26 elde edilmesi önerilmiştir (Cloeckaert ve ark 2001). Cloeckaert ve ark (2004) sonraki yıllarda *B. melitensis* Rev.1 ΔBP26, *B. melitensis* Rev.1 ΔOmp31 ve *B. melitensis* Rev.1 ΔBP26-Omp31 mutantlarını elde etmişlerdir. Fare modellerinde delesyon mutant BP26-Omp31 rekombinant proteinlerine oldukça düşük antikor cevap oluşturur iken *B. melitensis* Rev.1

grubunda bu proteinlere oldukça güçlü yanıt şekillenmiştir. Model hayvanda elde edilen farktan yola çıkarak hedef hayvan koyunlarda DIVA aşı suşu etkinliğinin denenmesini savunmuşlardır. Wang ve ark (2011) *B. melitensis* 16M çelınç suşundan hücre içi yaşam döngüsünde sorumlu *quorum sensing* olarak kullanılan Vbrj proteininin delesyonunu sağlanmışlar ve elde edilen mutant ile 16M suşunun potens denemesinde rekombinant Vbrj protein ile hazırlanan ELISA'da *B. melitensis* 16MΔ Vbrj antikor yanıt oluşmadığını bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise *B.melitensis* M5-90ΔWboA mutantı elde edilmiş ve mutantın potens gücü *B. melitensis* M5-90 kıyaslandığında fark bulunamamıştır. DIVA olarak rekombinant WboA antijenine karşı *B.melitensis* M5-90ΔWboA mutantı fare denemelerinden elde edilen serumlarda antikor yanıt tespit edilememiştir (Li ve ark 2015). *B. abortus* 2308 ery gen promotoru delesyonu ile aşılanan fare grupları/doğal enfekte fare gruplarından Ery A antijeni ile serolojik olarak ayrılabilmiştir (Zhang ve ark 2014). *B. abortus* 2308ΔNodVΔNodW mutantının hücresel ve serolojik olarak yeterli uyarım sağladığını ve D.I.V.A olarak etkinlik göstereceğini belirtmiştir (Li ve ark 2017). *B. melitensis* 16M Δhfq mutantının Ig G1 ve Ig G2 yanıtını uyardığı bunun yanında interferon ve interleukin-4 etkinliğinin de yüksek olduğunu görülmüş ve bu etkinliği serolojik olarak enfekte fare gruplarından ayrılabilmiştir (Zhang ve ark 2013). *B. abortus* S19 ΔP39 gen delesyonu ile elde edilen mutantın rezidüel virülensinin referans aşılar kadar etkin olduğu ve enfekte fare gruplarından ayrılabildiği kanıtlanmıştır (Tibor ve ark 1998). *B. melitensis* 16MΔwzt hedef hayvan koyunlarda aborta sebep olmadığı ve enfekte hayvanlardan serolojik olarak ayrımı sağladığı tespit edilmiştir (Wang ve ark 2014). *B.melitensis* M5-90 ΔmanB mutantı keçilerde yapılan denemede aşının etkin olduğu ve ayrımı sağlayabildiğini belirtilmiştir (Zhang ve ark 2017).

Delesyonu farklı yöntemlerle doğrulanan 6 mutantın oluşturduğu antikorları, tüm hücre ELISA testi ile OD ölçümleri değerlendirildiğinde; 19 ve 44-10'mutantlarını Ticari aşılara yakın güçte oldukları görülmüştür. Oluşan eksik gücün yüksek korunmuş antijenik bölge olan Omp19 delesyonuna bağlı şekillendiği düşünülmektedir. Rekombinant Omp19 Brucella antijeni ile kaplanan ELISA testi OD değerlendirildiğinde tüm hücrede güçlü antikor yanıt alınan 19 ve 44-10 numaralı mutantların artık OD değeri oluşturmadığı tespit edilmiştir. Fare modelinde, H38 ile oluşturulan enfeksiyon grubu, Türkiye'de ticari Rev.1 aşıları ve subunit

Omp19 incomplete freund adjuvantlı aşısı Omp19 antijeni ile yapılan ELISA'da kuvvetli antijen-antikor yanıtına bağlı yüksek OD değeri gösterirken, *B.melitensis* Rev.1 ΔOmp19 mutantlarında yüksek antikor gücüne rağmen bağlanma şekillenmemesi çalışma hipotezini desteklemiştir. Elde edilen sonuçlara göre Omp19 delesyonlu Rev.1 suşu dünyada fare modellerinde DIVA özelliği gösteren aşı aday suşu olduğu sonucuna varılmıştır.

Ana tohum (master seed) olarak kabul edilen Rev.1 ile Rev.1ΔOmp19 mutantları arasındaki 7 pasajlık fark mutant kromozomunda suşun *B.melitensis* ve rpsL s12 geninde herhangi farklılığa sebep olmazken ve 6 mutantın hepsinin *B. melitensis* ve *B. melitensis* bv.1 Rev.1 olduğu doğrulanmıştır (Şekil 3.33) (Şekil 3.34).

Elde edilen potens sonuçların göre seçilen 44 numaralı mutantın seri pasajlanmaları ile 14 pasaj boyunca delesyonu kaybetmediği ve kromozomda meydana gelen bu silinmenin geri kazanılmadığı gösterilmiştir. Meydana gelen delesyonun geri dönüşümsüz olduğuna kanaat getirilmiştir. Brucella'nın doğal plazmidinin bulunmaması gen aktarımını güçleştirse de bakterinin plazmid invazyonuna karşı bir koruyucu mekanizma geliştirememesi sebebiyle delesyonun sağlandığı Omp19 ORF gen dizilimini geri kazanamadığı gösterilmiştir.

Hayvanlardaki Brucellozise karşı mücadelede ana amaç istikrarlı koruma sağlayan, kalıcı koruyucu antikor etkisi oluşturmayan, dalakta rezidüel etki bırakmayan, etkili ucuz ancak sahada kolaylıkla enfekte ve aşılı hayvanların ayrılmasına olanak sağlayan yeni aşılar geliştirmektir. Canlı hayvann üzerinde Brusellozisin serolojik olarak izlenmesinde/kontrolünde temel olarak B. abortus S99 S-LPS antijeninden hazırlanan aglütinasyon, CFT ve ELISA temelli testler kullanılmaktadır. Etkin aşılama sığırlar için *B. abortus* S19, koyunlar için *B. melitensis* Rev.1 ile yürütülmektedir. O-PS bazlı testlerden kurtularak farkı ortaya koymak için rough koloni *B. abortus* RB51 elde edilmiştir (Schurig ve ark 1991). Ancak RB51 minimal düzeyde de olsa M-benzeri O antijen barındırmaktadır (Cloeckaert ve ark 2002). Ayrıca LPS delesyonuna sahip rough mutantlar daha düşük protektif etkinliğe sahiptir (Olsen ve ark 2009). Dahası koyunların Brucellozisine karşı etkin değildir ve sahada enfeksiyon sonucunda oluşan antikorların aşılı hayvanlardan ayırt edebilecek bir aşı suşu bulunmamaktadır.

B. melitensis, ruminantların birlikte yetiştirildiği ülkelerde sığırlarda ve develerde de enfeksiyona sebep olmaktadır. Sığırlarda *B.melitensis*'e bağlı abort vakalarında artışlar olduğu bildirilmiştir. *B.melitensis* enfeksiyonlarına karşı *B.abortus* S19 aşısının kısmi koruması mutant *B.melitensis* Rev.1.ΔOmp19 kullanımı daha da önemli hale getirebilir.

Çalışmada elde edilen 2 adet Rev.1 Omp 19 delesyon mutantı ile ticari Rev.1 aşıları fare modeli üzerinde kıyaslandığında en az ticari aşılar kadar yeterli rezidüel virülans ve protektif immünite oluşmaktadır. Fare modellerindeki etki olumludur. Bu delesyon mutantlarının potens ve virülans etkileri yakın gelecekteki hedef hayvan koyunlarda Brucellozise karşı araştırılması amaçlanmaktadır. Bu çalışma ile ΔOmp19 geni silinmiş B. melitensis Rev.1 suşundan aşı hazırlanılması ve kullanılması durumunda serolojik olarak Omp19 proteini taranmasına yönelik ELISA testleri ile aşılı/enfekte ayrımı (DIVA) yapılabilecektir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Plazmid gen miktarı artıkça Brucella kompetenti içerisine aktarım zorlaştırdığı

2. Doğal plazmidi bulunmayan Brucella'nın sferoplast kompetent hale getirilerek gen aktarımını kolaylıkla sağladığı

3. Sferoplast yapıya dönüştürmede bakterinin G1 fazının ne kadar sürdüğü önemildir. Daha genç veya daha yaşlı hücrelede aktarım şekillenmediği

4. Sferoplast yapı ile gen aktarım yolu seçilecek ise en etkili yolun %2 glisin olduğu

5. Kromozomda meydana gelen delesyonun geçici olmadığı

6. Fare modellerinde aşı gruplarında deri altı ve periton içi yol ile kıyaslandığında istenen antikor uyarımını şekillendiremediği

7. İnaktif tüm hücre Brucella aşısında hiçbir etkinliği bulunmadığı

8. Omp19 lipoprotein yapısının Brucella enfeksiyonlarındaki virülans gücü Omp19 sub-unit aşı grubu ile gösterilebileceği,

9. Türkiye'de bulunan üç ticari aşı da fare modellerinde OIE standartlarına uygun olarak log gücü 2.5 altında bulunduğu,

10. Ticari 1 numaralı Rev.1 aşısı biyokimsal olarak mutasyonlara sahip olsa da potens ve çelınç etkinliğinin olduğu,

Sonuç olarak; elde edilen 2 adet Omp19 delesyonlu Rev.1 aşı suşunun fare modellerinde potens gücü en az refarans aşı suşları kadar etkin bulunmuş ve aşılı-enfekte fareler arasındaki ayırımı ELISA testi ile yapılmıştır. Bu mutant aşı özellikle Türkiye'de enfekte sürülerde yapılan serosurveylerde elde edilen pozitif reaksiyonun kaynağının belirlenmesinde ileriye yönelik yapılacak hedef hayvan denemeleri için temel oluşturacağı düşünülmektedi. Aday aşının gelecekte hedef hayvanlarda aynı ayrım ve potens gücünü göstermesinin Ülkemiz Dünya hayvancılığına katkı sağlayacağı sonucuna varılmıştır.

6.KAYNAKLAR

Ackermann MR, Cheville N, Deyoe B, 1988. Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of Brucella abortus strain 19. Vet Pathol, 25, 1, 28-35.

Adone R, Ciuchini F, Marianelli C, Tarantino M, Pistoia C, Marcon G, Petrucci P, Francia M, Riccardi G, Pasquali P, 2005. Protective properties of rifampin-resistant rough mutants of Brucella melitensis. Infect. Immun, 73, 7, 4198-204.

Ahmed W, Zheng K, Liu Z-F, 2016. Establishment of chronic infection: Brucella's stealth strategy. Frontiers in cellular and infection microbiology, 6, 30.

Allen CA, Adams LG, Ficht TA, 1998. Transposon-derived Brucella abortusrough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. Infect. Immun, 66, 3, 1008-16.

Alton G, Elberg S, Crouch D, 1967. Rev. 1 Brucella melitensis vaccine: The stability of the degree of attenuation. J Comp Pathol, 77, 3, 293-300.

Alton GG, Jones LM, Pietz D, Organization WH, 1975. Laboratory techniques in brucellosis.

Amano K-i, Williams J, Missler S, Reinhold V, 1987. Structure and biological relationships of Coxiella burnetii lipopolysaccharides. J Biol Chem, 262, 10, 4740-7.

Aras Z, 2009. Koyun atıklarından izole edilen brucella melitensis suşlarının random amplifiye polimorfik DNA-PCR (RAPD) yöntemi ile genetik analizi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, Moreno E, Moriyón I, Gorvel J-P, 2005. Cyclic β-1, 2-glucan is a Brucella virulence factor required for intracellular survival. Nature immunology, 6, 6, 618-25.

Aslan S, 2015. Klinik örneklerden izole edilen brucella izolatlarının epidemiyolojik özelliklerinin multi-locus variable number tandem repeat analysis ve pulsed field gel electrophoresis yöntemle, ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ YÖKSİS.

Atabey T, 2018. Bruselloza karşı endemik Brucella Abortus'tan rekombinant OMP25 proteini eldesi, YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ, YÖKSİS.

Avcıoglu Y, 2013. Attenüe Brucella melitensis (REV-1) aşısının farklı stabilizatörlerle liyofilizasyonu, KİLİS 7 ARALIK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, YÖKSİS Tez Erişim.

Aydın N, İzgür M, Diker K, Yardımcı H, Esendal Ö, Paracıkoğlu J, Akan M, 2006. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Paracıkoğlu J.(Editör). Chlamydia ve Chlamydophila İnfeksiyonları, İlke-Emek Yayınları, Ankara, 305-12.

Babiuk L, Pontarollo R, Babiuk S, Loehr B, 2003. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. Vaccine, 21, 7, 649-58.

Baloglu S, 2001. Applicability of vaccinia virus as cloning and expression vector for bacterial genes: mice immune responses to vaccinia virus expressing Brucella abortus and Listeria monocytogenes antigens, Virginia Tech.

Banai M, 2002. Control of small ruminant brucellosis by use of Brucella melitensis Rev. 1 vaccine: laboratory aspects and field observations. Vet Microbiol, 90, 1-4, 497-519.

Banai M, Mayer I, Cohen A, 1990. Isolation, identification, and characterization in Israel of Brucella melitensis biovar 1 atypical strains susceptible to dyes and penicillin, indicating the evolution of a new variant. Journal of clinical microbiology, 28, 5, 1057-9.

Barrio MB, Grilló MJ, Munoz PM, Jacques I, González D, De Miguel MJ, Marín CM, Barberán M, Letesson J-J, Gorvel J-P, 2009. Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against Brucella melitensis infection of sheep. Vaccine, 27, 11, 1741-9.

Bea J-e, 1999. Generation of baculovirus-Brucella abortus heat shock protein recombinants; mice immune responses against the recombinants, and B. abortus superoxide dismutase and L7/L12 recombinant proteins, Virginia Tech.

Belliveau B, Trevors J, 1989. Transformation of Bacillus cereus vegetative cells by electroporation. Appl. Environ. Microbiol., 55, 6, 1649-52.

Bodur H, Balaban N, Aksaray S, Yetener V, Akinci E, Çolpan A, Erbay A, 2003. Biotypes and antimicrobial susceptibilities of Brucella isolates. Scandinavian journal of infectious diseases, 35, 5, 337-8.

Boschiroli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevieille C, Liautard JP, Ramuz M, O'Callaghan D, 2002. The Brucella suis virB

operon is induced intracellularly in macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99, 3, 1544-9.
Bosseray N, 1991. Brucella melitensis Rev. 1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. Biologicals, 19, 4, 355-63.
Brade H, Opal S, Vogel S, Morrison D, 1999. Endotoxin in Health and Disease Marcel Decker. New York.
Braman J, 2010. In vitro mutagenesis protocols, Springer, p.
Bricker BJ, Halling SM, 1994. Differentiation of Brucella abortus bv. 1, 2, and 4, Brucella melitensis, Brucella ovis, and Brucella suis bv. 1 by PCR. Journal of clinical microbiology, 32, 11, 2660-6.
Brigidi P, De Rossi E, Bertarini M, Riccardi G, Matteuzzi D, 1990. Genetic transformation of intact cells of Bacillus subtilis by electroporation. FEMS microbiology letters, 67, 1-2, 135-8.
Bruce D, Bruce D, Bruce K, 1887. Note on the discovery of a microorganism in Malta fever.
Brune W, Messerle M, Koszinowski UH, 2000. Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. Trends in Genetics, 16, 6, 254-9.
Buck J, 1930. Studies of vaccination during calfhood to prevent bovine infectious abortion. J. agric. Res, 41, 667-89.
Büyükcangaz E, 2007. Sığır ve koyun atıklarında Brucella cinsi mikroorganizmaların bakteriyolojik tanısı, Uludağ Üniversitesi, YÖKSİS.
Campbell G, Adams L, Sowa B, 1994. Mechanisms of binding of Brucella abortus to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. Veterinary immunology and immunopathology, 41, 3-4, 295-306.
Caroff M, Bundle D, Perry M, Cherwonogrodzky J, Duncan J, 1984. Antigenic S-type lipopolysaccharide of Brucella abortus 1119-3. Infection and immunity, 46, 2, 384-8.
Cassataro J, Velikovsky CA, de la Barrera S, Estein SM, Bruno L, Bowden R, Pasquevich KA, Fossati CA, Giambartolomei GH, 2005. A DNA vaccine coding for the Brucella outer membrane protein 31 confers protection against B. melitensis and B. ovis infection by eliciting a specific cytotoxic response. Infection and immunity, 73, 10, 6537-46.
CDC, 2018. Annual Brucellosis in Human.
Celik O, 1937. A case of Brucella abortus. Turk Tip Cem Mecmuasi, 3, 14-6.
Celli J, de Chastellier C, Franchini D-M, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel J-P, 2003. Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. Journal of Experimental Medicine, 198, 4, 545-56.
Chalker AF, Lupas A, Ingraham K, So CY, Lunsford RD, Li T, Bryant A, Holmes DJ, Marra A, Pearson SC, 2000. Genetic characterization of gram-positive homologs of the XerCD site-specific recombinases. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 2, 2, 225-33.
Chen T, Elberg SS, 1970. Immunization against" Brucella" Infections: Immune Response of Mice, Guinea pigs, and Cynomolgus philipinensis to Live and Killed Brucella melitensis Strain Rev. I Administered by Various Methods. The Journal of infectious diseases, 489-500.
Cheng Q, Shi X, Zhang Y, 2020. Reprogramming Exosomes for Immunotherapy. In: Cell Reprogramming for Immunotherapy. Eds: Springer, p. 197-209.
Clapp B, Skyberg JA, Yang X, Thornburg T, Walters N, Pascual DW, 2011. Protective live oral brucellosis vaccines stimulate Th1 and th17 cell responses. Infection and immunity, 79, 10, 4165-74.
Cloeckaert A, Baucheron S, Vizcaino N, Zygmunt MS, 2001. Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 8, 4, 772-5.
Cloeckaert A, Grayon M, Grépinet O, 2002. Identification of Brucella melitensis vaccine strain Rev. 1 by PCR-RFLP based on a mutation in the rpsL gene. Vaccine, 20, 19-20, 2546-50.
Cloeckaert A, Jacques I, Grilló MJ, Marín CM, Grayon M, Blasco J-M, Verger J-M, 2004. Development and evaluation as vaccines in mice of Brucella melitensis Rev. 1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. Vaccine, 22, 21-22, 2827-35.
Cloeckaert A, Zygmunt MS, Dubray G, Limet JN, 1993. Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough Brucella melitensis strain B115. Microbiology, 139, 7, 1551-6.
Cloeckaert A, Zygmunt MS, Guilloteau LA, 2002. Brucella abortus vaccine strain RB51 produces low levels of M-like O-antigen. Vaccine, 20, 13-14, 1820-2.
Cole ST, Saint-Girons I, 1999. Bacterial genomes—all shapes and sizes.

Commander NJ, Spencer SA, Wren BW, MacMillan AP, 2007. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding Brucella melitensis 16M genes. Vaccine, 25, 1, 43-54.
Corbel MJ, 1997. Brucellosis: an overview. Emerging infectious diseases, 3, 2, 213.
Çelebi Ö, 2011. Kars Yöresinde Atık Yapmış İnek Sürülerinden Alınan Süt ve Vajinal Sıvap Örneklerinden Brusella Etkenlerinin Bakteriyolojik ve Moleküler Tanımlanması, Kafkas Universitesi yöksis.
Das S, Dash HR, 2015. Cloning and transformation. In: Microbial Biotechnology-A Laboratory Manual for Bacterial Systems. Eds: Springer, p. 35-72.
Davis D, Elzer P, 1999. Safety and efficacy of Brucella abortus RB51 vaccine in adult American bison. Proceedings US Animal Health Association, 103, 154-8.
De Bolle X, Crosson S, Matroule J-Y, Letesson J-J, 2015. Brucella abortus cell cycle and infection are coordinated. Trends in microbiology, 23, 12, 812-21.
Dean AS, Crump L, Greter H, Schelling E, Zinsstag J, 2012. Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency. PLoS neglected tropical diseases, 6, 10.
Doganay M, Aygen B, 2003. Human brucellosis: an overview. International journal of infectious diseases, 7, 3, 173-82.
Doğuer M, Yılmaz S, 1963. Türkiye'de Brusellosis. Etlik Veteriner Bakt Enst Dergisi, 2, 1, 1-20.
Dohmer Pisani PH, Valguarnera PE, Czibener C, Ugalde JE, 2014. Identification of a type IV secretion substrate of Brucella abortus that participates in the early stages of intracellular survival.
Ducrotoy M, Bertu W, Matope G, Cadmus S, Conde-Álvarez R, Gusi A, Welburn S, Ocholi R, Blasco J, Moriyón I, 2017. Brucellosis in Sub-Saharan Africa: Current challenges for management, diagnosis and control. Acta tropica, 165, 179-93.
Edmonds M, Cloeckaert A, Hagius S, Samartino L, Fulton W, Walker J, Enright F, Booth N, Elzer P, 2002. Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a Brucella melitensis Δomp25 deletion mutant. Research in veterinary science, 72, 3, 235-9.
Edmonds MD, 2000. Creation and Characterization of 25 kDa Outer Membrane Protein (Omp25) Deletion Mutants in Brucella Species.
Edmonds MD, Cloeckaert A, Elzer PH, 2002. Brucella species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against Brucella melitensis and Brucella ovis. Veterinary microbiology, 88, 3, 205-21.
El-Sayed A, Awad W, 2018. Brucellosis: Evolution and expected comeback. International journal of veterinary science and medicine, 6, sup1, S31-S5.
El Idrissia A, 2014. FAO works to curb the burden of brucellosis in endemic countries.
Elzer PH, Phillips RW, Kovach ME, Peterson KM, Roop R, 1994. Characterization and genetic complementation of a Brucella abortus high-temperature-requirement A (htrA) deletion mutant. Infection and immunity, 62, 10, 4135-9.
Enright F, Samartino L. Mechanisma of Abortion in Brucella abortus Infected Cattle. PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING-UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 88-.
Erganis O, 2012. Veteriner Hekimlikte Brusella Enfeksiyonları. Infovet, 108, 88-98.
Erganis O, 2013. Dünyada Brusella Eradikasyon Programları ve Ülke Modelleri. infovet, 109, 44-58.
Erganis O, (2019). Brucella Hastalığında İzlenecek Yol Haritası. Tarım İsletmeleri Genel Müdürlüğü.
Erganiş O, 2013. Hayvansal aşıların geliştirilmesinde üniversite-kamu-sanayi işbirliğinin rolü.
Erganiş O, Hadimli HH, Solmaz H, 2002. Vaccine Development from Serotypes O1, O2 and O78 of Escherichia coli against Avian Colibacillosis: Layer Chickens. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 26, 6, 1213-21.
, 2009. Eradication of Bovine, Sheep and Goats Brucellosis in the EU EU Commision p.
, 2013. Eradication programme for Bovine Brucellosis Croatia p.
Ficht TA, Pei J, Kahl-McDonagh M, 2010. In vitro mutagenesis of Brucella species. In: In Vitro Mutagenesis Protocols. Eds: Springer, p. 15-35.
Fournet-Fayard S, Joly B, Forestier C, 1995. Transformation of wild type Klebsiella pneumoniae with plasmid DNA by electroporation. Journal of microbiological methods, 24, 1, 49-54.
Garg B, Dogra RC, Sharma PK, 1999. High-efficiency transformation of Rhizobium leguminosarum by electroporation. Appl. Environ. Microbiol., 65, 6, 2802-4.
Gargani G, Lopez-Merino A, 2006. International Committee on Systematic Bacteriology; Subcommittee on the taxonomy of Brucella. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 56, 5, 1167-8.
Garin-Bastuji B, Blasco J-M, Grayon M, Verger J-M, 1998. Brucella melitensis infection in sheep: present and future.

Garin-Bastuji B, Blasco J, 2008. Caprine and ovine brucellosis (excluding Brucella ovis). Manual of Standards for diagnostic testes and vaccines, 306-8.
Gay P, Le Coq D, Steinmetz M, Berkelman T, Kado C, 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. Journal of bacteriology, 164, 2, 918-21.
Gheibi A, Khanahmad H, Kardar GA, Boshtam M, Rezaie S, Kazemi B, Khorramizadeh MR, 2019. Optimization and Comparison of Different Methods and Factors for Efficient Transformation of Brucella abortus RB51strain. Advanced Biomedical Research, 8.
Gilsdorf A, 2015. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2014. Berlin: Robert Koch-Institut, 120-6.
, 2018. Türkiye Genelinde Koyun ve Keçi Brusellozunun 2018 Yılı Aktif Survey Raporu Yayınlanmamış Kaynaktır, 24.02.2020 kişisel diyalog ile elde edilmiştir p.
Godfroid J, Cloeckaert A, Liautard J-P, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin-Bastuji B, Letesson J-J, 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. Veterinary research, 36, 3, 313-26.
Golem SB, 1949. The situation of Brucellosis in Turkey. Turk Hij Tec Biyol Dergisi, 9, 32-63.
Golovliov I, Sjöstedt A, Mokrievich A, Pavlov V, 2003. A method for allelic replacement in Francisella tularensis. FEMS microbiology letters, 222, 2, 273-80.
González-Smith A, Vemulapalli R, Andrews E, Oñate A, 2006. Evaluation of Brucella abortus DNA vaccine by expression of Cu–Zn superoxide dismutase antigen fused to IL-2. Immunobiology, 211, 1, 65-74.
Goodwin ZI, Pascual DW, 2016. Brucellosis vaccines for livestock. Veterinary immunology and immunopathology, 181, 51-8.
Gorvel JP, Moreno E, 2002. Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. Veterinary microbiology, 90, 1, 281-97.
Graham R, Michael VM, 1935. Brucellosis in swine: Traum's disease or infectious abortion. Circular (University of Illinois (Urbana-Champaign campus). Agricultural Experiment Station) no. 435.
Grannis JL, Bruch ML, 2006. The role of USDA-APHIS in livestock disease management within the USA. The Economics of Livestock Disease Insurance: Concepts, Issues and International Case Studies. Wallingford, UK: CABI Publishing, 19-28.
Grilló M-J, Blasco JM, Gorvel JP, Moriyón I, Moreno E, 2012. What have we learned from brucellosis in the mouse model? Veterinary research, 43, 1, 29.
Grilló M, Bosseray N, Blasco J, 2000. In vitro markers and biological activity in mice of seed lot strains and commercial Brucella melitensis Rev 1 and Brucella abortus B19 vaccines. Biologicals, 28, 2, 119-27.
Grilló MJ, Marín CM, Barberán M, De Miguel M, Laroucau K, Jacques I, Blasco JM, 2009. Efficacy of bp26 and bp26/omp31 B. melitensis Rev. 1 deletion mutants against Brucella ovis in rams. Vaccine, 27, 2, 187-91.
GTHB, 2012. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü (2012). Brusellanın Konjuktival Aşı ile Kontrol ve Eradikasyonu Projesi. http://www. tarim. gov. tr/Documents/Mevzuat/Genelgeler/BRUCELLA. pdf, Erişim tarihi, 26.
Gupta V, Verma D, Singh S, Vihan V, 2007. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from Brucella melitensis in goat and sheep brucellosis. Small Ruminant Research, 70, 2-3, 260-6.
Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E, von Eichel-Streiber C, López-Goñi I, Thelestam M, Arvidson S, Gorvel J-P, Moreno E, 2001. GTPases of the Rho Subfamily Are Required for Brucella abortus Internalization in Nonprofessional Phagocytes DIRECT ACTIVATION OF Cdc42. Journal of Biological Chemistry, 276, 48, 44435-43.
Hacıömeroğlu S, 2008. Konjuktival yolla uygulanan azaltılmış (reduced) doz brucella rev 1 aşı etkinliğinin incelenmesi, Uludağ Üniversitesi, YÖKSİS.
Haine V, Dozot M, Dornand J, Letesson J-J, De Bolle X, 2006. NnrA is required for full virulence and regulates several Brucella melitensis denitrification genes. Journal of bacteriology, 188, 4, 1615-9.
Halling SM, Detilleux P, Tatum F, Judge B, Mayfield J, 1991. Deletion of the BCSP31 gene of Brucella abortus by replacement. Infection and immunity, 59, 11, 3863-8.
Han S, 2006. EXPRESSION OF BRUCELLA GENES REQUIRED FOR LIPOPOLYSACCARIDE PRODUCTION UNDER THE CONTROL OF ARAC AND PTAC PROMOTERS.
Hancı İY, 2013. Sığır ve koyunlarda brucella ve şap aşılarının birlikte uygulanmasının bağışıklık düzeylerine etkisi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Hekimliği Bölümü ….

Hasanjani-Roushan MR, Kazemi S, Fallah-Rostami F, Ebrahimpour S, 2014. Brucellosis vaccines: an overview. A. General Policy, 118.
He Y, Xiang Z, 2010. Bioinformatics analysis of Brucella vaccines and vaccine targets using VIOLIN. Immunome research, 6, 1, S5.
Hedreyda CT, Lee KK, Krause DC, 1993. Transformation of Mycoplasma pneumoniae with Tn4001 by electroporation. Plasmid, 30, 2, 170-5.
Helander I, Saxen H, Salkinoja-Salonen M, Rylander R, 1982. Pulmonary toxicity of endotoxins: comparison of lipopolysaccharides from various bacterial species. Infection and immunity, 35, 2, 528-32.
Brucellosis (Brucella melitensis),Austria, 2018. Erişim. Erişim adresi, https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=27341.
Hines WD, Freeman BA, Pearson GR, 1964. Fine structure of Brucella suis spheroplasts. Journal of bacteriology, 87, 6, 1492-8.
Hines WD, Freeman BA, Pearson GR, 1964. Production and characterization of Brucella spheroplasts. Journal of bacteriology, 87, 2, 438-45.
Holo H, Nes IF, 1995. Transformation of Lactococcus by electroporation. In: Electroporation protocols for microorganisms. Eds: Springer, p. 195-9.
Türkiye'de İnsanlarda Brusellozis Vakalarının 2000-2017 yıllarına göre dağılımı, 2017. Erişim. Erişim adresi, https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/zoonotikvektorel-bruselloz/istatistik.
Hur J, Xiang Z, Feldman EL, He Y, 2011. Ontology-based Brucella vaccine literature indexing and systematic analysis of gene-vaccine association network. BMC immunology, 12, 1, 49.
Hynes MF, Quandt J, O'Connell MP, Pühler A, 1989. Direct selection for curing and deletion of Rhizobium plasmids using transposons carrying the Bacillus subtilis sacB gene. Gene, 78, 1, 111-20.
İlban A, 2016. Bruselloz tanısı konulmuş hastalardan izole edilen Brucella suşlarının PZR yöntemi ile sınıflandırılması, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
Iyisan A, Akmaz Ö, Düzgün S, Ersoy Y, Eskiizmirliler S, Güler L, Gündüz K, İşık N, İçyerioğlu A, Kalender H, 2000. Sero-epidemiology of brucellosis on cattle and sheep in Turkey. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 31, 1, 21-75.
Jain N, 2009. Role of entF Gene in Iron Acquisition by Brucella abortus 2308, Virginia Tech.
Kahl-McDonagh M, Ficht T, 2006. Evaluation of protection afforded by Brucella abortus and Brucella melitensis unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice. Infection and immunity, 74, 7, 4048-57.
Kahl MM, 2006. Evaluation of unmarked deletion mutants as improved Brucella vaccine strains in the mouse and goat models, Texas A&M University.
Kaniga K, Delor I, Cornelis GR, 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of Yersinia enterocolitica. Gene, 109, 1, 137-41.
Karagül MS, 2016. Brusella türlerinin izolasyonunda kullanılan dört farklı besiyerinin izolasyon sensitivitelerinin karşılaştırılması ve referans suşların saptanabilirliğinin belirlenmesi, İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

YÖKSİS.
Karagül SM, 2017. Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü ve 115 Yıllık Tarihi. Veteriner Hekimler Derneği Bülteni 14, 39-48.
Keriel A, Botella E, Estrach S, Bragagnolo G, Vergunst AC, Feral CC, O'Callaghan D, 2014. Brucella intracellular life relies on the transmembrane protein CD98 heavy chain. The Journal of infectious diseases, 211, 11, 1769-78.
Koehler TM, Dai Z, Kaufman-Yarbray M, 1994. Regulation of the Bacillus anthracis protective antigen gene: CO2 and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters. Journal of bacteriology, 176, 3, 586-95.
Kojouri GA, Gholami M, 2009. Post vaccination follow-up of Brucella melitensis in blood stream of sheep by PCR assay. Comparative clinical pathology, 18, 4, 439-42.
Kose S, Smits HL, Abdoel TH, Ozbel Y, 2006. Prevalence of Brucella antibodies in rural and suburban communities in three provinces of Turkey: need for improved diagnosis and prevention. Journal of Infection, 53, 5, 308-14.
Koyuncu İ, 2013. *Brucella melitensis* Rev1 yüzey membran proteinin klonlanması, ekspresyonu, saflaştırılması ve diagnostik etkinliğinin tespit edilmesi.
Kraemer GR, Iandolo JJ, 1990. High-frequency transformation ofStaphylococcus aureus by electroporation. Current Microbiology, 21, 6, 373-6.

Kurar E, Splitter GA, 1997. Nucleic acid vaccination of Brucella abortus ribosomal L7L12 gene elicits immune response. Vaccine, 15, 17, 1851-7.
Lai F, Schurig GG, Boyle SM, 1990. Electroporation of a suicide plasmid bearing a transposon into Brucella abortus. Microbial pathogenesis, 9, 5, 363-8.
Lalsiamthara J, Gogia N, Goswami TK, Singh R, Chaudhuri P, 2015. Intermediate rough Brucella abortus S19Δper mutant is DIVA enable, safe to pregnant guinea pigs and confers protection to mice. Vaccine, 33, 22, 2577-83.
Lalsiamthara J, Lee JH, 2017. Brucella lipopolysaccharide reinforced Salmonella delivering Brucella immunogens protects mice against virulent challenge. Veterinary microbiology, 205, 84-91.
Leclercq SY, Oliveira SC, 2003. Protective immunity induced by DNA-library immunization against an intracellular bacterial infection. Journal of drug targeting, 11, 8-10, 531-8.
Li X, Jin H, Wu Z, Rayner S, Wang B, 2008. A continuous process to extract plasmid DNA based on alkaline lysis. Nature protocols, 3, 2, 176.
Li Z-Q, Shi J-X, Fu W-D, Zhang Y, Zhang J, Wang Z, Li T-S, Chen C-F, Guo F, Zhang H, 2015. A Brucella melitensis M5-90 wboA deletion strain is attenuated and enhances vaccine efficacy. Molecular immunology, 66, 2, 276-83.
Li Z, Wang S, Zhang J, Yang G, Yuan B, Huang J, Han J, Xi L, Xiao Y, Chen C, 2017. Brucella abortus 2308ΔNodVΔNodW double-mutant is highly attenuated and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice. Microbial pathogenesis, 106, 30-9.
Liu MA, 1995. Overview of DNA vaccines. Annals of the New York Academy of Sciences, 772, 1, 15-20.
Lubroth J, Rweyemamu M, Viljoen G, Diallo A, Dungu B, Amanfu W, 2007. Veterinary vaccines and their use in developing countries. Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties, 26, 1, 179.
Maas S, 1999. Efficient and rapid procedure for blue-white screening of recombinant bacterial clones. BioTechniques, 27, 6, 1126-8.
Mailybayeva A, Yespembetov B, Ryskeldinova S, Zinina N, Sansyzbay A, Renukaradhya GJ, Petrovsky N, Tabynov K, 2017. Improved influenza viral vector based Brucella abortus vaccine induces robust B and T-cell responses and protection against Brucella melitensis infection in pregnant sheep and goats. PloS one, 12, 10, e0186484.
Marín C, Moreno E, Moriyón I, Díaz R, Blasco J, 1999. Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis of sheep brucellosis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 6, 2, 269-72.
Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D, 2013. Clinical veterinary microbiology, Elsevier Health Sciences, p.
Mayer S, 1920. Gattung Brucella. Mikrobiologie u. Seuchenlehre İ. İnfect. Dis, 27, 173.
McQuiston JR, Schurig GG, Sriranganathan N, Boyle SM, 1995. Transformation of Brucella species with suicide and broad host-range plasmids. In: Electroporation Protocols for Microorganisms. Eds: Springer, p. 143-8.
Mercante JW, 2002. In-vitro gene disruption using Tn7-based transposition: evaluation of its utility and efficiency in generating a Brucella virB1 knockout.
Miller VL, Mekalanos JJ, 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in Vibrio cholerae requires toxR. Journal of bacteriology, 170, 6, 2575-83.
Mızraklıdağ AS, 2017. Brucella ve alfa-proteobacterıa grubuna ait bazı bakteri cinsleri arasındaki serolojik çapraz reaksiyonların brusellozun serolojik tanısında potansiyel uygulanabirliği yönünden araştırılması.
Montaraz J, Winter A, 1986. Comparison of living and nonliving vaccines for Brucella abortus in BALB/c mice. Infection and immunity, 53, 2, 245-51.
Brucella melitensis Rev.1 biovarlar arasında taksonomik yakınlık, 2018. Erişim. Erişim adresi, www.ncbi.nlm.nih.gov.
Nguyen AW, Le K, Maynard JA, 2020. Engineering Antibodies on the Surface of CHO Cells. In: Genotype Phenotype Coupling. Eds: Springer, p. 397-422.
O'Callaghan D, Charbit A, 1990. High efficiency transformation of Salmonella typhimurium and Salmonella typhi by electroporation. Molecular and General Genetics MGG, 223, 1, 156-8.
OIE, 2009. 2.4. 3. Bovine Brucellosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines.
Brucella outbreak in Turkey 2012-2019 2019. Erişim. Erişim adresi, https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail.

Brusellosis Outbreak in Asia 2019. Erişim. Erişim adresi, https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_terrestrial=182&species_t=0&disease_id_aquatic=-999&species_a=0&sta_method=semesterly&selected_start_year=2018&selected_report_period=1&selected_start_month=1&date_submit=OK.

Olsen S, Boyle S, Schurig G, Sriranganathan N, 2009. Immune responses and protection against experimental challenge after vaccination of bison with Brucella abortus strain RB51 or RB51 overexpressing superoxide dismutase and glycosyltransferase genes. Clin. Vaccine Immunol., 16, 4, 535-40.

Ortiz-Martín I, Macho AP, Lambersten L, Ramos C, Beuzón CR, 2006. Suicide vectors for antibiotic marker exchange and rapid generation of multiple knockout mutants by allelic exchange in Gram-negative bacteria. Journal of microbiological methods, 67, 3, 395-407.

Oryaşın E, 2018. Brucella melitensis Dış Membran Protein Geninin Klonlanması, Adnan Menderes Üniversitesi.

Parent MA, 2003. Brucella abortus mutants and the immune response: A study in vaccine development.

Park SF, Stewart GS, 1990. High-efficiency transformation of Listeria monocytogenes by electroporation of penicillin-treated cells. Gene, 94, 1, 129-32.

Pei J, Turse JE, Wu Q, Ficht TA, 2006. Brucella abortus rough mutants induce macrophage oncosis that requires bacterial protein synthesis and direct interaction with the macrophage. Infection and immunity, 74, 5, 2667-75.

Pelicic V, Jackson M, Reyrat J-M, Jacobs WR, Gicquel B, Guilhot C, 1997. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in Mycobacterium tuberculosis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94, 20, 10955-60.

Perry QL, 2007. Brucella melitensis: the evaluation of a putative hemagglutinin gene's effect on virulence in the caprine model.

Phillips-Jones MK, 1990. Plasmid transformation of Clostridium perfringens by electroporation methods. FEMS microbiology letters, 66, 1-3, 221-6.

Phillips R, Elzer P, Robertson G, Hagius S, Walker J, Fatemi M, Enright F, Roop R, 1997. A Brucella melitensis high-temperature-requirement A (htrA) deletion mutant is attenuated in goats and protects against abortion. Research in veterinary science, 63, 2, 165-7.

Pishva E, Salehi M, 2008. First report of isolation of Brucella melitensis, vaccine strain Rev. 1 as a source of cattle infection in Iran. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran, 19, 1, 19-23.

Potter H, Heller R, 2018. Transfection by electroporation. Current protocols in molecular biology, 121, 1, 9.3. 1-9.3. 13.

Quandt J, Hynes MF, 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. Gene, 127, 1, 15-21.

Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, FitzPatrick E, 2011. Veterinary microbiology and microbial disease, John Wiley & Sons, p.

Ragan V, Vroegindewey G, Babcock S, 2013. International standards for brucellosis prevention and management. Rev Sci Tech, 32, 1, 189-98.

Ragan VE, 2002. The animal and plant health inspection service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. Veterinary microbiology, 90, 1-4, 11-8.

Rajashekara G, Glover DA, Krepps M, Splitter GA, 2005. Temporal analysis of pathogenic events in virulent and avirulent Brucella melitensis infections. Cellular microbiology, 7, 10, 1459-73.

Reeves A, 2017. In vitro mutagenesis, Springer, p.

Ribeiro LA, Azevedo V, Le Loir Y, Oliveira SC, Dieye Y, Piard J-C, Gruss A, Langella P, 2002. Production and targeting of the Brucella abortus antigen L7/L12 in Lactococcus lactis: a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. Applied and Environmental Microbiology, 68, 2, 910-6.

Robinson A, 2003. Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance, FAO Rome, Italy, p.

Robinson A, Production A, 2003. Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance, FAO Rome, Italy, p.

Rychlik W, 2007. OLIGO 7 primer analysis software. In: PCR primer design. Eds: Springer, p. 35-59.

Salmon-Divon M, Yeheskel A, Kornspan D, 2018. Genomic analysis of the original Elberg Brucella melitensis Rev. 1 vaccine strain reveals insights into virulence attenuation. Virulence, 9, 1, 1436-48.

Sangari FJ, García-Lobo JM, Agüero J, 1994. The Brucella abortus vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. FEMS microbiology letters, 121, 3, 337-42.
Savaşan S, 2013. Sığır ve koyun abortlarından brucella spp. izolasyonunda farklı selektif besiyerlerinin karşılaştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
Sayan M, Yumuk Z, Bilenoglu O, Erdenlig S, Willke A, 2009. Genotyping of Brucella melitensis by rpoB gene analysis and re-evaluation of conventional serotyping method. Jpn J Infect Dis, 62, 2, 160-3.
Saytekin AM, 2017. Ruminat Atıklarında Brusella Türlerinin Multipleks PCR ve Konvensiyonel Yöntemler ile Tanısı Yöntemlerin Birbirleri ile Karşılaştırılması, İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ, YÖKSİS.
Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckaert A, Maquart M, 2010. Brucella inopinata sp. nov., isolated from a breast implant infection. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 60, 4, 801-8.
Scholz HC, Revilla-Fernández S, Al Dahouk S, Hammerl JA, Zygmunt MS, Cloeckaert A, Koylass M, Whatmore AM, Blom J, Vergnaud G, 2016. Brucella vulpis sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (Vulpes vulpes). International journal of systematic and evolutionary microbiology, 66, 5, 2090-8.
Schurig GG, Roop II RM, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, Sriranganathan N, 1991. Biological properties of RB51; a stable rough strain of Brucella abortus. Veterinary microbiology, 28, 2, 171-88.
Scupham AJ, Triplett EW, 1997. Isolation and characterization of the UDP-glucose 4′-epimerase-encoding gene, galE, from Brucella abortus 2308. Gene, 202, 1-2, 53-9.
Selçuk K, 2006. Bruselloz ve tedavi sorunu. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection), 20, 3, 227-30.
Serdar G, 2017. Brucella abortus s-19 konjuktival aşılı sığırlarda hücresel ve humoral immun yanıt takibine yönelik prototipler geliştirilmesi ve geliştirilecek bu prototipler ile immun yanıt takibi, ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ, YÖKSİS Tez Erişim.
Sheng Y, Mancino V, Birren B, 1995. Transformation of Escherichia coli with large DNA molecules by electroporation. Nucleic acids research, 23, 11, 1990-6.
Sherwood AL, 2003. Virtual elimination of false positives in blue-white colony screening. BioTechniques, 34, 3, 644-7.
Siadat SD, Salmani AS, Aghasadeghi MR, 2012. Brucellosis vaccines: an overview. Zoonosis. Croatia: Intech, 143-66.
Simms BT, Muth OH, 1934. The establishment and maintenance of herds of cattle free from Bang's disease (infectious abortion).
Smith LD, Heffron F, 1987. Transposon Tn5 mutagenesis of Brucella abortus. Infection and immunity, 55, 11, 2774-6.
Sola- Landa A, Pizarro- Cerdá J, Grilló MJ, Moreno E, Moriyón I, Blasco JM, Gorvel JP, López- Goñi I, 1998. A two- component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in Brucella abortus and controls cell invasion and virulence. Molecular microbiology, 29, 1, 125-38.
Soler-Lloréns P, Gil-Ramírez Y, Zabalza-Baranguá A, Iriarte M, Conde-Álvarez R, Zúñiga-Ripa A, San Román B, Zygmunt MS, Vizcaíno N, Cloeckaert A, 2014. Mutants in the lipopolysaccharide of Brucella ovis are attenuated and protect against B. ovis infection in mice. Veterinary research, 45, 1, 72.
Spink WW, Hall III JW, Finstad J, Mallet E, 1962. Immunization with viable Brucella organisms: results of a safety test in humans. Bulletin of the World Health Organization, 26, 3, 409.
Stanley S, 2013. The Eradication of Bovine Brucellosis in the European Union with an Emphasis on Ireland.
Stevens MG, Hennager SG, Olsen SC, Cheville NF, 1994. Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with Brucella abortus 19 or RB51. Journal of Clinical microbiology, 32, 4, 1065-6.
Sturgill DM, 2003. Comparative genome analysis of three Brucella spp. and a data model for automated multiple genome comparison, Virginia Tech.
Tatum FM, Detilleux P, Sacks J, Halling S, 1992. Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of Brucella abortus: analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice. Infection and immunity, 60, 7, 2863-9.
Team E, 2013. ECDC publishes the annual epidemiological report 2012. Eurosurveillance, 18, 10, 20418.

Tibor A, Decelle B, Letesson J, 1999. Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of Brucella spp. are lipoproteins. Infection and immunity, 67, 9, 4960-2.
Tibor A, Jacques I, Guilloteau L, Verger J-M, Grayon M, Wansard V, Letesson J-J, 1998. Effect of P39 Gene Deletion in LiveBrucella Vaccine Strains on Residual Virulence and Protective Activity in Mice. Infection and immunity, 66, 11, 5561-4.
, 2009. Bruselloz ile Mücadele Yönetmeliği p.
TOB, (2019). Brusellanın Konjuktival Aşı İle Kontrol ve Eradikasyonu Genelgesi. 71037622-325.01-E.1842426. Resmi Gazete Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. **2019-6**.
HAYVAN HASTALIKLARI İLE MÜCADELE VE HAYVAN HAREKETLERİ KONTROLÜ PROGRAMI, 2019. Erişim. Erişim adresi, https://samsun.tarimorman.gov.tr/Belgeler/2019/2019_Hayvan_Hastaliklari_ile_Mucadele_EKLER.pdf.
Toth TE, Cobb JA, Boyle SM, Roop RM, Schurig GG, 1995. Selective humoral immune response of BALB/c mice to Brucella abortus proteins expressed by vaccinia virus recombinants. Veterinary microbiology, 45, 2-3, 171-83.
Turse JE, 2006. Concerning Brucella LPS: genetic analysis and role in host-agent interaction, Texas A&M University.
TVHB, 2017. 25 Kuruşla Hayvancılığımız Kurtulur mu?
Vassallo DJ, 1992. The corps disease: brucellosis and its historical association with the Royal Army Medical Corps. Journal of the royal army medical corps, 138, 3, 140.
Velasco J, Bengoechea JA, Brandenburg K, Lindner B, Seydel U, González D, Zähringer U, Moreno E, Moriyón I, 2000. Brucella abortus and its closest phylogenetic relative, Ochrobactrum spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. Infection and immunity, 68, 6, 3210-8.
Wang Z, Niu JR, Wang XL, Wu TL, Cheng J, Lu L, Wu QM, 2014. Evaluation of a Brucella melitensis mutant deficient in O-polysaccharide export system ATP-binding protein as a rough vaccine candidate. Microbes and infection, 16, 8, 633-9.
Wassenaar TM, Bleumink- Pluym N, Van der Zeijst B, 1991. Inactivation of Campylobacter jejuni flagellin genes by homologous recombination demonstrates that flaA but not flaB is required for invasion. The EMBO journal, 10, 8, 2055-61.
Whatmore AM, Davison N, Cloeckaert A, Al Dahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, Perrett LL, Koylass MS, Vergnaud G, Quance C, 2014. Brucella papionis sp. nov., isolated from baboons (Papio spp.). International journal of systematic and evolutionary microbiology, 64, Pt 12, 4120.
Williams, McKusick, Victor, 1954. Bernhard Bang: Physician, Veterinarian, Scientist (1848-1932). Bulletin of the History of Medicine, 28, 60.
Wu Q, Pei J, Turse C, Ficht TA, 2006. Mariner mutagenesis of Brucella melitensis reveals genes with previously uncharacterized roles in virulence and survival. BMC microbiology, 6, 1, 102.
Wyatt H, 2016. Lessons from the history of brucellosis.
Wyatt HV, 2005. How Themistocles Zammit found Malta Fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. Journal of the Royal Society of Medicine, 98, 10, 451-4.
Xavier M, Paixão T, Poester F, Lage A, Santos R, 2009. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with Brucella abortus. Journal of comparative pathology, 140, 2, 149-57.
Xinghong Y, Todd B, Nancy W, Pascual DW, 2006. Deletion of znuA virulence factor attenuates Brucella abortus and confers protection against wild-type challenge. Infection and immunity, 74, 7, 3874-9.
Yang X, Becker T, Walters N, Pascual DW, 2006. Deletion of znuA virulence factor attenuates Brucella abortus and confers protection against wild-type challenge. Infection and immunity, 74, 7, 3874-9.
Yang X, Hudson M, Walters N, Bargatze RF, Pascual DW, 2005. Selection of protective epitopes for Brucella melitensis by DNA vaccination. Infection and immunity, 73, 11, 7297-303.
Yang X, Skyberg JA, Cao L, Clapp B, Thornburg T, Pascual DW, 2013. Progress in Brucella vaccine development. Frontiers in biology, 8, 1, 60-77.
Yiğit Ö, 2016. Konjunktival brusella aşısının koyunlarda bazı biyokimyasal parametre düzeylerine etkisi, ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ, YÖKSİS.
Young D, 1995. Florence Nightingale's fever. BMJ, 311, 7021, 1697-700.
Yumuk Z, O'Callaghan D, 2012. Brucellosis in Turkey—an overview. International Journal of Infectious Diseases, 16, 4, e228-e35.
Zammit T, Scicluna GC, 1905. Intermittent fever in Malta. British medical journal, 1, 2309, 711.

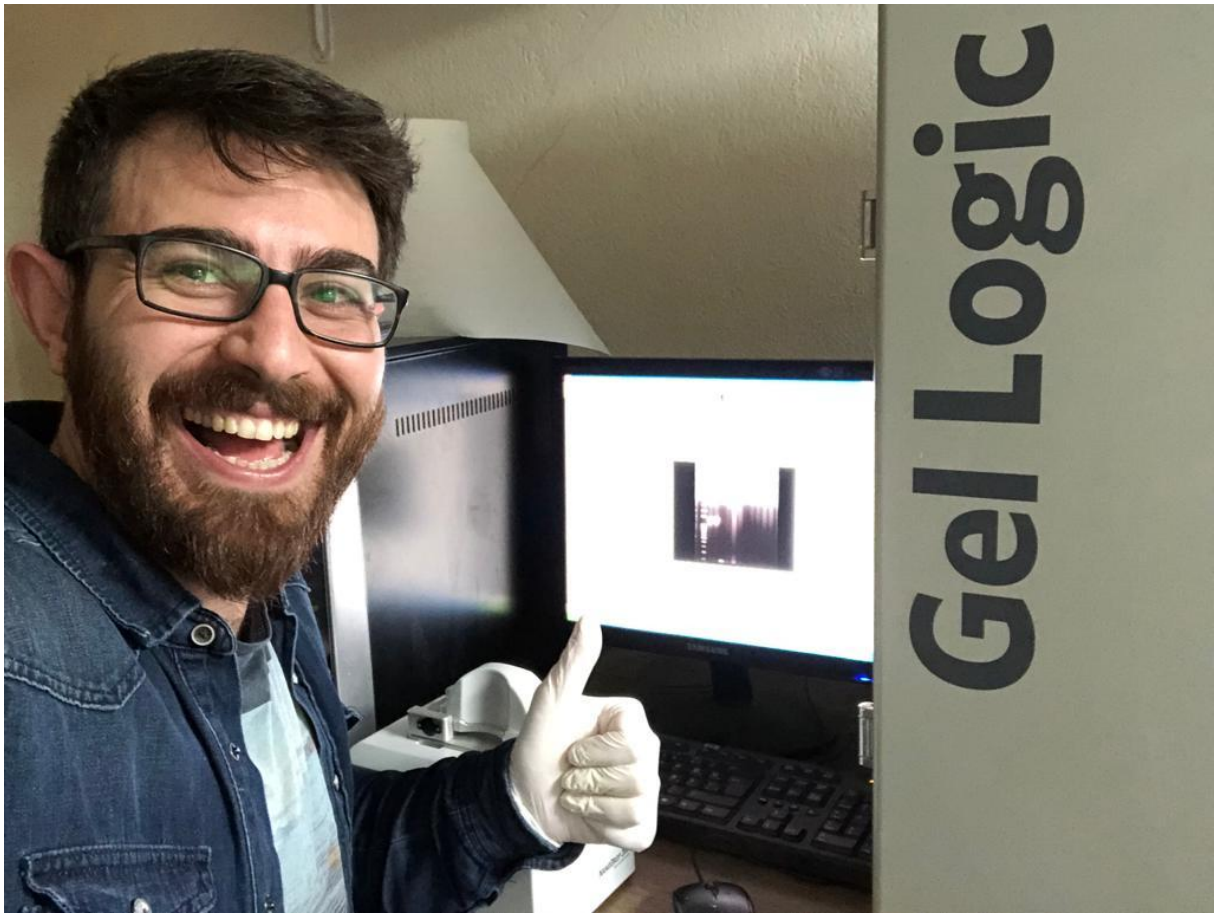
Zhang J, Guo F, Chen C, Li Z, Zhang H, Wang Y, Zhang K, Du G, Li Y, Wang J, 2013. Brucella melitensis 16 M Δhfq attenuation confers protection against wild- type challenge in BALB/c mice. Microbiology and immunology, 57, 7, 502-10.

Zhang J, Yin S, Guo F, Meng R, Chen C, Zhang H, Li Z, Fu Q, Shi H, Hu S, 2014. A potent Brucella abortus 2308 Δery live vaccine allows for the differentiation between natural and vaccinated infection. Journal of Microbiology, 52, 8, 681-8.

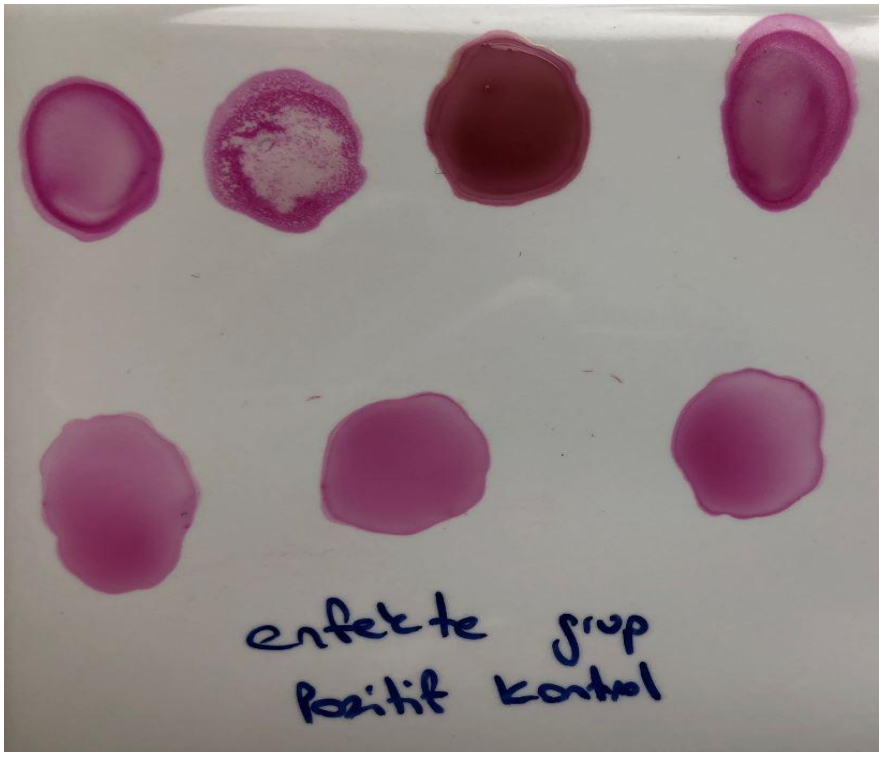
Zhang J, Yin S, Yi D, Zhang H, Li Z, Guo F, Chen C, Fang W, Wang J, 2017. The Brucella melitensis M5-90ΔmanB live vaccine candidate is safer than M5-90 and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice. Microbial pathogenesis, 112, 148-55.

Zhou M-Y, Gomez-Sanchez CE, 2000. Universal TA cloning. Current issues in molecular biology, 2, 1-8.

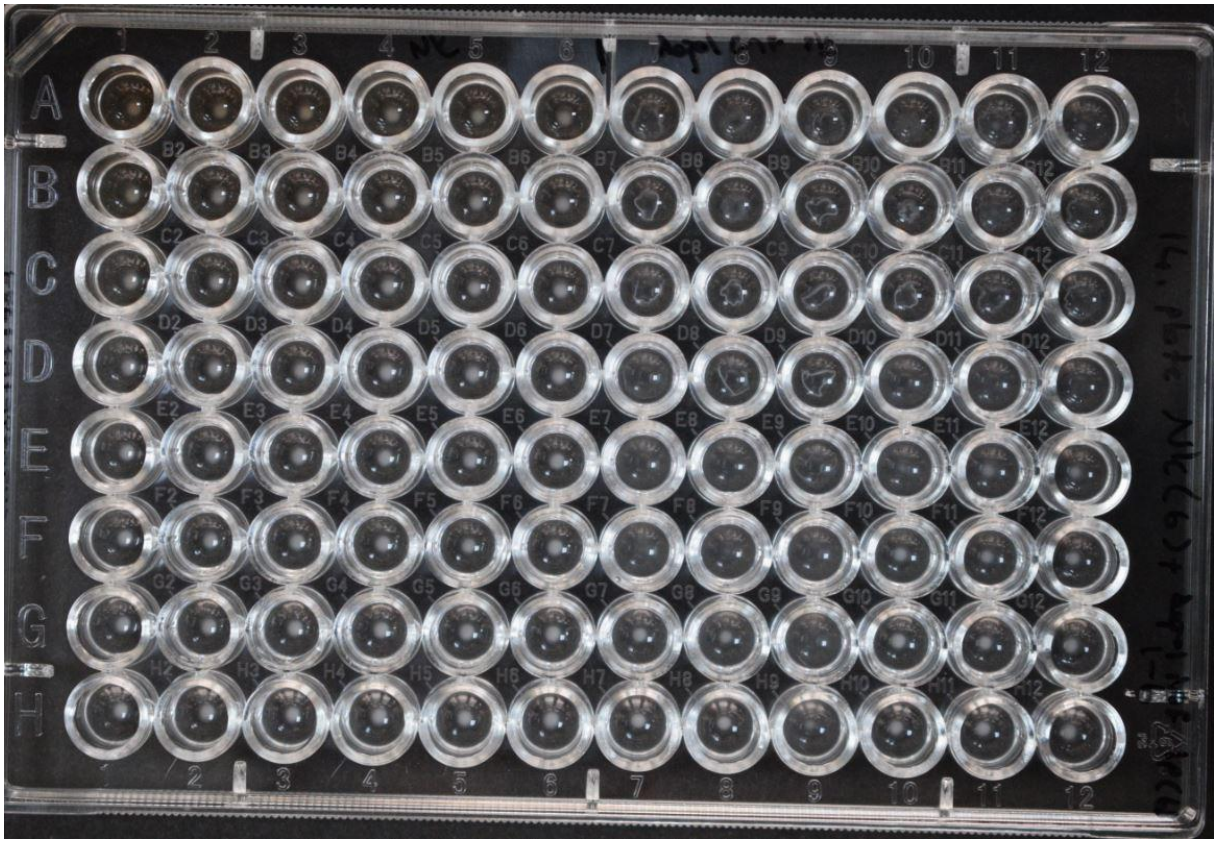
EK-B: Tez Sürecindeki Diğer Resimler



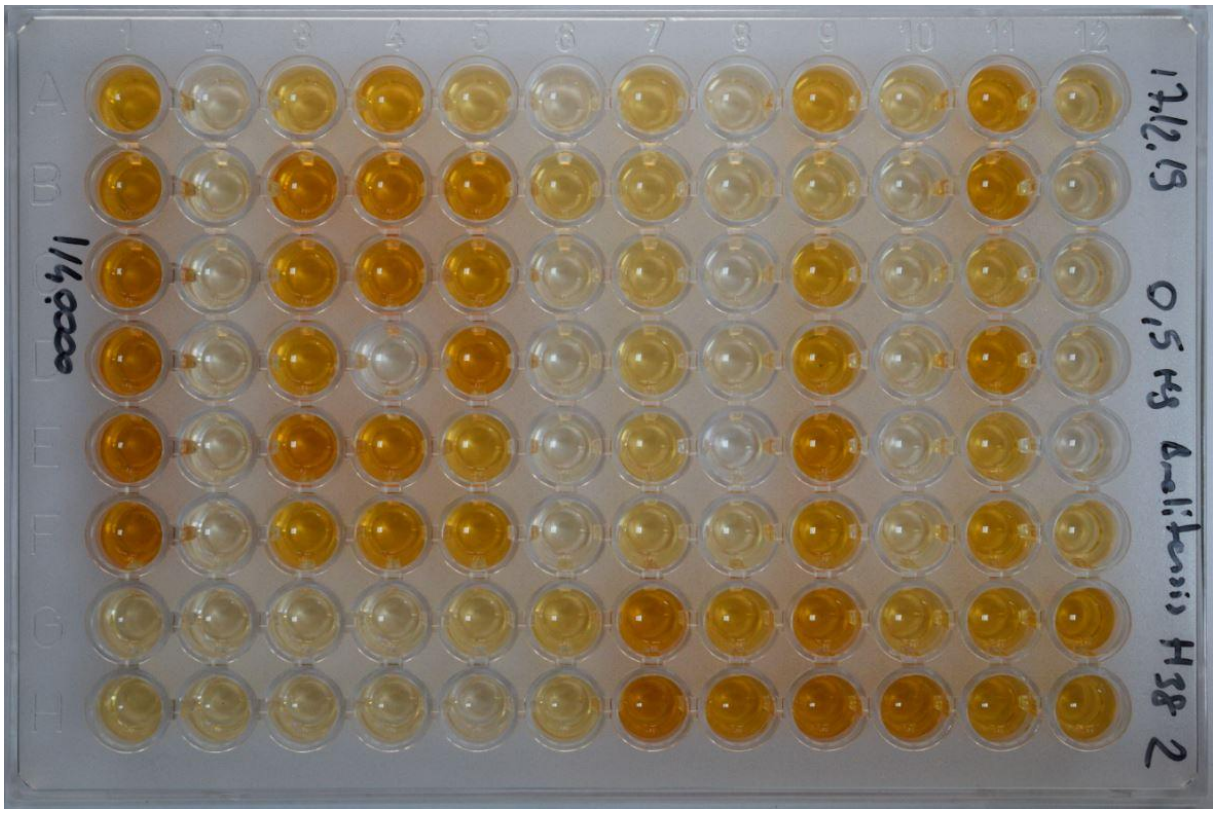
Şekil.7.1. İlk Mutant koloni PZR ile doğrulanma anı



Şekil.7.2. Enfekte grup Rose bengal sonuçları



Şekil.7.3. Negatif ve Pozitif Kontrol SAT sonuçları



Şekil.7.4.Tüm hücre ELİSA görüntüsü;1- doğal enfeksiyon, 2- Negatif kontrol, 3-Ticari ,1 4-Ticari 2, 5-Ticari 3, 6-İnaktif H38,7- Subunit Omp19, 8-Mutant17, 9-Mutant 19, 10-Mutant 43, 11-Mutant 44-12, 12- Mutant 45, G-1-6 Mutant 44-10, H-1-6 Mutant 46, G-7-12 doğal enfeksiyon deri altı uygulaması



Şekil.7.5. Omp19 ELİSA görüntüsü;1- doğal enfeksiyon, 2- Negatif kontrol, 3-Ticari ,1 4-Ticari 2, 5-Ticari 3, 6-İnaktif H38,7- Subunit Omp19, 8-Mutant17, 9-Mutant 19, 10-Mutant 43, 11-Mutant 44-12, 12- Mutant 45, G-1-6 Mutant 44-10, H-1-6 Mutant 46, G-7-12 doğal enfeksiyon deri altı uygulaması

EK-C: Brucella ve Gen Delesyonu Tez/Yayın Listeleri

Çizelge EK-C.1. Türkiye'de Brusella ile üzerine yapılmış tez çalışmaları

Tez Çalışmasının İsmi	Yazar ve Yılı
Sığır ve koyun atıklarında Brucella cinsi mikroorganizmaların bakteriyolojik tanısı	(Büyükcangaz 2007)
Konjuktival yolla uygulanan azaltılmış (reduced) doz Brucella rev 1 aşı etkinliğinin incelenmesi	(Hacıömeroğlu 2008)
Koyun atıklarından izole edilen *Brucella melitensis* suşlarının random amplifiye polimorfik DNA-PCR (RAPD) yöntemi ile genetik analizi	(Aras 2009)
Kars Yöresinde Atık Yapmış İnek Sürülerinden Alınan Süt ve Vajinal Sıvap Örneklerinden Brusella Etkenlerinin Bakteriyolojik ve Moleküler Tanımlanması	(Çelebi 2011)
Sığır ve koyunlarda Brucella ve şap aşılarının birlikte uygulanmasının bağışıklık düzeylerine etkisi	(Hancı 2013)
Sığır ve koyun abortlarından Brucella spp. izolasyonunda farklı selektif besiyerlerinin karşılaştırılması	(Savaşan 2013)
Brucella melitensis Rev1 yüzey membran proteinin klonlanması, ekspresyonu, saflaştırılması ve diagnostik etkinliğinin tespit edilmesi	(Koyuncu 2013)
Attenüe *Brucella melitensis* (REV-1) aşısının farklı stabilizatörlerle liyofilizasyonu	(Avcıoglu 2013)
Klinik örneklerden izole edilen Brucella izolatlarının epidemiyolojik özelliklerinin multi-locus variable number tandem repeat analysis ve pulsed field gel electrophoresis yöntemle	(Aslan 2015)
Konjunktival Brusella aşısının koyunlarda bazı biyokimyasal parametre düzeylerine etkisi	(Yiğit 2016)
Bruselloz tanısı konulmuş hastalardan izole edilen Brucella suşlarının PZR yöntemi ile sınıflandırılması	(İlban 2016)
Brusella türlerinin izolasyonunda kullanılan dört farklı besiyerinin izolasyon sensitivitelerinin karşılaştırılması ve referans suşların saptanabilirliğinin belirlenmesi	(Karagül 2016)
Brucella ve alfa-proteobacterıa grubuna ait bazı bakteri cinsleri arasındaki serolojik çapraz reaksiyonların brusellozun serolojik tanısında potansiyel uygulanabirliği yönünden araştırılmas	(Mızraklıdağ 2017)
Ruminant Atıklarında Brusella Türlerinin Multipleks PCR ve Konvansiyonel Yöntemler ile tanısı, Yöntemlerin Birbirleri ile Karşılaştırılması	(Saytekin 2017)
Brucella abortus s-19 konjuktival aşılı sığırlarda hücresel ve humoral immun yanıt takibine yönelik prototipler geliştirilmesi ve geliştirilecek bu prototipler ile immun yanıt takibi	(Serdar 2017)
Brucella melitensis Dış Membran Protein Geninin Klonlanması	(Oryaşın 2018)
Bruselloza karşı endemik *Brucella abortus*'tan rekombinant OMP25 proteini eldesi	(Atabey 2018)

Çizelge EK-C.2. Dünya Brusella gen delesyonu üzerine yapılmış tezler

Tez Çalışmasının İsmi	**Yazar ve Yılı**
Generation of Baculovirus-Brucella abortus Heat Shock Protein Recombinants; Mice Immune Responses Against the Recombinants, and B. abortus Superoxide Dismutase and L7/L12 Recombinant Proteins	(Bea 1999)
Creation and characterization of 25 kDa outer membrane protein (Omp25) deletion mutants in Brucella species	(Edmonds 2000)
Applicability of vaccinia virus as cloning and expression vector for bacterial genes: mice immune responses to vaccinia virus expressing Brucella abortus and Listeria monocytogenes antigens	(Baloglu 2001)
In-Vitro Gene Disruption Using Tn7-Based Transposition: Evaluation of Its Utility and Efficiency in Generating a Brucella VirB1 Knockout	(Mercante 2002)
Comparative genome analysis of three Brucella spp. and a data model for automated multiple genome comparison	(Sturgill 2003)
Brucella abortus mutants and the immune response: A study in vaccine development	(Parent 2003)
Expression of Bacillus Anthracis Protective Antigen in Vaccine Strain Brucella Abortus RB51	(Han 2006)
Evaluation of unmarked deletion mutants as improved Brucella vaccine strains in the mouse and goat models	(Kahl 2006)
Concerning Brucella LPS: genetic analysis and role in host- agent interaction	(Turse 2006)
Expression of Brucella Genes Required for Lipopolysaccaride production under the control of arac and ptac promoters	(Han 2006)
Brucella melitensis: The Evaluation of a Putative Hemagglutinin Gene's Effect on Virulence in the Caprine Model	(Perry 2007)
Role of entF Gene in Iron Acquisition by Brucella abortus 2308	(Jain 2009)

Çizelge EK-C.3. Brucella D.I.V.A konseptine yönelik gen silinmesi çalışmaları

Yayın	Yayın Yılı
Development and evaluation as vaccines in mice of Brucella melitensis Rev. 1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis	(Tatum ve ark 1992)
A DNA vaccine coding for the Brucella outer membrane protein 31 confers protection against B. melitensis and B. ovis infection by eliciting a specific cytotoxic response.	(Cloeckaert ve ark 2004)
Brucella abortus ΔrpoE1 confers protective immunity against wild type challenge in a mouse model of brucellosis	(Cassataro ve ark 2005)
Vaccination with a ΔnorD ΔznuA Brucella abortus mutant confers potent protection against virulent challenge	(Willett ve ark 2016)
The 16MΔvjbR as an ideal live attenuated vaccine candidate for differentiation between Brucella vaccination and infection	(Yang ve ark 2016)
A Brucella melitensis M5-90 wboA deletion strain is attenuated andenhances vaccine efficacy	(Wang ve ark 2011)
A Potent *Brucella abortus* 2308 Δ*ery* Live Vaccine Allows for the Differentiation between Natural and Vaccinated Infection	(Li ve ark 2015)
Brucella abortus 2308ΔNodVΔNodW double-mutant is highly attenuated and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice	(Zhang ve ark 2014)
Brucella melitensis 16MΔhfq attenuation confers protection against wild- type challenge in BALB/c mice	(Li ve ark 2017)
Effect of P39 Gene Deletion in Live Brucella Vaccine Strains on Residual Virulence and Protective Activity in Mice	(Zhang ve ark 2013)
Evaluation of a Brucella melitensis mutant deficient in O-polysaccharide export system ATP-binding protein as a rough vaccine candidate	(Tibor ve ark 1998)
The Brucella melitensis M5-90ΔmanB live vaccine candidate is safer than M5-90 and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice	(Wang ve ark 2014)

8.ÖZGEÇMİŞ

Yenipazar Aydın'da 1990 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Aydın'da tamamladı. 2008 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne yerleştirildi, 2013 yılında mezun oldu. 2014 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.