



**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**Corynebacterium pseudotuberculosis'e KARŞI GELİŞTİRİLECEK
AŞILARDA BAKTERİN VE/VEYA TOKSOİD FORMULASYONLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

MÜZEYYEN DEMİR

VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Şanlıurfa
2024**



**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ**

DOKTORA TEZİ

***Corynebacterium pseudotuberculosis*'e KARŞI GELİŞTİRİLECEK
AŞILARDA BAKTERİN VE/VEYA TOKSOİD FORMULASYONLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

MÜZEYYEN DEMİR

**VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Tez Danışmanı: Prof. Dr. SEVİL ERDENLİĞ GÜRBİLEK**

**Şanlıurfa
2024**

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iv
SİMGELER	v
KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	2
2.1. Tanım	2
2.2. Tarihçe	3
2.3. Etiyoloji	4
2.4. Virülens Faktörleri	5
2.4.1. PLD Enzimi	6
2.4.2. Serin Proteaz	8
2.4.3. Mikolik Asit	8
2.4.4. Toksik Hücre Duvarı	8
2.5. Epidemiyoloji	8
2.6. Patogenez	10
2.7. Teşhis	11
2.8. Koruma ve Tedavi	13
2.9. Hayvan Deneyi	18
2.9.1. Zararsızlık Testi	18
2.9.2. Toksisite Testi	18
2.10. Rekombinant PLD Etkinliğine Yönelik Yapılan Aşı Çalışmaları	19
2.11. Adjuvant Kullanımı	20
2.11.1. Adjuvantın Genel Özellikleri	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Gereç	23
3.1.1. Hayvan Numuneleri	23
3.1.2. Standart Suş	23
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri, Solusyonlar ve Ayıraçlar	23
3.1.3.1. Kanlı Agar (Sigma, 70133)	23
3.1.3.2. Brain Heart Infusion Agar (Sigma, 70138)	24
3.1.3.3. Brain Heart Infusion Broth (Sigma, 53286)	24
3.1.3.4. Karbonat-Bikarbonat Buffer (Antijen Kaplama Solüsyonu)	25
3.1.3.5. PBS (Phosphate Buffered Saline)	25
3.1.3.6. Yıkama Solüsyonu	26
3.1.3.7. Bloklama Solüsyonu	26
3.1.3.8. Test Dilüenti	26
3.1.3.9. Konjugat	26
3.1.3.10. Substrat	26
3.1.3.11. Durdurma Solüsyonu	26
3.1.3.12. Oksidaz Ayırıcı (Bioanalyse- STR00150)	27
3.1.3.13. Katalaz Testi	27
3.1.3.14. Vitek2 CBC Kiti	27
3.1.4. Testlerde Kullanılacak Pozitif ve Negatif Serumlar	27
3.1.5. DNA Ekstraksiyonu	27
3.1.5.1. DNA Ekstraksiyon Kiti	27
3.1.5.2. Primerler	27
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Apse İçeriklerinden Örneklerin Alınması	28
3.2.2. C. pseudotuberculosis'in İzolasyonu	28

3.2.3. Gram Boyama	28
3.2.4. C. pseudotuberculosis'in PCR ile İdentifikasyonu	29
3.2.4.1. DNA Ekstraksiyonu	29
3.2.4.2. Amplifikasyon	29
3.2.4.3. PCR Numunelerinin Görüntülenmesi	30
3.2.5. C. pseudotuberculosis İzolatlarının Hemolitik Unit Testi	30
3.2.6. C. pseudotuberculosis'in VİTEK ile İdentifikasyonu	30
3.2.7. C. pseudotuberculosis izolatının Filogenetik Tür Tayini ile İdentifikasyonu	30
3.2.8. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)	30
3.2.9. C. pseudotuberculosis Suşunun ve Standart Suşun Antijen Üretimi İçin Çoğaltılması ve İnaktivasyonu	33
3.2.10. Deney Hayvanlarına İnokulasyon, Minimum Letal Doz (MLD50) Belirlenmesi	34
3.2.11. Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması	35
3.2.12. Hayvanlarda Aşılama ve Etkinlik	36
3.2.13. Deney Hayvanlarında Hiperimmünizasyon Çalışması	37
3.2.14. ELISA	38
3.2.14.1. Antijen ELISA	38
3.2.14.2. Antikor ELISA	40
4. BULGULAR	43
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	43
4.1.1. İzolasyon Bulguları	43
4.1.2. PCR ile İdentifikasyon Bulguları	44
4.1.3. Hemolitik Unit Testi Sonuçları	45
4.1.4. VİTEK 2 Cihazı ile İdentifikasyon Bulguları	46
4.1.5. Filogenetik Tür Tayini Bulguları	47
4.1.6. SDS-PAGE ile C. pseudotuberculosis'in Protein Profili Analizi Bulguları	48
4.2. Minimum Letal Doz Belirlenmesi	49
4.3. Aşı Formülasyonu Bulguları	51
4.3.1. Deney Hayvanlarında Aşılama ve Çelmeç	51
4.3.2. Hedef Hayvanda Aşılama ve Çelmeç	53
4.4. ELISA Bulguları	53
4.4.1. Antijen ELISA Bulguları	53
4.4.1.1. Standart Antijen Optimizasyonu	53
4.4.1.2. Standart antijen ile farklı serilerin formülasyon için ELISA ile test edilmesi	56
4.4.2. Antikor ELISA Bulguları	60
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇLAR	77
7. ÖNERİLER	78
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	87

ÖZET

DOKTORA TEZİ

Corynebacterium pseudotuberculosis'e KARŞI GELİŞTİRİLECEK AŞILARDA BAKTERİN VE/VEYA TOKSOİD FORMULASYONLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

MÜZEYYEN DEMİR

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışman: Prof. Dr. SEVİL ERDENLİĞ GÜRBİLEK
Yıl: 2024, Sayfa : 87

Bu çalışmada *Corynebacterium pseudotuberculosis*'e karşı geliştirilecek aşılar da Bakterin ve/veya Toksoid formülasyonlarının karşılaştırılıp, hangisinin daha etkin koruma sağlayacağı test edildi. Çalışmada 2022 yılında 20 adet küçükbaş (koyun ve keçi) hayvandan saha ve kesimhaneden alınan apse içeriklerinden klasik tiplendirme ve moleküler yöntemlerle *C. pseudotuberculosis* izolasyonu ve identifikasyonu yapılp, standart suş ile karşılaştırıldı. Kullanılacak izolat ve çelinç suşu belirlendikten sonra deney hayvanlarına enjeksiyonlar yapılp, Minimum Letal Doz belirlenip hem deney hayvanlarında hem de hedef hayvanda (koyun) çelinç çalışmaları yapıldı. Çelinç sonucunda koruma dozları belirlenip farklı formülasyonlar hazırlandı. Bu formülasyonlarla deney hayvanlarında ve hedef hayvanda hiperimmunizasyon programına uygun şekilde immunizasyon yapılp, kan serumları alındı. İnaktif edilen ürünün bekletildikten sonra kullanılması için formülasyonunu yapmak amacıyla Antijen Enzim Linked İmmunosorbent Assay (ELISA), aşılama sonrasında da hayvanlarda koruma sağlayıp sağlamadığını anlamak amacıyla Antikor ELISA çalışmaları yapıldı. Bu çalışmada izole edilen 20 adet numuneden 8 adet numunenin *C. pseudotuberculosis* olduğu klasik tiplendirme, moleküler yöntemlerle identifiye edildi. 8 adet izolata yapılan hemolitik unit testi sonucunda en yüksek titreye sahip Şanlıurfa 2 suşu izolat olarak belirlendi Bu suş, filogenetik tür tayini için numune olarak gönderildi ve % 99.52 oranında *C.pseudotuberculosis* olduğu doğrulandı. MLD çalışmalarında fare, tavşan ve kobaylara Bakteri, Bakteri + Toksin, Toksin formülasyonları enjekte edilerek koruma dozu belirlendi, koruma dozunun 10 MLD dozu çelinç dozu olarak uygulandı. Farelerde koruma dozu en yüksek Bakteri + Toksin formülasyonunda $5 \times 10^{4.83}$ MLD₅₀/ml, kobaylarda koruma dozu en yüksek Bakteri + Toksin formülasyonunda $5 \times 10^{3.5}$ MLD₅₀/ml, tavşanlarda koruma dozu en yüksek Bakteri + Toksin formülasyonunda $5 \times 10^{3.83}$ MLD₅₀/ml olarak bulundu. Çelinç çalışmalarında her bir deney hayvanı için 10 MLD₅₀ kullanıldı. Her bir hayvan için 10^{-7} 'den 10^{-10} 'a kadar Bakteri, Bakteri + Toksin, Toksin formülasyonları hazırlanıp fare, kobay ve tavşanlara uygulandı. En yüksek koruma Bakteri + Toksin formülasyonunda bulunmuş olup, farelerde bu değer $1 \times 10^{9.1}$, kobaylarda ve tavşanlarda $1 \times 10^{8.83}$ bulundu. Antijen ELISA sonucunda da en yüksek antijen miktarına sahip olan Bakteri + Toksin kültür formülasyonunun yeni üretilen antijende olduğu görüldü. Bu antijen standart antijen olarak belirlenmiştir. 2 farklı seri daha antijen üretilerek standart antijen ile karşılaştırılıp, serilerin konsantrite veya dilüe edileceğine karar verildi. Hedef hayvanlarda çelinç çalışmaları Bakteri + Toksin formülasyonu ($1 \times 10^{9.1}$) ile yapıldı. Çelinç dozu olarak 1×10^7 CFU/ml epruvasyon yapıldı. Epruvasyon sonucunda 0. Gün, 14. Gün ve 28. Gün 5 adet koyunun kanları alınarak antikor ELISA yapıldı. Bakteri Kaplamada 0. gün hiç antikor olmadığı, minimum antikor 14. günde alındı ve 1/64'tür. Toksin Kaplamada ise minimum antikor yine 14. günde alınmış olup, 1/128'dir. Sonuç olarak hayvanlarda Bakteri + Toksin kültürü formülasyonunun koruma sağladığı, antikor oluşturduğu görüldü.

ANAHTAR KELİMELEER: Antijen ELISA, Antikor ELISA, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, çelinç, kazeöz lenfadenit

ABSTRACT

DOCTORATE THESIS

COMPARISON OF BACTERIA AND/OR TOXOID FORMULATIONS IN VACCINES TO BE DEVELOPED AGAINST *Corynebacterium pseudotuberculosis*

MÜZEYYEN DEMİR

HARRAN UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF VETERINARY MICROBIOLOGY

Thesis Supervisor: Prof. Dr. SEVİL ERDENLİĞ GÜRBİLEK

Year: 2024, Page : 87

In this study, Bacterin and / or Toxoid formulations were compared in vaccines to be developed against *Corynebacterium pseudotuberculosis* and tested which one would provide more effective protection. In the study, *C. pseudotuberculosis* was isolated and identified from the abscess contents of 20 ovine (sheep and goat) animals taken from the field and slaughterhouse in 2022 by classical typing and molecular methods and compared with the standard strain. After determining the isolate and strain to be used, injections were made into experimental animals, the Minimum Lethal Dose was determined and pelleting studies were performed in both experimental animals and the target animal (sheep). As a result of chelicin, protection doses were determined and different formulations were prepared. With these formulations, immunization was performed in experimental animals and target animals in accordance with the hyperimmunization program and blood sera were taken. Antigen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) studies were performed to formulate the inactivated product for use after waiting, and Antibody ELISA studies were performed to determine whether it provides protection in animals after vaccination. Of the 20 samples isolated in this study, 8 samples were identified as *C. pseudotuberculosis* by classical typing and molecular methods. As a result of the hemolytic unit test performed on 8 isolates, Şanlıurfa 2 strain was determined as the isolate with the highest titer. This strain was sent as a sample for phylogenetic species determination and confirmed to be *C.pseudotuberculosis* with 99.52%. In MLD studies, protection dose was determined by injecting Bacteria, Bacteria + Toxin, Toxin formulations into mice, rabbits and guinea pigs, and 10 MLD dose of the protection dose was applied as a steel dose. The highest protection dose in mice was $5 \times 10^{4.83}$ MLD₅₀/ml in Bacteria + Toxin formulation, the highest protection dose in guinea pigs was $5 \times 10^{3.5}$ MLD₅₀/ml in Bacteria + Toxin formulation, the highest protection dose in rabbits was $5 \times 10^{3.83}$ MLD₅₀/ml in Bacteria + Toxin formulation. In the chelinc studies, 10 MLD₅₀ was used for each experimental animal. Bacteria, Bacteria + Toxin, Toxin formulations from 10^{-7} to 10^{-10} were prepared for each animal and applied to mice, guinea pigs and rabbits. The highest protection was found in the Bacteria + Toxin formulation and this value was $1 \times 10^{9.1}$ in mice, $1 \times 10^{8.83}$ in guinea pigs and rabbits. Antigen ELISA showed that the highest amount of antigen was found in the newly produced antigen of the Bacteria + Toxin culture formulation. This antigen was determined as the standard antigen. 2 more series of antigens were produced and compared with the standard antigen and it was decided whether to concentrate or dilute the series. Challenge studies in target animals were performed with Bacteria + Toxin formulation ($1 \times 10^{9.1}$). Epruvation was performed at a dose of 1×10^7 CFU/ml. Antibody ELISA was performed by taking the blood of 5 sheep on Day 0, Day 14 and Day 28 as a result of epruvation. In Bacterial Coating, there was no antibody on day 0, the minimum antibody was obtained on day 14 and it was 1/64. In Toxin Coating, the minimum antibody was again taken on the 14th day and it was 1/128. As a result, it was observed that the Bacteria + Toxin culture formulation provided protection and produced antibodies in animals.

KEYWORDS: Antigen ELISA, Antibody ELISA, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, challenge, caseous lymphadenitis

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	KLA'da bronşiyal lenf nodülü	11
Şekil 4.1.	Kanlı agarda hemoliz yapan küçük beyaz koloniler	43
Şekil 4.2.	Gram (+), küçük koko-basil koloniler	44
Şekil 4.3.	Katalaz (+)	44
Şekil 4.4.	1: Marker ,2: K2 izolatı, 3: Ş2 izolatı, 4: Ş3 izolatı, 5: D1 izolatı, 6: Negatif kontrol, 7: Marker, 8: E2 izolatı, 9: G1 izolatı, 10: G3 izolatı, 11: A3 izolatı, 12: Negatif kontrol, 13: Marker	45
Şekil 4.5.	C. pseudotuberculosis Ş2 izolatına ait VİTEK 2 Sonuçları	46
Şekil 4.6.	Ş2 izolatına ait Filogenetik Tür Tanımlama Sonuçları	48
Şekil 4.7.	SDS-PAGE ile C. pseudotuberculosis'e ait protein bantlarının gözlenmesi	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	C. pseudotuberculosis'in biyokimyasal özellikleri (Dorella ve ark., 2006)	5
Çizelge 2.2.	KLA'ya karşı kullanılan ticari aşılar (Fontaine ve ark., 2006).	15
Çizelge 2.3.	Bazı önemli adjuvanlar ve etki tarzları	21
Çizelge 3.1.	Numunelerin alındığı iller ve hayvan türleri	23
Çizelge 3.2.	C. pseudotuberculosis için primer dizilimi	28
Çizelge 3.3.	PCR için Reaksiyon Karışımı	29
Çizelge 3.4.	Seperasyon (ayırıcı- %10) jelin hazırlanması	31
Çizelge 3.5.	Stacking (yükleme- % 5) jelin hazırlanması	31
Çizelge 3.6.	Akrilamid/Bisakrilamid Solüsyonu (% 30) hazırlanması	32
Çizelge 3.7.	%10 Sodium Dodesil Sülfate Solüsyonu (SDS) hazırlanması	32
Çizelge 3.8.	%10 Amonyum Persülfat Solüsyonu (APS) hazırlanması	32
Çizelge 3.9.	1 M Tris-HCl pH: 6.8 hazırlanması	32
Çizelge 3.10.	1.5 M Tris-HCl pH: 8.8 hazırlanması	33
Çizelge 3.11.	Destaining Solüsyonu hazırlanması	33
Çizelge 3.12.	10X SDS Running Buffer hazırlanması	33
Çizelge 3.13.	1X SDS Running Buffer hazırlanması	33
Çizelge 3.14.	Formulasyon	36
Çizelge 3.15.	İmmünizasyon Programı	38
Çizelge 3.16.	Ringer Solüsyonu hazırlanması	42
Çizelge 4.1.	Gram Boyama, Biyokimyasal Testler ve Hemolitik Unit Sonuçları	45
Çizelge 4.2.	Genel Sonuçlar	46
Çizelge 4.3.	Farelerde MLD50 /ml Sonuçları	49
Çizelge 4.4.	Kobaylarda MLD50/ml Sonuçları	50
Çizelge 4.5.	Tavşanlarda MLD50/ml Sonuçları	50
Çizelge 4.6.	Aşılama ve Çelinç Uygulama Bilgileri	51
Çizelge 4.7.	Farelerde Aşılama Sonrası Koruma Dozu Belirleme Sonuçları	51
Çizelge 4.8.	Kobaylarda Aşılama Sonrası Koruma Dozu Belirleme Sonuçları	52
Çizelge 4.9.	Tavşanlarda Aşılama Sonrası Koruma Dozu Belirleme Sonuçları	52
Çizelge 4.10.	Aşılama ve Çelinç Uygulama Bilgileri	53
Çizelge 4.11.	Koyunlarda Aşılama Sonrası Hayvanların Takibi	53
Çizelge 4.12.	Antijen ELISA OD Değerleri	54
Çizelge 4.13.	Numune dilüsyonlarının net OD değerleri	55
Çizelge 4.14.	Standart eğride kullanılacak antijen OD değerleri	55
Çizelge 4.15.	Toksin kaplama ve Bakteri kaplama yeni- eski üretim antijeni	56
Çizelge 4.16.	Toksin kaplama ile yapılan standart antijene göre seri sonuçları	57
Çizelge 4.17.	Bakteri kaplama ile yapılan standart antijene göre seri sonuçları	58
Çizelge 4.18.	Standart antijene göre üretilen diğer serilerin koruma unit miktarları	59
Çizelge 4.19.	Aşılı koyunlarda Antikor ELISA sonuçları (Toksin kaplama)	60
Çizelge 4.20.	Kontrol grubu koyunlarda Antikor ELISA sonuçları (Toksin Kaplama)	61
Çizelge 4.21.	Aşılı ve Kontrol grubu koyunlarda Antikor titreleri (Toksin kaplama ELISA sonuçları)	62
Çizelge 4.22.	Aşılı koyunlarda Antikor ELISA sonuçları (Bakteri kaplama)	63
Çizelge 4.23.	Kontrol grubu koyunlarda Antikor ELISA sonuçları (Bakteri Kaplama)	64
Çizelge 4.24.	Aşılı ve Kontrol grubu koyunlarda Antikor titreleri (Bakteri kaplama ELISA sonuçları)	65
Çizelge 4.25.	Aşılı ve Kontrol grubu koyunlarda Antikor titrelerinin karşılaştırılması (Bakteri ve toksin kaplama ELISA sonuçları)	66
Çizelge 4.26.	Koyunlarda bakteri ve toksin kaplama ELISA antikor titreleri	68

SİMGELER

%: Yüzde

<: Küçüktür

>: Büyüktür

C: Celsius

° : derece

KISALTMALAR

- A3 : Adıyaman 3
- AA : Arlakell A veya monooleate of manitol
- Aerobik : oksijenli ortam
- AH : Aluminum hidroksit
- AP : Alüminyum fosfat
- Bakterin : Cp inaktif tüm hücre
- BCG : Isı ile inaktif Mycobacterium bovis BCG
- BPA : Blok Polimer adjuvant
- C. ovis : Corynebacterium ovis
- CFU : Colony Forming Unit
- Cp : C. pseudotuberculosis
- Cpar : ısı inaktif Corynebacterium parvum
- CST : filtre edilmiş ekzotoksin içeren kültür üst sıvı
- CW : sonike Cp hücre duvarı
- d : log10 tabanında dilusyon faktörü
- D1 : Diyarbakır 1
- E2 : Elazığ 2
- ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- Fag A : Integral membran proteini
- Fag B : Demir enterobaktin taşıyıcı protein
- Fag C : ATP bağlayıcı sitoplazmik membran proteini
- Fag D : Demir siderofor bağlayıcı protein
- FCA : Complete Freund's Adjuvant
- FIA : İncomplete Freund's Adjuvant
- G1 : Gaziantep 1
- G3 : Gaziantep 3
- Glanvac® a : ticari aşı
- ID : İntradermal

IM : İntramuskular
IP : İnteraperitoneal
K2 : Kahramanmaraş 2
kDa : kilo dalton
KLA : Kazeöz lenfadenit
LPS : Lipopolisakkarit
MA : Multikomponent adjuvant
MDP : Muramil dipeptid
mL : Mililitre
MLD : Minimum Letal Doz
MLD50 : Minimum Letal Doz 50
mm : Milimetre
mM : Milimolar
MO : Mineral Oil
NanH : Nöromidinase
NK : Negatif Kontrol
OD : Optik Dansite
Opp : Oligopeptid permeaz
OR : Oral
PA : Fosfatidik asit
PCR : Polymerase Chain Reaction
PknG : Protein Kinaz C
PLD : Fosfolipaz D enzimi
R : Rough
rPLD : rekombinant PLD
S : Toplam canlı hayvan sayısı
S. aureus : Staphylococcus aureus
Ş2 : Şanlıurfa 2
Ş3 : Şanlıurfa 3

SC : Subcutan

SDS- PAGE : Sodium Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SodC : Süperoksit dismutase

Spa C : Pili tip protein C

TDM : Trehaloz dimikolat

Toksoid : inaktif ekzotoksinler veya Fosfolipaz D (PLD)

Toxminus : PLD geni çıkarılan Cp

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu

X : log10 tabanında en düşük dilüsyon

β-hemolizi : Beta hemolizin

μL : Mikrolitre

1. GİRİŞ

Corynebacterium pseudotuberculosis; Tüm dünyada koyun ve keçilerde yaygın olarak görülen, periferik lenf düğümleri ve akciğerlerde apse oluşumu ile karakterize olan Kazeöz Lenfadenit'e (KLA) neden olur. Etkenin hayvanların bulunduğu ortamda bulunması, enfekte hayvanlar ve/veya kontamine malzeme ve ekipmanlar yoluyla sürüdeki diğer hayvanlara sinsice yayılmasında önemlidir. Hastalıklı hayvanlarda yün kalitesinin bozulması, apselere bağlı olarak karkas kalitesinin düşmesi ve süt veriminin azalması nedeniyle ekonomik kayıplar meydana gelir.

Gram pozitif bir kokobasil olan *C. pseudotuberculosis*, çoğunlukla küçükbaş hayvanlarda ve farklı memeli türlerinde (at, lama, alpaka ve bizon) kronik enfeksiyonlara neden olur. Nadir olmasına rağmen insanlarda potansiyel zoonoz olarak birkaç vaka rapor edilmiştir.

KLA, küçükbaş hayvanlarda (koyun ve keçi) periferik lenf düğümleri, deri altı dokular ve iç organlarda apse oluşumu ile karakterize, ekonomik açıdan önemli, zoonotik, kronik bir enfeksiyondur. Ajan, apse oluşumu için gerekli olan sfingomiyelinaz aktivitesine sahip ve 31.4 kDa olan fosfolipaz D (PLD) adlı bir ekzotoksin üretir. KLA antibakteriyel ilaçlarla tedavi edilemez ve çoğunlukla semptomatik veya açılmış apseler tedavi edildiğinden cerrahi müdahale ve dezenfeksiyon tedaviden daha önemlidir.

Sürüde kötü yönetim, aşırı nüfus, yetersiz hijyen, barınak ve meraların kontamine olması, sürüde primer veya sekonder enfeksiyonların varlığı gibi çeşitli predispozan faktörler hastalığın görülme sıklığını arttırabilmektedir. KLA'nın çok hızlı bulaşması/yayılması nedeniyle sürüye verildiğinde hastalığın önlenmesi çok zordur. Bu nedenle hastalıkla mücadele etmek ve görülme sıklığını azaltmak amacıyla çeşitli aşı geliştirme çalışmaları yürütülmektedir.

Bu çalışmada da, *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonuna karşı geliştirilecek farklı aşı formülasyonlarının (Bakteri, Bakteri + Toksin, Toksin) karşılaştırılıp, hangi formülasyonun daha etkin koruma sağladığının gösterilmesi planlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Tanım

Pürülan yüzeysel lenf bezlerinin yırtılması ve dış dünyaya açılması nedeniyle "çatlak" olarak bilinen kazeöz lenfadenit (KLA), koyunlarda kronik seyretmesi ve aşırı kilo kaybına yol açması nedeniyle "ince koyun sendromu" olarak da bilinmektedir. *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. ovis*)'in neden olduğu *C. pseudotuberculosis* özellikle koyun ve keçilerde hem dış hem de iç formlarda kronik olarak seyreder (Izgür ve ark., 1999).

KLA; ekonomik açıdan önemli bir enfeksiyondur, çünkü doğurganlık, cilt ve yün kalitesinin bozulmasına, et ve süt üretiminin azalmasına ve genç hayvanların ölümüne neden olur. Her ne kadar koyun ve keçiler *C. pseudotuberculosis* 'in birincil rezervuarları olsa da patojen aynı zamanda atlardan, sığırlardan ve insanlardan da izole edilmiştir (Peel ve ark., 1997).

Pseudotüberküloz basilinin mükemmel parazitik özelliklere sahip olduğu ve bağışıklık sisteminden kolayca kaçarak konakçı vücudunda başarılı bir şekilde kolonileşerek kronik enfeksiyona ancak nadiren ölüme neden olduğu ve patojenin çevresel koşullar altında uzun süre hayatta kalabildiği bildirilmektedir. Bu özelliği nedeniyle, *C. pseudotuberculosis*'in neden olduğu küme enfeksiyonlarını tanımlamak için genellikle "yok etmek" yerine "mücadele" terimi kullanılır (Fontaine ve ark., 2006). Koyun yetiştiriciliği et, süt, kıl, yün ve bunlardan elde edilen ürünlerin insan tüketimine sunulması amacıyla dünyanın birçok ülkesinde yaygın olarak uygulanmakta olup ekonomik açıdan da önem taşımaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'ne (FAO) göre dünyadaki koyun popülasyonunun 1 milyar civarında olduğu, Türkiye'de ise 23,08 milyon civarında olduğu belirtilmektedir.

Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK) 2023 verilerine göre 42 milyon 60 bin koyun, 10 milyon 303 bin'de keçi bulunmaktadır. Koyun sayısında, 2023 yılında bir önceki yıla göre % 5,9 oranında, keçi sayısında ise bir önceki yıla göre % 11 oranında azalma olmuştur. 2024 yılına ait koyun ve keçi sayılarının resmi verileri henüz açıklanmamıştır (TÜİK, 2023).

Türkiye genelinde KLA'nın görülme sıklığına ilişkin epidemiyolojik çalışmalar yapılmasına rağmen ülke çapında yeterli çalışma yapılmamıştır. Ancak farklı bölgelerde yapılan çalışmalar bu durumun özellikle koyun sürülerinde yaygın olduğunu göstermiştir (Çetinkaya ve ark., 2002).

Antibiyotikler bu hastalığın tedavisinde etkili değildir çünkü *C. pseudotuberculosis*, bağışıklık sisteminin yıkıcı etkilerinden kaçınmak için konağın istilası üzerine kapalı duvar kapsülleri oluşturan hücre içi bir patojendir. Tedavi şansı düşük olduğundan enfeksiyonun sürüdeki koyunların çoğunluğuna yayılma olasılığı yüksektir. Enfeksiyonu önlemek için aşı kullanımı ve hijyen kuralları özellikle önemlidir (Magdy ve ark., 2010).

Aşılar, KLA'ya karşı immünoprofilaktik koruma sağlamak için kullanılır ve bakterinin tüm antijenleri, zayıflatılmış veya inaktive edilmiş *C. pseudotuberculosis* suşları, kültür süpernatantlarından izole edilen antijenler ve DNA aşıları gibi çeşitli aşılar geliştirilmiştir. Ancak henüz %100 etkili bir aşı formülü geliştirilemediğinden farklı bölgelerden izolatların farklılık gösterebileceği, aşılarda hedef aşılama bölgesinden izole edilen suşlar kullanılarak hazırlanması gerektiği belirtilmiştir (Fontaine ve ark., 2006).

Rekombinant DNA teknolojisi, rekombinant protein üretmek için kullanılan taşıyıcı bakterilerin hızlı çoğalması, kullanılan ortamın ekonomik olması, hedef rekombinant proteinin uygun koşullar mevcut olduğu takdirde istenilen miktarda sentezlenebilmesi ve üretilebilmesi nedeniyle avantajlı bir yöntemdir (Sorensen ve ark., 2005).

2.2. Tarihçe

Bu alışılmadık mikroorganizma, 1888'de Edward Nocard tarafından çiftlik hayvanlarında gözlemlenen bir lenfanjit vakasından izole edildi. 1891 yılında Hugo Von Preisz benzer bir organizmayı koyun böbreği absesinden izole ederek ona *Bacterium pseudotuberculosis ovis* adını vermiş, 19. yüzyılda ise Alman bakteriyolog Lehmannne Neumann bakteriyolojik atlasında ilk kez *Bacillus pseudotuberculosis* adını vermiştir çünkü benzer lezyonlara neden olmuştur. Bergey'in Sistematik Bakteriyoloji El Kitabı'nın (1948) altıncı baskısında, KLA'ya neden olan bakteri ilk olarak *C. pseudotuberculosis* olarak adlandırıldı (Fontaine ve ark., 2006).

KLA ilk olarak 1920'lerde ekonomik etkisi olan ve İngiltere dahil bazı ülkelerde koyun eti verimliliğinin düşük olmasına neden olan bir hastalık olarak ortaya çıkmıştır. 18. yüzyıldan itibaren ülkeler arası hayvan taşımacılığının artmasıyla birlikte enfeksiyon diğer ülkelere de yayılmaya başladı. Özellikle et ve süt

açısından oldukça verimli olan Merinos cinsinin İspanya'dan Güney Amerika, Avustralya ve Amerika kıtasının diğer bölgelerine ithal edilmesiyle *C. pseudotuberculosis* dünyanın çeşitli yerlerine yayılmaya başlamıştır (Paton, 2000).

2.3. Etiyoloji

C. pseudotuberculosis, kokoid ve filamentli mikobakteriler gibi pleomorfik özelliklere sahip, genişliği 0,5 µm ila 0,6 µm ve uzunluğu 1 µm ila 3 µm arasında değişen, sporsuz, kapsülsüz, hareketsiz, fakültatif anaerobik, katalaz pozitif ve Gram pozitif, bir bakteridir. Bakteriler, bakteriyoskopik görüntülerde karakteristik bir "Çin harfi" görünümüne sahiptir. Genellikle bir ucu şişmiş olup basil topuz görünümü verir. Basilin içinde düzensiz dağılmış granüller bulunur, genellikle uçlara yakın bulunur ve anilin boyalarıyla koyu renkte boyanırlar. "Metakromatik cisimler" veya "Babes-Ernest cisimcikleri" olarak adlandırılan bu cisimler, çubuğa tespih görünümü verir (Akman ve ark., 1980).

Corynebacterium cinsine ait bakteriler, Actinobacter (yüksek G+C içeriğine sahip Gram-pozitif basiller) sınıfındaki Actinobacteridia alt sınıfına ait aktinomisetlerden biri olan Corynebacterineae ile akraba olan Corynebacteriumaceae familyasına aittir (Stackebrandt ve ark., 1997).

C. pseudotuberculosis DNA'sı G+C oranı (%47-74) bakımından CMN grubuna (Corynebacterium, Mycobacterium, Rhodococcus eşit olarak, Nocardia) aittir. Aynı bir alt grup, *C. diphtheriae* ve *Mycobacterium tuberculosis* gibi çok önemli patojenleri içeren Actinobacter ailesidir. Mikolik asit adı verilen uzun zincirli yağ asitleri hücre duvarının dışında bulundukları için farklı bir grupta yer alırlar (Ventura ve ark., 2007).

C. pseudotuberculosis 'in, hücre duvarının dış kısmında 2 dallı 3-hidroksi yağ asidinin (mikolik asit) bulunması nedeniyle 1939'da Carne tarafından tanımlanan tüberküloz basiline benzediği gösterilmiştir. Hücre duvarının peptidoglikan tabakası, arabinoz ve galaktozun yanı sıra mezo-diaminopimelik asit (mezo-DAP) içerir (Selim, 2001).

Kültür ortamında geliştirme sırasında inkübasyon sıcaklığı 37°C ve besiyerinin pH'sı 7-7,2 dir. İlk 24 saatte kültür ortamının yüzeyinde seyrek olarak oluşan koloniler, 48-72 saat sonra sayıları artarak 1-2 mm çapa ulaşır. Kolonilerin rengi kremden turuncuya değişir ve kuru, opak R kolonileri olarak görünür (Connor

ve ark., 2000).

C. pseudotuberculosis izole edilirken *Trueperella pyogenes* (*Arcanobacter pyogenes*) ve *Pasteurella multocida* gibi apseye neden olan diğer bakterilerden ayırt edilmesi gerekir. Bu amaçla 16S rRNA dizileme yöntemi kullanılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) parça uzunluğu polimorfizmi yöntemi güvenilir olmasına rağmen pahalı bir yöntem olması nedeniyle birçok laboratuvar biyokimyasal testleri kullanmaktadır (Dorella ve ark., 2006). (Çizelge 2.1)

Çizelge 2.1. *C. pseudotuberculosis*'in biyokimyasal özellikleri (Dorella ve ark., 2006)

Asit Üretimi +		Hidroliz -	
Glikoz	+	Eskülin	-
Arabinoz	d	Hippurat	-
Ksiloz	-	Üreaz	+
Ramnoz	-	Tirozin	-
Furuktoz	+	Kasein	-
Galaktoz	+		
Mannoz	+	Fosfataz	+
Laktoz	-	Pirazinamidaz	-
Maltoz	+	Metil red	+
Sukroz	d	Nitrat redüksiyon	d
Trehaloz	-	Katalaz	+
Raffinoz	-	Oksidaz	-
Salicin	-	Lipofilizm	-
Dekstrin	d		
Nişasta	-		
+: > %90 pozitif d:11-89% arası pozitif -: < %90 negatif yada dirençli			

2.4. Virülens Faktörleri

C. pseudotuberculosis'in patojenitesinde etkili olan virülens faktörlerinin tam

olarak anlaşılması hala devam etmektedir. Fakat günümüzde yapılan çalışmalar, fosfolipaz D enzimi (PLD) ve toksik hücre duvarının önemli rol oynadığını göstermiştir. PLD enzimi ve toksik hücre duvarı, *C. pseudotuberculosis*'in patojenitesinde önemli rol oynayan tek etkenler değildir. Bu bakterinin virülansına katkıda bulunan diğer etkenler de araştırılmaya devam etmektedir (Barksdale ve ark., 1981; Bernheimer ve ark., 1980; Biberstein ve ark., 1971).

2022 yılında *C. pseudotuberculosis*'te yeni virülens faktörleri de keşfedildi. Yapılan bir araştırma, *C. pseudotuberculosis*'in virülansında rol oynayabilecek beş yeni genin varlığını ortaya koymuştur. Bu genler şunlardır: Oligopeptid permeaz (Opp): Peptitlerin ve proteinlerin hücre içine taşınmasını sağlayan bir proteindir, Pili tip protein C (Spa C): Bakterinin yüzeyinde bulunan ve konak hücrelerine yapışmasını sağlayan bir proteindir, Nöromidinase (NanH): Konak hücrelerinin bağışıklık sistemini zayıflatan bir enzimdir, Süperoksit dismutase (SodC): Bakterinin serbest radikallerin neden olduğu hasarlardan korunmasını sağlayan bir enzimdir, Protein Kinaz C (PknG): Bakterinin virülansını ve patojenitesini düzenleyen bir sinyalleme proteindir. Bu genlerin varlığı, *C. pseudotuberculosis*'in konak hücrelerine nasıl girdiği, bağışıklık sisteminden nasıl kaçtığı ve hastalığa nasıl neden olduğu hakkında yeni bilgiler sağlayabilir. Fakat, bunların *C. pseudotuberculosis*'in virülansında gerçekten rol oynadığını doğrulamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Gelecekteki çalışmalar, bu genlerin işlevlerini ve *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonları sırasında nasıl düzenlendiklerini incelemelidir (Pathirana ve ark., 2022).

2.4.1. PLD Enzimi

C. pseudotuberculosis 'in patojenitesinde rol oynayan faktörler tam olarak aydınlatılamamış olsa da önemli virülans faktörleri arasında toksik hücre duvarı lipitleri ve bu bakterinin ürettiği fosfolipaz D enzimi yer almaktadır. Fosfolipaz enzimi ilk olarak 1940 yılında Carne tarafından karakterize edilmiştir. Fosfolipaz aktivitesinin varlığı ilk kez havuç ekstraktında belirlendi; bu sayede fosfatidilkolin, fosfolipid spesifik fosfodiesteraz aktivitesi nedeniyle fosfatidik asit (PA) ve koline parçalanmaktadır (Hanahan ve ark., 1947).

Son zamanlarda yapılan moleküler çalışmalar, *C. pseudotuberculosis*'in demir metabolizmasında önemli rol oynayan dört yeni proteinin varlığını ortaya koymuştur. Bu proteinler şunlardır: Fag A (Integral membran proteini), Fag B (Demir enterobaktin taşıyıcı protein), Fag C (ATP bağlayıcı sitoplazmik membran proteini)

ve Fag D (Demir siderofor bağlayıcı protein).

Fag A, B, C ve D proteinlerinin varlığı, *C. pseudotuberculosis*'in konak hücrelerinden demir alımını ve kullanımını artırarak bakterinin virülansını ve patojenitesini önemli ölçüde etkilediği düşünülmektedir. Fag A ve Fag B proteinleri, *C. pseudotuberculosis*'in konak hücrelerinden demir içeren sideroforları almasına ve hücre içine taşınmasına yardımcı olur. Sideroforlar, bakterilerin demire bağlanmasını ve onu kullanmasını sağlayan özel moleküllerdir. Fag C proteini, *C. pseudotuberculosis*'in ATP enerjisini kullanarak demir taşıma işlemini düzenlemesinde rol oynar. ATP, hücrelerin enerji kaynağıdır ve birçok biyolojik süreçte kullanılır. Fag D proteini ise *C. pseudotuberculosis*'in sideroforlara bağlanmasını ve onları hücre içine taşınmasını sağlar. Sideroforlar, bakterilerin demire bağlanmasını ve onu kullanmasını sağlayan özel moleküllerdir.

PLD ekzotoksini, *C. pseudotuberculosis*'in virülansında önemli rol oynayan bir enzimdir. Bu enzim, konak hücrelerinin zarlarını bozarak enfeksiyonun başlamasına ve yayılmasına yardımcı olur (Billington ve ark., 2002; Pathirana ve ark., 2022).

PLD enzimleri, membran sfingomiyelin yapısını bozarak, vasküler geçirgenliği artırarak ve ajanların giriş noktalarından bölgesel lenf düğümlerine ve iç organlara difüzyonuna yardımcı olarak hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. (Lund ve ark., 1982; Sutherland ve ark., 1993)

PLD enzimi ayrıca, *C. pseudotuberculosis*'in konak hücrelerine girmesine ve bağışıklık sisteminden kaçmasına yardımcı olur (Barksdale ve ark., 1981; Bernheimer ve ark., 1980; Biberstein ve ark., 1971).

PLD toksinlerinin kompleman sistemini aktive ettiği bilinmesine rağmen kesin mekanizma bilinmemektedir. PLD'nin düşük dozlarda fare ve tavşan gibi deney hayvanlarında deride nekrotik etkilere sahip olduğu, yüksek dozlarda ise kuzu ve koyunların yanı sıra deney hayvanlarında öldürücü etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir. Hastalığın geç dönemlerinde ortaya çıkan anemi ve kaşeksi gelişiminde ekzotoksinlerin önemli rol oynadığı öne sürülmektedir. PLD ekzotoksinlerinin yapısının ve karakterizasyonunun anlaşılmasına dayanarak, rekombinant PLD toksinlerinin sentezi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Songer ve ark., 1990).

C. pseudotuberculosis PLD toksini, *Rhodococcus equi* tarafından üretilen

fosfolipaz C ile sinerjistik etki göstererek, özellikle %5 defibrinlenmiş koyun kanı içeren kanlı agarda, eritrositlerin hemoliziyle koloni çevresinde hemolitik bir alan oluşturur. Diğer taraftan *Staphylococcus aureus*'un (*S. aureus*) hemolizi β -hemolizin ile antagonistik ilişkiye girilerek engellenmektedir (Jones ve ark., 1986).

2.4.2. Serin Proteaz

C. pseudotuberculosis 'in patojenitesinde rol oynayan bir diğer virülans faktörü ise koyunlarda alt ünite aşılarında kullanılan 40 kDa ağırlığındaki serin proteazdır. Serin proteaza karşı antikörlerin, yükleme testleri sonrasında mevcut olduğunda enfeksiyona karşı yeterli koruma sağlamadığı görülmüştür (Walker ve ark., 1994).

2.4.3. Mikolik Asit

C. pseudotuberculosis 'in bir zarfı olmamasına rağmen hücre duvarının dış kısmı mikolik asit ile çevrilidir. Mikolik asit sitotoksik etkiye sahiptir ve fagositik hücrelere direnç sağlar. Mikolik asit ekstraktlarının deneysel amaçlı olarak farelere deri altı (SC) olarak uygulanması durumunda lokal inflamasyon, hiperemi ve hemorajik nekroz semptomlarının gözlemlendiği rapor edilmiştir. Ayrıca mikolik asidin dejeneratif değişiklikleri ve lökosit ölümünü uyardığı da rapor edilmiştir.

2.4.4. Toksik Hücre Duvarı

C. pseudotuberculosis'in hücre duvarı, lipopolisakkarit (LPS) adı verilen bir molekülden oluşur. LPS, konak hücrelerinde iltihaplanma ve doku hasarına neden olan toksik bir maddedir. LPS, bağışıklık sisteminin *C. pseudotuberculosis*'i tanımasını ve yok etmesini zorlaştırır. *C. pseudotuberculosis*'in hücre duvarındaki diğer bileşikler de bağışıklık sisteminin işlevini bozabilir ve enfeksiyonun yayılmasına katkıda bulunabilir (Barksdale ve ark.,1981; Bernheimer ve ark., 1980; Biberstein ve ark., 1971).

2.5. Epidemiyoloji

Corynebacterium cinsine ait bakteriler, insan ve hayvanların derisinde ve mukozalarında kommensal ve patojen olarak bulunur. Enfeksiyöz ajan esas olarak cilt yüzeyindeki sıyrıklar ve yaralar yoluyla, nadiren de solunum yoluyla bulaşır (Zaitoun ve ark., 1994). Enfeksiyonun ortaya çıkmasında stres faktörlerinin ve olumsuz çevre koşullarının rol oynadığı tahmin edilmektedir. Enfeksiyon bulaşmasının ana kaynağının koyun kırkımı sırasında lenf bezi apselerinin açılması

ve etkenin çevreye ve diğer hayvanlara bulaşması olduğu tahmin edilmektedir (Arda ve ark., 1992).

KLA koyun ve keçilerde genellikle endemik ve subklinik olmasına rağmen kuzularda nadiren ölüme neden olur. Endemik vakalarda apse kapsülü antibiyotiğin etkisini zayıflattığı için enfeksiyonla mücadele zorlaşır. Enfeksiyonun kuluçka süresinin uzun olması ve görünür lezyonların az sayıda olması nedeniyle enfekte koyunların tespiti zordur. KLA ; Avrupa, Avustralya, Güney Amerika, Kuzey Amerika, Orta Doğu gibi geniş coğrafi bölgelerde görülmekte ve enfeksiyonun ilk tanısı 1989 yılında konulmuştur. Türkiye'de KLA'nın bildirimi zorunlu değildir. Enfeksiyondan kaynaklanan verim kayıpları göz ardı edildiğinden hastalığın gerçek görülme sıklığı hakkında net bir bilgi bulunmamaktadır. Bu durumun aksine bazı ülkelerde KLA görülme sıklığının %8 ile %90 arasında değiştiği bildirilmektedir (Çetinkaya ve ark., 2002).

KLA dünyanın birçok ülkesinde yaygın görülen bir enfeksiyon olup, ülkemize büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Konya mezbahasından toplanan 100 apseli lenf nodunun 16'sından *C. pseudotuberculosis*'i izole etmişlerdir (Erganiş, 2010). Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan materyallerden 70 koyun ve 7 keçi kökenli pseudotüberküloz suşu izole edilmiş olup, Türkiye'de KLA'nın yaygın olduğu bildirilmektedir (Aydın, 1977). KLA, Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Avustralya'da koyun ve keçilerde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. KLA'nın yün verimindeki düşüşe paralel olarak yalnızca Avustralya'da yaklaşık 17 milyon dolarlık ekonomik zarara neden olduğu bildirilmiştir (Paton ve ark., 1994).

İslam ülkeleri büyük miktarda koyun eti tüketirken aynı zamanda büyük ölçekli koyun yetiştiriciliği de yapmaktadır. Mısır'daki KLA'nın araştırmasına göre koyun sürülerinin yaklaşık %10'u enfekte ve bu durumun ülkede yaklaşık 1,7 milyon dolarlık ekonomik kayba neden olduğu bildirilmektedir (Peddik ve ark., 1994).

C. pseudotuberculosis 'in koyun, keçi ve atlarda lenfadenit, lenfanjit, sepsis ve pnömoniye, sığırlarda mastitise ve domuzlarda vajinite neden olduğu rapor edilmiştir. *C. pseudotuberculosis* 'in atlarda ülseratif lenfanjit, enfeksiyöz folikülit, yaygın folikülit ve deri altı apselerine neden olduğu gözlemlenmiştir. *C. pseudotuberculosis* 'in servidler ve develerde nadiren enfeksiyona neden olduğu bulunmuştur. KLA'nın ayrıca *C. pseudotuberculosis* ile enfekte koyunlarla temas eden kişilerde de bulunduğu rapor edilmiştir. *C. pseudotuberculosis* 'in KLA ile enfekte hayvanların sütüne bulaşabileceği, çiğ süt tüketildiğinde insanlarda da

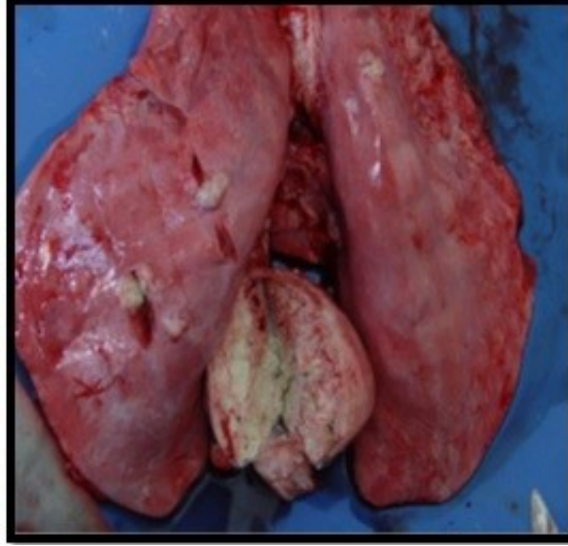
enfeksiyon oluşabileceği rapor edilmiştir (Goldberger ve ark., 1981).

Mısır'da yapılan araştırmalara göre enfeksiyonların koyunlarda keçilerden, dişilerde erkeklerden daha yaygın olduğu, antibiyotik kullanımı yerine sürü yönetimine dayalı hijyen uygulamalarının enfeksiyon vakalarını önemli ölçüde azaltacağı ortaya çıktı. Özellikle 2 yaş ve üzeri koyunlarda KLA'nın daha yaygın olduğu bulunmuştur. *C. pseudotuberculosis* 'in benzer serotiplerinin, KLA'nın görüldüğü koyun ve keçilerde enfeksiyona neden olduğu düşünülmektedir.

Koyunlarda lezyonlar yüzeysel lenf düğümlerinde, özellikle iç organlarda görülürken, keçilerde lezyonlar daha çok baş ve boyundaki lenf düğümlerinde görülür. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan araştırmalara göre, nadir görülen bir hastalık olmasına rağmen atlarda *C. pseudotuberculosis*, düşüklere ve iç organ apselerine de neden olabilmektedir (Paton ve ark., 2005).

2.6. Patogenez

C. pseudotuberculosis koyun ve keçilerde yaralar yoluyla bulaşır, lenfatik kanallar yoluyla vücuda girer, dolaşım sistemine girdikten sonra lenf düğümleri ve iç organlara yerleşerek kaslı bir lezyon oluşturarak patojendir. Enfeksiyonun başlangıç dönemi 1 ila 4 gün kadar sürmekte olup, enfeksiyon alanında nötrofillerin birikmesi ve patojenin çoğalması ve pyogranüloma oluşumu 5 ila 10 gün kadar sürmektedir. Birçok çalışmada özellikle retrofaringeal bölge, parotis lenf bezi ve akciğerlerde kazeöz lezyonlara neden olduğu rapor edilmiştir (Baird ve ark., 2007; Peppin ve ark., 1997). (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. KLA'da bronşiyal lenf nodülü

PLD ve sitotoksik lipidler lokal enfeksiyonun patojenitesinde rol oynasa da sistemik hastalığa katkıda bulunmazlar. *C. pseudotuberculosis*, nötrofiller ve makrofajlar tarafından alındıktan sonra fagolizomda depolanır. *C. pseudotuberculosis*, özellikle makrofajlarda hücre içine yerleşme yeteneğine sahiptir ve 48 saatten fazla hayatta kalabilir. *C. pseudotuberculosis* 'in patojenitesi ile ilgili olarak makrofaj ölümü gibi bilinmeyen veya anlaşılmayan durumların halen devam ettiği belirtilmektedir. Ayrıca deneysel olarak enfekte edilmiş keçilerin beyaz kan hücrelerinde, özellikle makrofajlarda da organize edilirler (Stefańska ve ark., 2010).

2.7. Teşhis

C. pseudotuberculosis'in bakteriyoskopik teşhisi için hazırlanan örneklerde Gram boyamada Gram pozitif kokobasil veya çomaklar aranmalıdır (Arda ve ark., 1997). *C. pseudotuberculosis*'in özel bir bakteri türü olan metakromatik granüller içerdiği bilinmektedir. Bu granüller, Albert ve Neisser boyama yöntemi kullanılarak yapılan boyamalarda net bir şekilde tespit edilebilir (Jones ve ark., 1986).

C. pseudotuberculosis, %5 koyun kanlı agarda veya %5 koyun kanı içeren Colombia agarda ve oksijenli ortamda (aerobik) üreyebilen bir bakteridir. Fakat, %5 CO₂ içeren ortamlarda daha hızlı üreyebilir.

C. pseudotuberculosis'in kimliklendirilmesi için çeşitli biyokimyasal testler kullanılabilir. Bu testlerden bazıları; katalaz testi, üreaz testi, nitrat redüksiyon testi, karbonhidrat fermentasyon testleridir (Arda ve ark., 1997; Aydın, 1977; Izgür ve ark., 1999; Muckle ve ark., 1986; Sutherland ve ark., 1993).

Günümüzde, izole edilen *C. pseudotuberculosis* şüpheli kolonilerin identifikasyonu için API Coryne, Vitek 2, BD Phoenix System ve Malti-TOF MS System gibi çeşitli hazır tanı kitleri ve cihazları kullanılmaktadır (Freney ve ark., 1991; Zasada ve ark., 2018).

C. pseudotuberculosis teşhisinde, kobay, fare ve kuzu gibi deney hayvanları kullanılarak yapılan testler de önemli bir rol oynamaktadır. Kobaylar en duyarlı, letal doz belirlenmesinde kobay ve tavşanlar, deri nekrozu çalışmalarında da tavşanlar tercih edilmektedir (Batey, 1986).

Hastalığın serolojik teşhisi için farklı serolojik testler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları; Tüp aglütinasyon, immunodifüzyon, Enzim Linked İmmunsorbent Assay (ELISA), indirek hemaglütinasyon testidir (Aydın, 1977; Burrell, 1980; Erganiş ve ark., 1990; İlhan, 2013; Menzies ve ark., 1994; Shigidi, 1979; Ter Laak ve ark., 1992).

Koyunlarda ELISA ve Dot-Blot ELISA yöntemleri ile serolojik olarak teşhis yapılabileceği ortaya konmuştur. Çalışma sonuçları, her iki yöntemin de koyunlarda *C. pseudotuberculosis*'in teşhisinde etkili olduğunu göstermiştir (İlhan, 2013).

2007 yılında İngiltere'de, *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonlarının teşhisi için antikorlardan yararlanan bir ELISA geliştirilmeye çalışılmıştır. Brezilya'da, hastalık kaynaklı antikorları tespit etmek için bir indirekt ELISA geliştirilmiştir. Bu çalışma, ELISA'nın *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonlarının teşhisinde etkili olabileceğini göstermiştir (Solanet ve ark., 2011). İrlanda'da, *C. pseudotuberculosis* kaynaklı enfeksiyonların teşhisi için yüzey plazmon rezonansa dayalı bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem, Sandviç ELISA ile karşılaştırıldığında daha hassas ve özgül sonuçlar vermiştir (Stapleton ve ark., 2009).

Bu bakterinin teşhisi için geleneksel yöntemler kullanılmaktaysa da, moleküler yöntemler son yıllarda öne çıkan ve oldukça hassas sonuçlar veren bir teşhis aracı haline gelmiştir. Bu yöntemler arasında konvansiyonel PCR, Real Time PCR, multipleks PCR vardır. Numune olarak canlı hayvanlardan alınan apse örnekleri, nekropsi sonrası alınan akciğer dokuları ve uygun besiyerlerinde üreyen şüpheli koloniler kullanılmaktadır (Çetinkaya ve ark., 2002; Khamis ve ark., 2004; Pacheco ve ark., 2007). Yaygın kullanılan primer grupları PLD Gen Bölgesi ve PIP Gen bölgesidir (D' Afonseca ve ark., 2010; Pacheco ve ark., 2007).

Son yıllarda, *C. pseudotuberculosis*'in virülens faktörlerini araştırmaya yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. PLD enzimi dışında diğer virülens genlerine (SigE, SpaC, SodC, PknG, NanH, NrdH, CpaE, FagA, FagB, FagC, FagD, OppA, OppB, OppC, OppD, OppF ve CopC gibi) yönelik çalışmalarda yapılmıştır (Li ve ark., 2018; Pathirana ve ark., 2022).

2.8. Koruma ve Tedavi

KLA'yı tedavi etmek için kullanılan antibiyotikler etkili değildir çünkü *C. pseudotuberculosis* hücreye yerleşip granülomatöz apse oluşturur, dolayısıyla enfeksiyon kronikleşir kalır. Bu durum KLA korunmada immünprofilaktik uygulamaların önemini arttırmaktadır (Olson ve ark., 2002; Sakmanoğlu ve ark., 2015).

C. pseudotuberculosis, koyun ve keçilerde önemli bir hastalık etkenidir ve bu hayvanlarda önemli ekonomik kayıplara yol açar. Bu nedenle, Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Norveç gibi birçok ülkede *C. pseudotuberculosis*'e karşı aşı geliştirme çalışmaları önem kazanmıştır (Eggleton ve ark., 1991).

Hastalığın tek bir varyasyonuna karşı değil, birden fazla varyasyonuna karşı koruma sağlayan aşılar üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bu tür aşılar, daha geniş bir koruma sağlayarak enfeksiyon riskini önemli ölçüde azaltabilir. *C. pseudotuberculosis* bakterisinin tüm hücre bileşenlerini içeren aşılar üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bu tür aşılar, bakterinin bağışıklık sistemine karşı farklı yönlerden tepki vermesini sağlayarak daha güçlü bir koruma sağlayabilir. Hücre duvarından elde edilen aşılar üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bu tür aşılar, bakterinin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını ve yok edilmesini kolaylaştırabilir. Etkenin toksoid formlarını içeren aşılar üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bu tür aşılar, hastalığın en ölümcül semptomlarından bazılarını önleyebilir (Brogden ve ark., 1984; Cameron ve ark., 1972; Ellis ve ark., 1995).

PLD ekzotoksinin karakterizasyonu ve mekanizmasının belirlenmesi, *C. pseudotuberculosis*'e karşı aşı geliştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamıştır. Bu çalışmalar, PLD enziminin aşı yapımında kullanılabilecek potansiyel bir antijen olduğunu göstermiştir (Egen ve ark., 1989; Hodgson ve ark., 1994).

C. pseudotuberculosis'e karşı korunmada yaygın olarak kullanılan bir aşı türü

kombine aşıdır. Bu aşılar, *C. pseudotuberculosis*'in yanı sıra *Clostridium tetani*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* ve *Clostridium chauvoei* gibi diğer önemli patojenlere karşı koruma sağlar. Kombine aşıların etkinliği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır (Paton ve ark., 1994, Piontkowski ve ark., 1998; Stanford ve ark., 1998; Williamson, 2001). Bu çalışmalarda, kombine aşıların uygulandığı sürülerde *C. pseudotuberculosis*'e bağlı apse sayısı ve büyüklüğünde önemli bir azalma gözlemlenmiştir. Bu sayede, hastalığın yayılımının da azaldığı belirtilmiştir (Paton ve ark., 1994; Williamson, 2001).

Türkiye'de 72 adet *C. pseudotuberculosis* izolatu in vitro antibiyotik duyarlılık testine tabi tutulmuştur. Testler disk difüzyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolatların seftiofur (%91.6), oksitetrasiklin (%81.9), linkomisin (%37.5), enrofloksasin (%83.3), gentamisin (%81.9), penisilin G (%83.3), rifamisin (%81.9), florfenikol (%98.6), eritromisin (%69.4), sulbaktam+ampisilin (%76.3), kloksasilin (%55.5), ampisilin (%37.5), telitromisin (%91.6), novobiosin (%95.8), spiramisin (%58.3) ve amoksisiline (%77.7) oranında duyarlı olduğu belirtilmiştir. En yüksek duyarlılık oranları florfenikol, novobiosin ve seftiofur için gözlemlenmiştir. En düşük duyarlılık oranları ise linkomisin, kloksasilin ve ampisilin için gözlemlenmiştir (Sakmanoğlu ve ark., 2015).

Yine Türkiye'de 2020 yılında 16 adet *C. pseudotuberculosis* suşu in vitro antibiyotik duyarlılık testine tabi tutulmuştur. Testler disk difüzyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Suşların %81.2'si neomisin/basitrasin/tetrasikline, %68.7'si oksitetrasikline ve amoksisilin/klavulanik aside, %87.5'i enrofloksasine, %62.5'i kloksasiline, %56.2'si tetrasikline, %75.0'i penisilin/novobiosine, %31.2'si ampisilin/sulbaktam ve %18.7'si ise trimetoprim/sulfametaksazole duyarlı bulunmuştur. En yüksek duyarlılık oranları neomisin/basitrasin/tetrasiklin, enrofloksasin ve penisilin/novobiosin için gözlemlenmiştir. En düşük duyarlılık oranları ise ampisilin/sulbaktam ve trimetoprim/sulfametaksazole için gözlemlenmiştir (İlhan, 2020).

C. pseudotuberculosis 'e karşı immün yanıtın gelişiminin anlaşılmasında önemli ilerleme kaydedilmiş ancak koyun ve keçileri KLA'ya karşı koruyan %100 etkili bir aşı geliştirilememiştir. KLA'ya karşı koruma sağlamak için 40 yılı aşkın süredir üretilen aşıların ticari formları, aşı türleri ve çeşitli adjuvan türleri bulunmaktadır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. KLA'ya karşı kullanılan ticari aşılar (Fontaine ve ark., 2006).

Sıra No	Üretim Yılı	Ülke	Hayvan	Aşı	Adjuvant Tipi	Uygulama Şekli
1	1972	Avustralya	Koyun	Bakterin	AP	
2	1984	ABD	Koyun	Bakterin/CW	WOE	IM
3	1985	ABD	Fare	Bakterin/CW	MDP,TD M,BCG ve Cpar	IP
4	1986	ABD	Keçi	Toksoid	FIA	SC
5	1987	ABD	Koyun	Bakterin	-	SC
6	1988	Brezilya	Keçi	Bakterin	AP	
7	1989	Norveç	Keçi	Bakterin/Toksoid	Levamizol	
8	1989	Norveç	Keçi	Bakterin/Toksoid	-	
9	1990	Norveç	Koyun/Fare	Bakterin	MDP	IM/P
10	1991	Norveç	Koyun/Fare	CpW	MO + AA	IM
11	1991	Norveç	Koyun	CST	BPA	
12	1991	Avustralya	Koyun	Toksoid/Bakterin+Toksoid	AH	SC
13	1991	Avustralya	Koyun	Toksoid /Toksoid Cp + 5 Clostridial Toksoid	AH/Sodium selenate	SC
14	1991	Avustralya	Koyun	Toksoid Cp + 5	AH	SC

				Clostridial Toksoid		
15	1991	Brezilya	Keçi	Bakterin/canlı atenue Cp	AP + Bakterin	ID
16	1992	Avustralya	Koyun	Toxminus Cp	-	SC
17	1994	Avustralya	Koyun	Toxminus Cp / Reko mbinant Toxminus Cp	-	OR
18	1994	Avustralya	Koyun	40-kDa antijen	AH	SC
19	1996	ABD	Koyun/Keçi	Bakterin	MDP + MO	IM
20	1997	Avustralya	Fare	Canlı Cp aroQ mutant / canlı Cp pld mutant	-	IP
21	1998	Avustralya	Koyun	Canlı Cp aroQ mutant	-	SC
22	1998	Kanada	Koyun	Glavanc 6	MDP+M O bakterin	SC/IM
23	1998	ABD	Koyun	Bakterin/ Toksoid	AH	
24	1999	Avustralya	Koyun	Glanvac6 /Rekombi nant Glanvac® 6	MA	SC
25	2000	Almanya	Keçi	CW	-	
26	2000	Avustralya	Koyun	Toksoid	AH/Moxi	SC

		a		Cp + 5 Clostridial toksoids	dectin	
27	2002	Brezilya	Keçi	Liyofilize canlı Cp	-	ID
28	2003	Peru	Fare	CST	AH	SC
29	2005	Mısır	Fare	Bakterin, toksoid/b akterin+to ksoid	MO	SC
30	2006	İngiltere	Koyun	Bakterin, rPLD, bakterin+ rPLD, Glanvac® 3	AH	SC
31	2007	Peru	Alpaka	Canlı Cp	-	SC
32	2007	Peru	Alpaka	CW/CST	MDP	SC
33	2007	Mısır	Fare	Bakterin, rPLD, / bakterin+ Rpld	MO	SC
34	2008	Brezilya	Keçi	CST, konsantre CST + oli godeoksin ükleotid CpG, / canlı attenu Cp	FIA	SC
35	2009	Brezilya	Fare	Rekombin antİsı-şok protein60 (rHsp60)	FCA/FIA	SC
36	2010	Mısır	Koyun	Bakterin, bakterin+	MO (BCG)	

				rPLD, Gammaradyonize Cp + rPLD/BCG + rPLD	içeren)	
37	2010	ABD	Fare	Bakterin+ Toksoid	-	
38	2010	Türkiye	Koyun	Bakterin+ Toksoid	FCA	
39	2012	Türkiye	Fare/ Koyun	Bakterin+ Toksoid	AH	SC
40	2011	Suudi Arabistan	Koyun	Glanvac 6	ZeytinYağı	

2.9. Hayvan Deneyi

2.9.1. Zararsızlık Testi

C. pseudotuberculosis, zararsızlık testleri için en yaygın kullanılan hayvan modelleri fare ve tavşandır. Fareler, bu enfeksiyona karşı oldukça hassastır ve çeşitli dozda bakteriye maruz kaldıklarında farklı semptomlar gösterirler. Bu nedenle, doz-yanıt ilişkilerini ve ilaç etkisini değerlendirmek için ideal bir modeldir. Tavşanlar bu enfeksiyona karşı daha dirençlidir ve insan enfeksiyonuna daha yakın semptomlar gösterirler. Bu nedenle, ilaçların uzun vadeli etkilerini ve insanlarda potansiyel yan etkilerini değerlendirmek için daha uygundur.

Yeni geliştirilen ilaçların etkinliğini incelemek, ilacın belirli bir hastalıkta ne kadar etkili olduğunu belirlemek ve hastalarda kullanımının ne kadar güvenli olduğunu ortaya koymak için laboratuvar hayvanları tercih edilmektedir. Bunun için deney hayvanlarında hastalıklar oluşturulmakta ve yeni sentezlenen maddeler deney hayvanlarına verilerek bunların etkili olup olmadığı araştırılmaktadır (Saygı, 2003).

2.9.2. Toksisite Testi

Letal Doz belirleme testi: Bir enzimin veya kimyasalın potansiyel toksisitesini belirlemek için akut toksisite testi gereklidir. Bu amaçla en sık kullanılan akut toksisite testi öldürücülük testidir. Bu testin amacı, belirli bir kimyasal maddeye maruz kalma sonucu oluşabilecek zehirlenme belirtilerini, beyin, böbrek, karaciğer

gibi önemli organları etkileme derecesini veya öldürücü doz (öldürücü oran) değerini hesaplamaktır. Ölümcül doz değeri (LD) aynı zamanda maddenin kullanımının güvenliğinin bir göstergesi olarak kabul edilir. Test genellikle fare veya sıçan gibi kolayca bulunabilen ve ucuz laboratuvar hayvanları üzerinde gerçekleştirilir. Bu hayvanlardan elde edilen sonuçlara göre test kobay veya tavşanlarda tekrarlanabilir (Saygı, 2003).

2.10. Rekombinant PLD Etkinliğine Yönelik Yapılan Aşı Çalışmaları

Mikroorganizmalar antijenik yapıları, patojenik mekanizmaları ve bağışıklık sistemi ile ilişkileri bakımından birbirlerinden farklılık gösterebilirler. Bu nedenle mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlara karşı farklı tipte aşılar üretilmektedir (Seddik ve ark., 1983; Songer ve ark., 1990).

Rekombinant DNA teknolojisi, bir mikroorganizmanın enfeksiyonu sırasında patojenitesinde rol oynayan hedef antijenin, canlı bir vücutta, aşı uygulamalarında kullanılmak üzere başka bir konakçıda daha saf ve daha bol formda üretilmesiyle elde edilen rekombinant proteindir.

Şap hastalığı virüsünün (VP1) koruyucu antijenini kodlayan genin bir plazmit içerisine aktarılıp konakçı bakteride eksprese edilmesinin ardından ilk kez aşı uygulaması için rekombinant antijen elde edildi (Wigdorovitz ve ark., 1999).

PLD genini *C. pseudotuberculosis* genomundan çıkarmış olan Toxminus (rekombinant *C. pseudotuberculosis*) adı verilen bir rekombinant suş ve sahada izole edilmiş bir *C. pseudotuberculosis* suşu kullanmıştır. Aşı uygulanırken 2 ml'lik aşı dozu 10^8 cfu/ml ve 10^{10} cfu/ml'ye seyreltildi ve test grubunun etkinliğini karşılaştırmak için aşı grubu testinde 9 aylık bir kuzu grubu kullanıldı. Mutasyona uğramış PLD'nin bulaşmayı engellemediği ancak bağışıklık sistemini uyardığı bildirildi. Aynı zamanda aşı formülasyonlarında canlı mutant suşlar kullanıldığında beklenen olumlu sonuçların elde edilemediği de bildirildi.

PLD geninin genomundan çıkarıldığı, *C. pseudotuberculosis*'in bir formu olan Toxminus (rekombinant *C. pseudotuberculosis*) ile ağızdan aşılanan KLA ile enfekte olmuş bir grup koyunda aşı etkinliğini ölçmek için altıncı bir çalışma gerçekleştirdiler ve *C. pseudotuberculosis* bakterisinin PLD enzimi ile hazırlanan iki farklı canlı aşı, hafta sonu 1×10^6 ml/bakteri oranında test edilmiş ve oral tek doz Toxminus ile hazırlanan aşının challenge uygulaması sonrasında koyunlar üzerinde

koruyucu etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

KLA'dan korunmak için 5×10^9 bakteriden oluşan iki farklı aşı formülasyonu ve tek doz 50 µg rekombinant PLD toksini, *C. pseudotuberculosis*'in formalin ile inaktive edilmesiyle %50 (h/h) alüminyum ile birleştirilmiştir. Hazırlanan aşının etkinliği test edildi. Sonuçlar Glanvac 3TM ile karşılaştırıldı. Aşılama sonrasında oluşan nötralize edici anti-PLD antikollarının koruyucu bağışıklık kazandırmada etkili olduğu söylenmektedir. Ancak başka bir çalışma, genetik olarak inaktive edilmiş PLD'den hazırlanan Glanvac 3TM ile aşılanan hayvanların KLA'ya karşı etkili bağışıklık kazanmadığını gösterdi.

Toxminus suşları, majör immünodominant antijenlerden saflaştırılır ve virülanları, rekombinant canlı vektörler olarak kullanılmak üzere etkisiz hale getirilir ve zayıflatılır. Toxminus suşunun mutasyona uğramış bir PLD geni içermesiyle eş zamanlı olarak konakçıda inaktif PLD toksini sentezler. İki ayrı aşı hazırlanıp koyunlara ağızdan uygulandıktan sonra (Toxminus ve inaktif PLD geni taşıyan Toxminus suşu), her iki aşıda da benzer humoral bağışıklık gözlemlendi. Ancak inaktive edilmiş PLD genini taşıyan bir suşla aşılanan hayvanlarda daha hızlı ve daha güçlü bağışıklık gelişti. Şişillalarda yapılan denemeler sonrasında ağızdan Toxminus suşu ile aşılanan aşı hayvanlarda şişillaya karşı koruma sağlayacak yeterli bağışıklık gelişmediği, ancak deri altı aşılama sonrasında koruma sağlandığı bildirildi. Bu durumun aşının uygulanma şekliyle ilgili olduğu söylenmektedir.

2.11. Adjuvant Kullanımı

2.11.1. Adjuvantın Genel Özellikleri

En önemli amaç, bulaşıcı hastalıklara karşı aşılar da bağışıklık tepkilerinin etkinliğini arttırmaktır. Bu nedenle adjuvan kullanımı kaçınılmaz hale gelmiştir. Adjuvan kelimesinin kökü Latince "Adjuvare" kelimesinden gelmekte olup anlamı yardım etmek, artırmak olarak tanımlanmaktadır. Adjuvanlar, etki şekillerine ve türlerine göre, antijenlerin etkisini artıran, çoklu aşılama sonrasında immün yanıtları uyaran adjuvanlar, tek enjeksiyonla immün yanıtları uyaran adjuvanlar ve sitotoksik T lenfositleri uyaran adjuvanlar olarak ikiye ayrılır (Achal ve ark., 2005).

Aşı çalışmalarında kullanılan suş, antijen miktarı, inaktivasyon yöntemi ve adjuvan tipi gelişecek humoral ve hücre sel bağışıklığı etkileyebilmektedir (Hadimli ve ark., 2007).

Hedef hastalıklara karşı koruma sağlayan aşılarda hazırlanmasında, bağışıklık sisteminin tepkisini arttırmak, korumayı arttırmak ve uzun süreli devamlılığını sağlamak amacıyla aşı kombinasyonundaki etki şekline göre çeşitli adjuvanlar tercih edilmektedir. (Berg ve ark., 2007).

Aşı olarak kullanıldığında birçok immünojen, vücutta daha uzun süre kalacak şekilde yavaş emildiği bölgelerden uygulanır ve emilimi yavaşlatarak immünojeniteyi artıran adjuvanlarla karıştırılır.

Özellikle aktif olmayan mikroorganizmalar vücutta çok hızlı bir şekilde katabolize olur ve bu da onları yeterince uzun bir süre boyunca bir bağışıklık tepkisini uyaramaz hale getirir. Bu nedenle inaktive aşılarda etkinliğini arttırmak için vücutta daha uzun süre kalmaları ve bağışıklık hafızasını uyarmaları sağlanmalıdır (Kampstrup ve ark., 1999).

Çizelge 2.3. Bazı önemli adjuvanlar ve etki tarzları

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

Aşı etkinliğini arttırmak için adjuvan seçimi çok önemlidir. Özellikle rekombinant ve sentetik proteinlerin kombinasyonundan oluşan aşılarda etkinliği, inaktif mikroorganizmalardan hazırlananlarla karşılaştırıldığında; rekombinant ve sentetik proteinler daha az immünojenik olduğundan aşılama sonrası bağışıklık

düzeyinin daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumdan dolayı aşı kombinasyonlarında daha spesifik adjuvanların kullanılması gerektiğine inanılmaktadır. Adjuvanın seçimi, hedef organizmanın özelliklerine, antijenin bir bağışıklık tepkisi oluşturma şekline ve aşının uygulanma şekline bağlıdır (Shuman, 1994).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hayvan Numuneleri

Bu çalışmada, Şanlıurfa ili ile çevresindeki illerde mezbaha ve sahadan KLA şüpheli hayvanlardan alınan apse içerikleri etken izolasyonu amacı ile kullanılmıştır. Numune alınan yerler, hayvan tür ve sayıları Çizelge 3.1 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Numunelerin alındığı iller ve hayvan türleri

İl	Koyun	Keçi
Kahramanmaraş	1	2
Şanlıurfa	3	1
Diyarbakır	2	2
Elazığ	1	1
Gaziantep	3	1
Adıyaman	2	1
Toplam	12	8

3.1.2. Standart Suş

American Type Culture Collection (ATCC) 19410 kodlu 66268 lot numaralı suş pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri, Solusyonlar ve Ayıraçlar

3.1.3.1. Kanlı Agar (Sigma, 70133)

Pepton 10 gr/l

Triptoz 10 gr/l

Sodyum klorür 5 gr/l

Agar 15 g/l

Distile Su 1000 ml

pH (25°C) 7.3±0.2

Besiyerinin hazırlanmasında 40 gram besiyeri 1 litre distile suda homojen bir karışım elde edene kadar karıştırıldı. Hazırlanan besiyeri karışımı 121°C otoklavda 15 dakika süreyle otoklavlandı. Otoklavdan çıkardıktan sonra besiyeri karışımını 50°C'ye kadar soğutuldu. Soğuyan besiyeri karışımına %5 oranında defibrine koyun kanı eklenip homojen hale gelene kadar nazıkçe karıştırıldı. Her bir steril petriye ortalama 15 ml'lik besiyeri karışımı döküldü. Petriler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

3.1.3.2. Brain Hearth Infusion Agar (Sigma, 70138)

Proteoz pepton 10 g/l

Dekstroz (Glukoz) 2 g/l

Sodyum klorür 5 g/l

Disodyum hidrojen fosfat 2.5 g/l

Agar 15 g/l

Distile Su 1000 ml

pH (25°C) 7.4±0.2

Besiyerinin hazırlanmasında 52 gram besiyeri 1 litre distile suda homojen bir karışım elde edene kadar karıştırıldı. Hazırlanan besiyeri karışımı 121°C otoklavda 15 dakika süreyle otoklavlandı. Otoklavdan çıkardıktan sonra besiyeri karışımını 50°C'ye kadar soğutuldu. Soğuyan besiyeri karışımından her bir steril petriye ortalama 15 ml döküldü. Petriler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

3.1.3.3. Brain Hearth Infusion Broth (Sigma, 53286)

Beef Heart (infusion form) 5 g/l

Calf Brain (infusion form) 12.5 g/l

Proteoz pepton 10 g/l

Dekstroz (Glukoz) 2 g/l

Sodyum klorür 5 g/l

Disodyum hidrojen fosfat 2.5 g/l

Distile Su 1000 ml

pH (25°C) 7.4±0.2

Besiyerinin hazırlanmasında 37 gram besiyeri 1 litre distile suda homojen bir karışım elde edene kadar karıştırıldı. Hazırlanan besiyeri karışımı 121°C otoklavda 15 dakika süreyle otoklavlandı. Otoklavdan çıkardıktan sonra besiyeri karışımını 50°C'ye kadar soğutuldu.

3.1.3.4. Karbonat-Bikarbonat Buffer (Antijen Kaplama Solüsyonu)

1 adet kapsül (Sigma, C3041), 100 ml distile su içerisinde çözündürülerek kullanıma hazır hale getirildi.

3.1.3.5. PBS (Phosphate Buffered Saline)

Sodium klorür 8 g/l

Potasyum klorür 200 mg/l

Disodium hidrojen fosfat 1.44 g/l

Potasyum dihidrojen fosfat 240 mg/l

Distile Su 1000 ml

pH (25°C) 7.2

3.1.3.6. Yıkama Solüsyonu

Tween 20 0.5 ml

PBS 1000 ml

3.1.3.7. Bloklama Solüsyonu

Kazein 2 g

Tween 20 0.05 ml

PBS 100 ml

3.1.3.8. Test Dilüenti

Tween 20 0.05 ml

BSA 1.5 g

PBS 100 ml

3.1.3.9. Konjugat

Anti-tavşan IgG konjugat dilution buffer ile 1:30.000 dilüe edildi (Tavşan serumu ile testi çalışmak için)

Anti-kobay IgG konjugat test dilüenti ile 1:10.000 dilüe edildi (Kobay serumu ile testi çalışmak için)

Anti-koyun IgG konjugat test dilüenti ile dilüe edildi. (Koyun serumu ile çalışmak için)

3.1.3.10. Substrat

Thermo Scientific TMB Substrate kit (34021) kullanıldı. 1:1 oranında TMB Solusyon ve Peroksit solüsyonu kullanıldı.

3.1.3.11. Durdurma Solüsyonu

Sigma S5814 TMB Substrate için olan Sigma (S5814) durdurma solüsyonu

kullanıldı.

3.1.3.12. Oksidaz Ayıracı (Bioanalyse- STR00150)

Gram boyama işlemi tamamlandıktan sonra şüpheli koloniler seçilip, oksidaz çubuğuna öze yardımıyla alınan koloni sürüldü. 30 saniye boyunca renk değişimi gözlemlendi. Oksidaz çubuğunda mor renk değişimi gözlemlenen koloniler oksidaz pozitif olarak, renk değişimi olmayan koloniler oksidaz negatif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

3.1.3.13. Katalaz Testi

Lam üzerine hidrojen peroksit damlatılarak şüpheli koloniden alınıp homojen hale getirildi. Hava kabarcığı olan kolonilerin katalaz pozitif (+) olduğuna karar verildi (Bilgehan, 1995).

3.1.3.14. Vitek2 CBC Kiti

Corynebacterium cinsi benzeri şüpheli etkenlerin tür tayini için kullanıldı (Pincus, 2006).

3.1.4. Testlerde Kullanılacak Pozitif ve Negatif Serumlar

Seronegatif koyunlardan alınan kan serumları negatif kontrol, aşılınmış hayvanlardan alınan kan serumları pozitif serum olarak kullanıldı. (Qualitative Sheep *C. pseudotuberculosis* Antibody (Anti- CP) (MBS109421) kullanıldı.

3.1.5. DNA Ekstraksiyonu

3.1.5.1. DNA Ekstraksiyon Kiti

Thermo Fischer invitrogen Pure Link™ Genomic DNA mini Kit (K182002) bakteriyel genomik DNA izolasyonu için kullanıldı.

3.1.5.2. Primerler

LETGEN firmasından tedarik edilen primerler kullanıldı Etkenin pld gen bölgesini çoğaltan PCR primerleri kullanılarak 203 bp'lik fragmentin çoğaltması sağlandı (Pincus, 2006). (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2. *C. pseudotuberculosis* için primer dizilimi

Hedef	Primer İsmi	Primer Dizilimi	Primer Büyüklüğü
<i>C. pseudotuberculosis</i>	Forward	PLD-F 5'-ATA AGC GTA AGC AGG GAG CA-3'	203 bp
	Reverse	PLD-R1 5'-ATC AGC GGT GAT TGT CTT CC-3	

3.2. Yöntem

3.2.1. Apse İçeriklerinden Örneklerin Alınması

KLA, zoonoz bir hastalık olduğundan numune alınırken dikkat edilmelidir. Öncelikle apse bölgesi %70'lik etil alkol ile temizlendikten sonra gazlı bez yardımıyla hafifçe bastırılıp apse içeriği bir miktar dışarıya boşaltıldıktan sonra steril enjektör yardımıyla geride kalan apse içeriğinin tümü alındı ve 50 ml'lik falkonlara aktarıldı. Her bir numune çalışma yapılncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.2.2. *C. pseudotuberculosis*'in İzolasyonu

Alınan apse örnekleri % 5 koyun kanı içeren Kanlı agarlara ekildi. Mikroaerofilik şartlarda 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası küçük, beyaz, kuru ve kolay parçalanen koloniler seçildi. Seçilen koloniler Gram boyama metodu ile boyandı. Gram pozitif, küçük koko-basiller seçilerek subkültürleri yapıldı. Subkültürlere katalaz testi ve oksidaz testi uygulandı. Katalaz pozitif, oksidaz negatif koloniler *C. pseudotuberculosis* şüpheli olarak değerlendirildi (Baird ve ark., 2007; Erganiş ve ark., 1990).

3.2.3. Gram Boyama

Bir lam üzerine 1 damla fizyolojik tuzlu su damlatıldı. Şüpheli *C. pseudotuberculosis* kolonilerinden bir öze alınarak homojen hale getirildi ve yayıldı. Oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamlar fiziksel fiksasyon için alevden 3 kez geçirildi. Kristal violet solüsyonu lamın üzerine damlatıldı ve 2 dakika boyunca beklenildi. Boya döküldü ve lamlar distile suyla yıkandı. Lugol solüsyonu lamın üzerine damlatıldı ve 1 dakika beklenildi. Lugol solüsyonu döküldü ve lamlar

distile suyla yıkandı. Decolorizasyon solüsyonu lamaların üzerine döküldü ve 10-15 saniye beklenildi. Lamalar distile suyla yıkandı. Safranin solüsyonu lamaların üzerine damlatıldı ve 30 saniye boyunca beklenildi. Süre sonunda lamalar bol distile suyla yıkandı ve kurutma kağıdıyla kurutuldu. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu altında 100x objektif ile incelendi. Gram (+) küçük koko-basiller *C. pseudotuberculosis* şüpheli olarak değerlendirildi (Anonim, 2013).

3.2.4. *C. pseudotuberculosis*'in PCR ile İdentifikasyonu

3.2.4.1. DNA Ekstraksiyonu

Kit prosedürüne uygun yapıldı. (İnvitrogen Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit (K182002) kullanıldı.

3.2.4.2. Amplifikasyon

PCR için hazırlanan reaksiyon karışımı (Çizelge 3.3.), PCR tüplerine eşit şekilde dağıtıldı. Her bir tüpe 5 µl DNA örneği eklendi. Negatif kontrol içerisine de 5 µl DNase Free Water eklendi. Pozitif kontrol olarak da *C. pseudotuberculosis* ATCC 19410 suşu kullanıldı. Thermal Cycler DNA amplifikasyonu için, 95°C'de 3 dk, 95°C'de 1 dk, 58°C'de 40 sn, 68°C'de 1 dk 30 sn olacak şekilde 40 döngü olarak ayarlandı. Son olarak 1 kez 68°C'de 7 dakika final zincir uzaması ile amplifikasyon tamamlandı (Pacheco ve ark., 2007).

Çizelge 3.3. PCR için Reaksiyon Karışımı

PCR Buffer	5 µL
25 mM MgCl ₂	5 µL
250 mM dNTPs	4 µL
Forward primer	1 µL
Reverse primer	1 µL
Taqpolimeraz	2 µL
Template DNA	5 µL
DNase Free Water	27 µL
Toplam	50 µl

3.2.4.3. PCR Numunelerinin Görüntülenmesi

PCR işlemi tamamlandıktan sonra, amplifiye edilen DNA örnekleri %1.5 agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez işlemi için uygun boyutta bir jel hazırlandı ve örnekler jel kuyularına yüklendi. Elektrik akımı uygulanarak DNA örnekleri jelde göç ettirildi. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel, ultraviyole transilluminatörde (UVCI-1100, MAJOR SCIENCE) görüntülendi.

3.2.5. *C. pseudotuberculosis* İzolatlarının Hemolitik Unit Testi

C. pseudotuberculosis izolatlarına numunelerine hemolitik unit testi yapıldı. PLD toksini ihtiva eden *C. pseudotuberculosis* izolatlarının sinerjik hemolitik aktivitesi test edildi. 96 gözlü mikroplyetlerin ilk kuyucuğuna 200 µl 0,2µm ile filtre ile süzülen bakteri süpernatantı (toksini) eklendi. Diğer kuyucuklara 50 µl PBS eklendi. Dilusyonları yapıldı. Her bir kuyucuğa sonrasında defibrine koyun kanı ve filtre edilmiş *Rhodococcus equi* süpernatantı % 1.5 ve %13.5 konsantrasyonlarda eklendi. 24 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra mikroplyetlerde tam hemoliz gösteren son kuyucuk izolatın hemolitik aktivite titresini belirledi. En yüksek hemolitik aktivite titresini veren izolat aşı suşu ve çelmeç testlerinde kullanılmak üzere belirlendi (Songer ve ark.,1987; Egen ve ark., 1989).

3.2.6. *C. pseudotuberculosis*'in VİTEK ile İdentifikasyonu

Dollvet Biyoteknoloji A.Ş. bünyesinde bulunan Bakteri Tanımlama Cihazı (VİTEK/COMPACT VK2C22273) ile identifikasyonu yapıldı.

3.2.7. *C. pseudotuberculosis* izolatının Filogenetik Tür Tayini ile İdentifikasyonu

BMLabosis firmasına gen sekansı için izolatın DNA'sı numune olarak gönderildi.

3.2.8. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

C. pseudotuberculosis izolatı (Ş2) ve standart suş, yükleme tamponu (900 µl 4X Laemmli Sample Buffer + 100 µl 2-merkapttoethanol) ile 1:3 oranında karıştırılıp 95°C'deki suda 5 dk kaynatıldı ve jele yükleme yapıncaya kadar buz üzerinde bekletildi.

Hazır olan camlar plaka tutucu içerisine kilitlenen Mini-PROTEAN Tetra Cell

plaka sistemine yerleştirildi. Önce 15 ml %10'luk seperasyon jeli (seperating gel) hazırlandı.

Çizelge 3.4. Seperasyon (ayırıcı- %10) jelin hazırlanması

Saf su	5.9 ml
%30 Akrilamid mix	5 ml
1.5 M Tris (pH: 8.8)	3.8 ml
%10 SDS	150 µl
%10 Amonyum Persülfat	150 µl
TEMED	12 µl
TOPLAM	15 ml

Hazırlanan seperasyon jeli cam plakalar arasına yukarıdan 2 cm boşluk bırakılacak şekilde döküldü. Jelin üst kısmının düz olması için jel daha polimerize olmadan üzerine pastör pipeti ile distile su döküldü ve jel oda sıcaklığında 15-20 dk polimerize olması için bekletildi.

Jelin polimerize olduğundan emin olunduktan sonra üzerindeki su döküldü. Seperasyon jeli hazır olduktan sonra %5'lik yükleme jeli (stacking gel) hazırlandı.

Çizelge 3.5. Stacking (yükleme- % 5) jelin hazırlanması

Saf su	4.1 ml
%30 Akrilamid mix	1 ml
1.5 M Tris (pH: 8.8)	750 µl
%10 SDS	60 µl
%10 Amonyum Persülfat	60 µl
TEMED	6 µl
TOPLAM	6 ml

Hazırlanan yükleme jeli, seperasyon jelinin üzerine döküldü ve kuyucukları

oluşturmak için jelin üzerine tarak takıldı. Jelin polimerleşmesi için en az 30 dk beklendi.

Solüsyonların Hazırlanması:

Çizelge 3.6. Akrilamid/Bisakrilamid Solüsyonu (% 30) hazırlanması

Akrilamid (Sigma/A8887)	29 g
Bisakrilamid (Applichem/A3636)	1 g
Saf su	100 ml
60 ml saf suda Akrilamid/Bisakrilamid çözündürülür, şişenin etrafı alüminyum folyo kapatılır 50-60°C’de karıştırıldı. İyice çözündükten sonra 100 ml’ye tamamlandı.	

Çizelge 3.7. %10 Sodium Dodesil Sülfate Solüsyonu (SDS) hazırlanması

SDS (Sigma/L5750)	1 g
Saf su	10 ml

Çizelge 3.8. %10 Amonyum Persülfat Solüsyonu (APS) hazırlanması

Amonyumpersülfat (Applichem/A2941)	1 g
Saf su	10 ml
1 ml olacak şekilde eppendorf tüplerine taksim edildi ve -20°C’de saklandı.	

Çizelge 3.9. 1 M Tris-HCl pH: 6.8 hazırlanması

Tris (MERCK/108387)	12.11 g
HCl (Sigma/30721)	100 ml
Saf su	-
Tris önce 70 ml’de çözündürüldü, pH’sı HCl ile 6.8’e ayarlandı ve 100 ml’ye tamamlandı.	

Çizelge 3.10. 1.5 M Tris-HCl pH: 8.8 hazırlanması

Tris (MERCK/108387)	18.17 g
HCl (Sigma/30721)	-
Saf su	100 ml
Tris önce 70 ml'de çözdürüldü, pH'sı HCl ile 8.8'e ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı.	

Çizelge 3.11. Destaining Solüsyonu hazırlanması

% 50 methanol	250 ml
% 10 glacial asetic asid	50 ml
% 40 Saf su	200 ml

Çizelge 3.12. 10X SDS Running Buffer hazırlanması

Tris	30 g
Glisin	144 g
SDS	10 g
Saf su	1000 ml
800 ml'de Tris, Glisin ve SDS çözdürüldü ve 1000 ml'ye tamamlandı.	

Çizelge 3.13. 1X SDS Running Buffer hazırlanması

10X SDS Running Buffer	100 ml
Saf su	900 ml

3.2.9. *C. pseudotuberculosis* Suşunun ve Standart Suşun Antijen Üretimi İçin Çoğaltılması ve İnaktivasyonu

İzolasyon ve identifikasyonu yapılan *C. pseudotuberculosis* izolatu (Ş2) ve standart suş 10 adet Kanlı agar besiyerine 0.1 ml ekim yapılarak 48 saat 37°C'de

inkubatörde inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonunda kolonilerin ürettiği petriler ortalama 400 ml steril PBS ile toplanarak 30 litrelik biyoreaktöre bir gece önceden steril edilmiş içerisinde % 0.1 Tween 80 bulunan BHI besiyerine steril şekilde aktarım yapıldı. 96 saat biyoreaktörde üreyen antijenden numune alınarak canlılık sayımı için dilusyonları yapıldı (3.1×10^9 CFU/ml). Her bir antijenden 1 litre numune alındıktan sonra % 0.4 Formaldehit ile inaktive edildi. (24 saat +4°C’de) İnaktivasyon işlemi sonrasında inaktivasyon kontrolü yapıldı (Avrupa Farmakopesi 2.6.1. Sterilite Testi).

3.2.10. Deney Hayvanlarına İnokulasyon, Minimum Letal Doz (MLD50) Belirlenmesi

Kullanılan Deney Hayvanları

Swiss Albino fareler, tavşan ve kobaylar kullanıldı. Hayvanlar cinsiyet gözetmeksizin seçildi. ELISA için kuzular ve challenge testleri için de hedef hayvanlar kullanılmıştır.

Uygulama yapılabilmesi için Dollvet Biyoteknoloji A.Ş. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’ndan (DOLLVET- HADYEK) 2022/06 sayılı etik kurul izni alınmıştır.

Bu çalışmada 81 fare, 12 tavşan, 12 kobay ve 10 koyun kullanıldı (9 CFR Bölüm 3 ve Bölüm 9).

Minimum Letal Doz (MLD50) Belirlenmesi ve Formülasyon Denemeleri

Biyoreaktördeki ürün 15 kat konsantre edilip, farklı formülasyonlar hazırlandı. Bu formülasyonlar; bakteri, toksin, bakteri+toksin olacak şekilde 81 adet fareye MLD₅₀ belirlenmesi için (0,2 ml) enjekte edildi. 12 adet kobay ve 12 adet tavşana 10^{-2} ‘den 10^{-5} ’e kadar bakteri kültürü dilusyonları yapılarak (0.2 ml) enjekte edildi.

Bakteri (Saf): Üretilen antijenden 50 ml alınarak 5500 rpm’de 20 dk santrifüj edildikten sonra supernatant atıldı. Dipte kalan pellet BHI ile aynı hacime tamamlanıp 10^{-1} ‘den 10^{-9} ’a kadar dilüsyonları yapılarak her bir dilüsyon 3’er fareye enjekte edildi.

Toksin (Süpernatant): Üretilen antijeden Üründen 50 ml alınarak 5500 rpm’de 20 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant 10^{-1} ‘den 10^{-9} ’a kadar dilüsyonları yapılarak her bir dilüsyon 3’er fareye enjekte edildi.

Bakteri +Toksin: Üretilen antijeden Üründen 50 ml alınarak 10^{-1} ‘den 10^{-9} ’a kadar dilüsyonları yapılarak her bir dilüsyon 3’er fareye enjekte edildi.

Hayvanlar 1 hafta süreyle gözlemlendi. Ölen dilüsyonlardaki hayvan sayısına ve canlılık sayımına göre MLD_{50} değeri belirlenip formülasyon yapıldı. MLD_{50} değerinin saptanması için REED VE MUENCH (Muthannan, 2016; Reed ve ark.,1938) metodu kullanıldı.

$\log_{10}$ son dilüsyon= $-[(\text{toplam ölen hayvan sayısı} / \text{her dilüsyonda inokulasyon yapılan hayvan sayısı}) + 0.5] \times \log \text{ dilüsyon faktörü}$

3.2.11. Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması

96 saat sonunda üretimi tamamlanan ve numune alınan *C. pseudotuberculosis* suşundan canlılık sayımı yapıldıktan sonra farklı aşı formülasyonları hazırlandı. 3 adet farklı formülasyon yapıldı.

Formülasyon: Bakteri (Saf): 5500 rpm’de 20 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Dipte kalan pelet 15x konsantre olacak şekilde PBS ile aynı hacime tamamlandı.

Formülasyon: Toksin (Süpernatant): 5500 rpm’de 20 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant toplandı. 10 kDa ile 15x konsantre edildi (0.6 mg/ml)

Formülasyon: Bakteri +Toksin: 5500 rpm’de 20 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant toplandı. 10 kDa ile 15x konsantre edildi, 2.formülasyondaki toksin ile karıştırıldı. Bakteri + toksin formülasyonu elde edildi.

Çizelge 3.14. Formülasyon

Dilüsyon Miktarı	Antijen Miktarı	Kullanılan Adjuvan Miktarı (%10 AIOH)	PBS Miktarı
10^{-7}	0.11 ml	50 ml	449.9 ml
10^{-8}	1.11 ml	50 ml	448.9 ml
10^{-9}	11.11 ml	50 ml	4328.9 ml
10^{-10}	111.11 ml	50 ml	338.9 ml

İçerisinde 3.1×10^9 CFU/ml ölü bakteri bulunan her bir dilüsyondan hazırlanan formülasyon homojenize olması amacıyla 18-24 saat 37°C 'de manyetik karıştırıcı üzerine bırakıldı.

3.2.12. Hayvanlarda Aşılama ve Etkinlik

Deney Hayvanlarında Aşılama

Çizelge 3.14'e göre hazırlanan aşı formülasyonları 3'er fareye 0,2 ml, 3 tavşan ve 3 kobaya 1 ml deri altı yol ile aşılama yapıldı. 14 gün sonra bütün hayvanlara rapel yapıldı. 2. aşılama 14 gün sonra fare, tavşan ve kobayların 10 MLD₅₀ olarak canlı bakteri kültürü ile deri altı yolla epruvasyonları yapıldı. Tüm hayvanlar 1 hafta süre ile gözlemlendi. Ölen ve sağ kalan hayvanlar değerlendirildi. Spearman-Kärber metodu ile MLD₅₀ değeri hesaplandı (Srivastava ve ark., 2022).

$$\text{Koruma dozu} = ((X-d/2) + (d \times S))$$

X: log10 tabanında en düşük dilüsyon

d: log10 tabanında dilüsyon faktörü

S: Toplam canlı hayvan sayısı

Hedef Hayvanlarında Aşılama

Bu çalışmada 10 adet koyun kullanıldı. ELISA sonucuna göre seronegatif çıkan hayvanlar 2 gruba ayrıldı. Her grupta 5 hayvan kullanıldı. 5 tane aşıli grup hayvan 10^9 CFU/ml ihtiva eden Bakteri + Toksin formülasyonu ile 5 tane de aşısız grup 1 ml olacak şekilde plasebo (PBS) ile 14 gün arayla aşılandı. 2. Aşılamadan 14 gün sonra hem kontrol grubuna hem de aşıli gruba 1×10^7 CFU/ml olan Bakteri + Toksin formülasyonu verilerek eprüvasyon (challenge) çalışması yapıldı (Erganiş ve ark., 1990). 0.gün, 14.gün ve 28.gün kan alınarak ELISA’da kullanılmak üzere -20°C ’ye kaldırıldı. Enjeksiyon sonrası 5-6 ay kadar enjeksiyon yapılan yerler kontrol edildi.

3.2.13. Deney Hayvanlarında Hiperimmunizasyon Çalışması

Antijen Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) çalışmalarında kullanılmak üzere 10 kobay ve 10 tavşana hiperimmun serum elde etmek amacıyla immunizasyon yapıldı (Avrupa Farmakopesi 0030). İmmunizasyon da 2 farklı immunizasyon antijen kullanıldı:

1. Grup: Bakteri Kültürü
2. Grup: Toksin (süpernatant)

Serum olarak immunizasyonu yapılan kobay ve tavşanların kan serumları kullanıldı. Antijen ELISA’nın yapılmasının amacı formülasyonda kullanılan İnaktif antijen (*C. pseudotuberculosis*) miktarının belirlenmesidir.

Çizelge 3.15. İmmünizasyon Programı

Gün	Enjeksiyon Miktarı	Enjeksiyon Yeri	İçerik
1	2 ml	Subkutan	1ml immünizasyon antijeni +1 ml complete freund's adjuvant
7	2 ml	Subkutan	1ml immünizasyon antijeni +1 ml incomplete freund's adjuvant
14	0.5 ml	Tavşan: Kulak	İmmünizasyon antijeni
18	1 ml	Kobay: Subkutan	İmmünizasyon antijeni
22	1.5 ml		İmmünizasyon antijeni
26	2 ml		İmmünizasyon antijeni
30	3 ml		İmmünizasyon antijeni
34	5 ml		İmmünizasyon antijeni

Son enjeksiyondan 1 hafta sonra kalpten tüm kan alındı, serumları çıkarıldı. Gelecek dönem ELISA veya diğer testlerde kullanılmak üzere 1'er ml eppendorflara taksim edilerek -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.14. ELISA

Çalışmada hem antijen ELISA hem de antikor ELISA yapıldı. Antijen ELISA yapılmasının amacı, üretilmiş olan antijenin inaktif edildikten sonra antijen miktarını tayin edilmesi ve formulasyonunun belirlenmesidir. Antikor ELISA yapılmasının amacı ise, hayvanlara aşılama sonrası oluşan antikor titresinin belirlenmesidir. ELISA protokolü modifiye edilerek uygulandı (Yıldız ve ark., 2012).

3.2.14.1. Antijen ELISA

Primer ve sekonder antikor olarak kullanılan tavşan ve kobay hiperimmün serumları iki farklı antijen grubu (Bakteri Kültürü ve Toksin) ile aşılanmış tavşan ve kobay immünizasyon sonrası alınan serumlardır.

ELISA Prosedürü

Kaplama için tavşan hiperimmün serumları karbonat-bikarbonat solüsyonu ile 1:1000 oranında dilüe edilerek düz tabanlı 96 gözlü ELISA pleytlerinde (NUNC 692620) her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde eklendi ve 18 saat 4 °C'de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası pleytler, 300 µl yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı.

% 5 kazein ile bloklama yapıldı. 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda pleytler 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

Bloklama sonrasında her bir antijen numunesinin ilk dilüsyonda 1/32 ‘den başlayarak 1/2048 dilüsyona kadar katlı dilüsyonları yapıldı. Dilüsyonlar aşağıya doğru iki tekrarlı olacak şekilde 100 µl kuyucuklara eklendi. Pleytlerin üzeri kapatılarak 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.

Antijen numune hazırlama:

Çalışmada 1 ay bekletilmiş antijenler ile yeni üretilen antijenler olmak üzere 6 farklı antijen numunesi test edildi.

Formulasyon: Bakteri (Saf): 5500 rpm’de 20 dk santrifüj edildikten sonra supernatant atıldı. Dipte kalan pelet 15x konsantre olacak şekilde PBS ile aynı hacime tamamlandı.

Formulasyon: Toksin (Süpernatant): 5500 rpm’de 20 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant toplandı. 10 kDa ile 15x konsantre edildi (0.6 mg/ml)

Formulasyon: Bakteri +Toksin: 5500 rpm’de 20 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant toplandı. 10 kDa ile 15x konsantre edildi, 2.formulasyondaki toksin ile karıştırıldı. Bakteri + toksin formulasyonu elde edildi.

İnkübasyon sonrası pleytler, 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

Her bir kuyucuğa test dilüenti ile 1:100 oranında dilüe edilen kobay hiperimmün serumu 100 µl eklenerek 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası pleytler, 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

Her bir kuyucuğa test dilüenti ile 1:10000 oranında dilüe edilen 100 µl Anti-kobay konjugat eklenerek 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası pleytler, 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

Her kuyucuğa 100 µl Substrat eklendi. 15 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra her kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu eklenerek 450 nm ELISA reader’da okutuldu. Antijen miktarı tayini için Optik Dansiteler (OD) Excel’de hesaplandı.

3.2.14.2. Antikor ELISA

Antikor ELISA için 2 farklı metot ile kaplama yapıldı.

Toksin Kaplama

Kaplama için hazırlanan süpernatant antijeni karbonat-bikarbonat solüsyonu ile 1:2 oranında dilüe edilerek düz tabanlı 96 gözlü ELISA pleytlerinde (NUNC 692620) her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde eklendi ve 18 saat 4 °C’de inkübasyona bırakıldı.

Antijen Hazırlama:

Üretilen bakteri+ toksin kültüründen 20 ml alınarak 6000 rpm’de 20 dk santrifüj edildi. Kaplama için süpernatant kullanıldı.

İnkübasyon sonrası pleytler, 300 µl yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı.

% 1.5 BSA ile bloklama yapıldı. 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda pleytler 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

Bloklama sonrasında her bir serum numunesinin 1/64 ‘ten başlayarak katlı dilüsyonları yapıldı. Her dilüsyondan 100 µl olacak şekilde kuyucuklara eklendi. Pleytlerin üzeri kapatılarak 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.

Kullanılan Test Serumları

3 grup, her grupta 3 hayvan olacak şekilde Bakteri, Toksin ve Bakteri + Toksin formülasyonlarıyla 0.gün, 14.gün, 28.gün aşılانmış hayvanlardan alınan kan serumları kullanıldı.

İnkübasyon sonrası pleytler, 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

Her bir kuyucuğa test dilüenti ile 1:10000 oranında dilüe edilen 100 µl Anti-

koyun konjugat eklenerek 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası pleytler, 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

Her kuyucuğa 100 µl Substrat eklendi. 15 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra her kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu eklenerek 450 nm ELISA reader’da okutuldu. Antijen miktarı tayini için Optik Dansiteler (OD) Excel’de hesaplandı.

Bakteri Lizatı ile Kaplama

Kaplama için hazırlanan bakteri lizatı antijen olarak kullanıldı ve karbonat-bikarbonat solüsyonu ile 1:10 oranında dilüe edilerek düz tabanlı 96 gözlü ELISA pleytlerinde (NUNC 692620) her kuyucuğa 100 µl (3.1×10^9 CFU/ml) olacak şekilde eklendi ve 18 saat 4 °C’de inkübasyona bırakıldı.

Antijen Hazırlama:

Lize edilmiş bakteri kültürü kullanıldı.

Üretilen antijenden 2 ml alınarak 6000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi.

Süpernatant kısmı atılarak dipte kalan pelet üzerine 2 ml pH:7.4 olan PBS eklendi ve 6000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi.Bu işlem 2 kez uygulandı.

Dipteki pelet üzerine 5 ml $\frac{1}{4}$ oranında içerisinde %2 Lizozim, 89 mM TRİS ve 2 mM EDTA bulunan Ringer Solüsyonu eklendi.Bu hazırlanan solusyon 56 °C’de 30 dk inkübe edildi.

Süre sonunda tam homojenizasyon için iyice vortekslendi.

Üzerine %0.3 formaldehit eklenerek 24 saat 4 °C’de inkübasyona bırakıldı.

Süre sonunda hazırlanan numune 30 dk 100 °C’de kaynatıldı.

6000 rpm’de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan süpernatant kısmı 1:10 oranında karbonat-bikarbonat solüsyonuyla karıştırıldı.

Çizelge 3.16. Ringer Solüsyonu hazırlanması

Sodyum klorür	2.25 g/l
Potasyum klorür	0.105 g/l
Kalsiyum klorür	0.06 g/l
Sodyum hidrojen Karbonat	0.05 g/l
Saf su	1000 ml

İnkübasyon sonrası pleytler, 300 µl yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı.

% 1 BSA ile bloklama yapıldı. 1.5 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda pleytler 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

Bloklama sonrasında her bir serum numunesinin 1/4 ‘ten başlayarak katlı dilüsyonları yapıldı. Her dilüsyondan 100 µl olacak şekilde kuyucuklara eklendi. Pleytlerin üzeri kapatılarak 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.

Kullanılan Test Serumları

3 grup, her grupta 3 hayvan olacak şekilde Bakteri, Toksin ve Bakteri + Toksin formülasyonlarıyla 0.gün, 14.gün, 28.gün aşılanmış hayvanlardan alınan kan serumları kullanıldı.

İnkübasyon sonrası pleytler, 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

Her bir kuyucuğa test dilüenti ile 1:10000 oranında dilüe edilen 100 µl Anti-sheepkonjugat eklenerek 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası pleytler, 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

Her kuyucuğa 100 µl Substrat eklendi. 15 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra her kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu eklenerek 450 nm ELISA reader’da okutuldu. Antikor miktarı tayini için Optik Dansiteler (OD) Excel’de hesaplandı.

4. BULGULAR

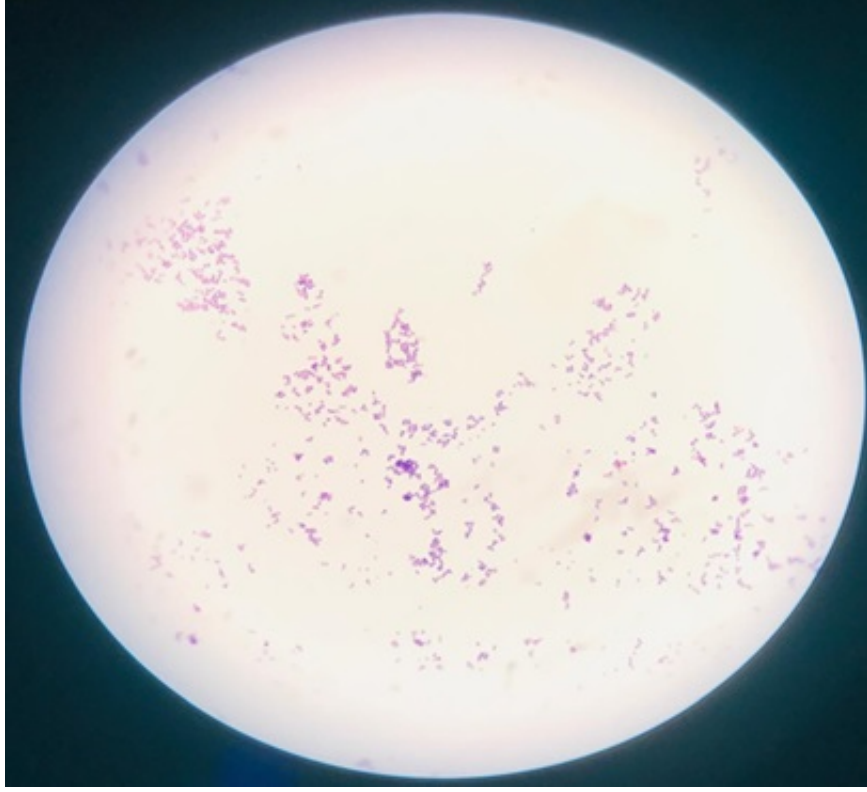
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

4.1.1. İzolasyon Bulguları

Bu çalışmada sahadan toplanan 20 adet apse örneklerinin kanlı agarlara ekimleri yapıldı ve inkübasyon sonucunda 20 adet numunede (%100) üreme gözlemlendi. Bunlardan beyaz ve küçük kolay parçalanın kolonilerden hemoliz yapanlar öze yardımcı ile alınarak, Gram boyama yapıldı. Boyama sonucunda küçük koko-basiller, Gram pozitif görülen 8 adet izolat şüpheli olarak kabul edildi.



Şekil 4.1. Kanlı agarda hemoliz yapan küçük beyaz koloniler



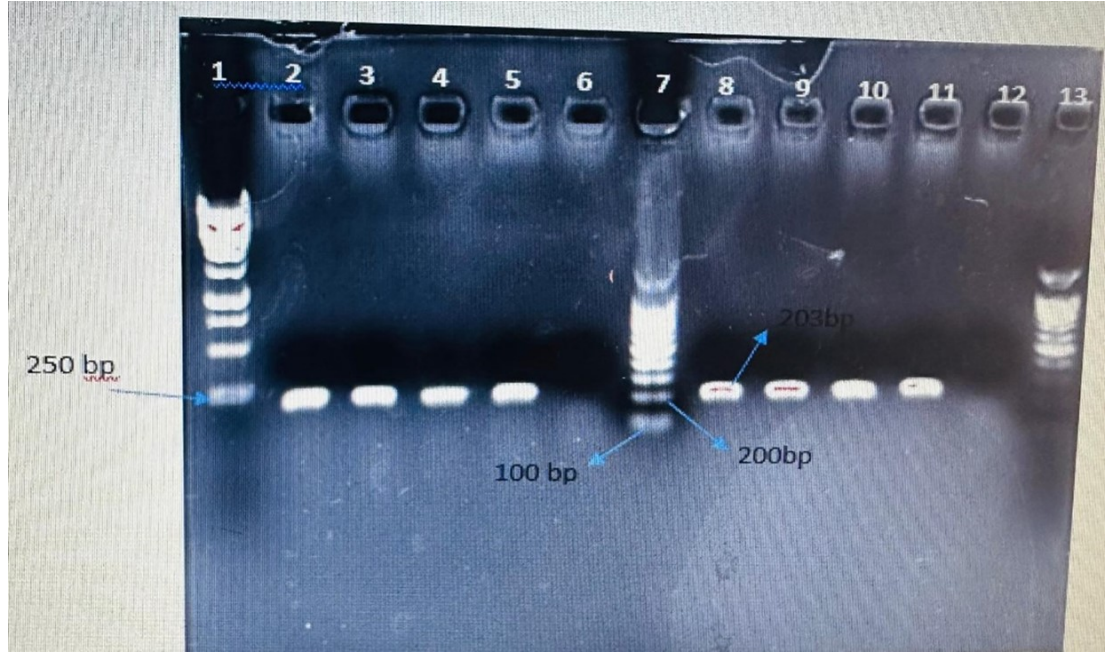
Şekil 4.2. Gram (+), küçük koko-basil koloniler



Şekil 4.3. Katalaz (+)

4.1.2. PCR ile İdentifikasyon Bulguları

C. pseudotuberculosis şüpheli 8 izolat katalaz pozitif ve oksidaz negatif olanlar PCR ile doğrulandı. 203 bp'lik DNA bantları gözleendiğinden pozitif olarak kabul edildi.



Şekil 4.4. 1: Marker ,2: K2 izolatu, 3: Ş2 izolatu, 4: Ş3 izolatu, 5: D1 izolatu, 6: Negatif kontrol, 7: Marker, 8: E2 izolatu, 9: G1 izolatu, 10: G3 izolatu, 11: A3 izolatu, 12: Negatif kontrol, 13: Marker

4.1.3. Hemolitik Unit Testi Sonuçları

PCR pozitif bulunan 8 izolata hemolitik unit testi yapıldı. En yüksek hemolitik unit veren Şanlıurfa2 (Ş2) izolatu aşu çalışmalarında kullanılacak suşu olarak seçildi.

Çizelge 4.1. Gram Boyama, Biyokimyasal Testler ve Hemolitik Unit Sonuçları

Petri NO	Gram Boyama	Oksidaz	Katalaz	Hemolitik Aktivite Testi
K2	+	-	+	1/128
Ş2	+	-	+	1/512
Ş3	+	-	+	1/128
D1	+	-	+	1/64
E2	+	-	+	1/256
G1	+	-	+	1/128
G3	+	-	+	1/64
A3	+	-	+	1/8

Çizelge 4.2. Genel Sonuçlar

İl Adı	Koyun			Keçi		
	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek Sayısı	C. <i>pseudotuberculosis</i>	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek Sayısı	C. <i>pseudotuberculosis</i>
Kahramanmaraş	1	1	1	2	2	-
Şanlıurfa	3	3	2	1	1	-
Diyarbakır	2	2	-	2	2	1
Elazığ	1	1	1	1	1	-
Gaziantep	3	3	1	1	1	1
Adıyaman	2	2	1	1	1	-
Toplam	12	12	6	8	8	2

4.1.4. VİTEK 2 Cihazı ile İdentifikasyon Bulguları

Ş2 izolatı VİTEK 2 Compact Cihazına CBC kiti ile doğrulanması için gönderildi. İzolat, % 99 *C. pseudotuberculosis* olarak identifiye edildi (75).

bioMérieux Müşterisi:
Sistem No: 17043

DOLVET BİYOTEKNOLOJİ LABORATUVARI
Laboratuvar Raporu

Yazdırıcı: t.adam
Rapor Sürümü: 1 of 1

İzolat: argebuyukbc-1 (İncelenecek)
Kart Türü: CBC Barkod: 2462002203409620 Test Cihazı: 00001A0FD294 (22273)
Ayar Tekni: TAJELSER ADAM(t.adam)

Biyonumara: 11030340400010
Organizma Miktarı:

Seçilen Organizma: *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Yorumlar:

McFarland:

İdentifikasyon Bilgileri	Kart: CBC	Parti Numarası: 2462002203	Son Kullanım Tarihi: 21.May.2023 13:00 EEST
	Durum: Son	Analiz Zamanı: 7,77 saat	Tamamlandı: 28.Eyl.2022 19:41 EEST

Organizma Kaynağı: VITEK 2

Seçilen Organizma: 99% Olasılık *Corynebacterium pseudotuberculosis*
Biyonumara: 11030340400010 Uyum: Mükemmel identifikasyon

SRF Organizması:

Ayrılacak Analiz Organizmaları ve Testler:

Analiz Mesajları:

Uyumsuz Olan Tipik Biopattern(ler)

Biyokimyasal Detaylar																	
2	APPA	(+)	4	dGAL	-	5	ODC	-	6	PheA	+	7	ARG	-	8	PVATE	(-)
9	BGAL	-	10	PYRA	-	11	SUCT	-	12	TyrA	+	13	dGLU	+	17	BGLU	-
18	dMAL	-	19	dMAN	-	21	BXYL	-	22	O/129 R	+	23	ProA	+	26	LIP	-
27	AMAN	-	30	dMLZ	-	31	URE	+	33	SAC	-	35	dTRE	-	36	CIT	-
37	BGURI	-	40	ILATk	-	41	AGLU	+	43	dSOR	-	44	AGAL	-	46	GlyA	-
47	dMLT	-	50	dRIB	(-)	51	MTE	-	52	IGLM	-	53	OPS	-	54	BdFUC	-
56	CMT	+	59	2KG	-	61	ESC	-	62	ELLM	-	64	dXYL	-			

Şekil 4.5. *C. pseudotuberculosis* Ş2 izolatına ait VİTEK 2 Sonuçları

4.1.5. Filogenetik Tür Tayini Bulguları

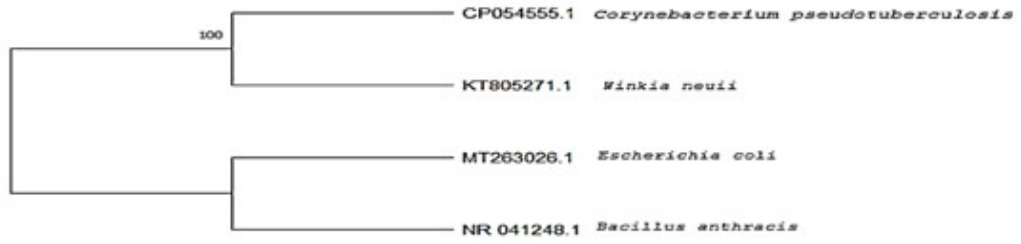
Ayrıca Ş2 izolatı gen sekansı ile de için de BM Labosis firmasına gönderildi. İzolat, % 99,52 *C. pseudotuberculosis* olarak tanımlanmıştır.

90 – 27F-1492R : LC365682.1 Numune 1 (Ş2 İzolatı)

TGGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGA
TGTGGGGGATAACCAATTGGAA ACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTAC
GGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATAT GCCTAGG
TGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTA
GCTGGTCTGAGAGG ATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA CAATGGGCGCAAGCC
TGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTAC
TTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGTGTTAATAGCAGCATCATTTGACGTT
AGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAG
GTGGTGGATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAACCG
CATTTGAAACTGGTTCCTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTGAGG
TGTCAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGC
GGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCTACTTGGA
GGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCG
CCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAAC
CTTACCTACTCTTGACATCCACAGAAGCCAGCGGAGACGCAGGTGTGCCT
TCGGGAAGTCTGAGACAGAGGCTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTGA
A ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTGTGTTGCC

Corynebacterium pseudotuberculosis

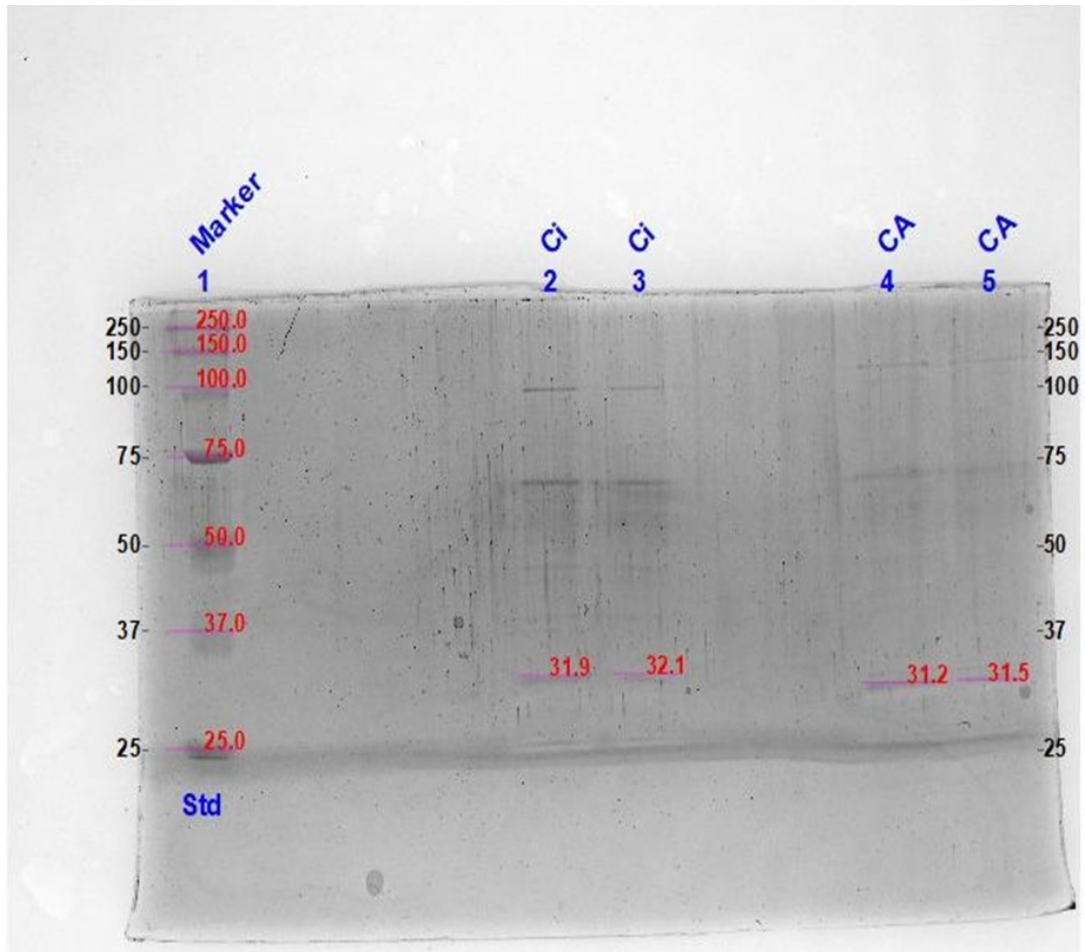
Benzerlik Oranı: %99.52



Şekil 4.6. Ş2 izolatına ait Filogenetik Tür Tanımlama Sonuçları

4.1.6. SDS-PAGE ile *C. pseudotuberculosis*'in Protein Profili Analizi Bulguları

Ş2 izolatı ve standart ATCC suşu, SDS-PAGE ile test edilip, *C. pseudotuberculosis*'e ait protein bantları gözlemlendi. İzolata ait 31,9 kDa ve 32,1 kDa olarak görülürken, ATCC'ye ait 31,2 kDa ve 31,5 kDa 'luk bantlar saptandı. İzolata ve ATCC suşuna ait 3'er adet ortak protein bantlarının olduğu görüldü.



Şekil 4.7. SDS-PAGE ile *C. pseudotuberculosis*'e ait protein bantlarının gözlenmesi

4.2. Minimum Letal Doz Belirlenmesi

Hayvanlar 20 gün süre ile gözlemlendi. Bu sürede ölen ve sağ kalan hayvan sayıları ile bu sayılara göre hesaplanan MLD_{50}/ml değeri sonuçları Çizelge 4.3.'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Farelerde MLD_{50} /ml Sonuçları

	Bakteri		Bakteri + Toksin		Toksin	
	Ölen	Sağ	Ölen	Sağ	Ölen	Sağ
Saf	3	0	3	0	3	0
10^{-1}	3	0	3	0	3	0
10^{-2}	3	0	3	0	3	0
10^{-3}	3	0	3	0	1	2
10^{-4}	2	1	2	1	0	3
10^{-5}	0	3	2	1	0	3
10^{-6}	0	3	0	3	0	3
10^{-7}	0	3	0	3	0	3
10^{-8}	0	3	0	3	0	3
10^{-9}	0	3	0	3	0	3
MLD_{50}/ml	$5 \times 10^{4.17} LD_{50}/ml$		$5 \times 10^{4.83} LD_{50}/ml$		$5 \times 10^{2.83} LD_{50}/ml$	

Fareler için en yüksek MLD_{50} değerine sahip olan Bakteri + Toksin kültürü olduğuna karar verildi.

MLD_{50}/ml değeri farede $5 \times 10^{4.83}$ olarak bulundu. Fareler için challenge dozu 10 kat $MLD_{50} / 0.2$ ml değeri $1 \times 10^{3.83}$ olarak kullanıldı.

Çizelge 4.4. Kobaylarda MLD₅₀/ml Sonuçları

	Bakteri + Toksin	
	Ölen	Sağ
10^{-2}	3	0
10^{-3}	1	2
10^{-4}	2	1
10^{-5}	0	3
MLD ₅₀ /ml	$5 \times 10^{3.5}$ LD ₅₀ /ml	

MLD₅₀/ml değeri kobayda $5 \times 10^{3.5}$ olarak bulundu. Kobaylarda challenge dozu 10 kat MLD₅₀ /ml değeri $5 \times 10^{2.5}$ olarak kullanıldı.

Çizelge 4.5. Tavşanlarda MLD₅₀/ml Sonuçları

	Bakteri + Toksin	
	Ölen	Sağ
10^{-2}	3	0
10^{-3}	3	0
10^{-4}	1	2
10^{-5}	0	3
MLD ₅₀ /ml	$5 \times 10^{3.83}$ LD ₅₀ /ml	

MLD₅₀/ml değeri tavşanlarda $5 \times 10^{3.83}$ olarak bulundu. Tavşanlarda challenge dozu 10 kat MLD₅₀ /ml değeri $5 \times 10^{2.83}$ olarak kullanıldı.

4.3. Aşı Formülasyonu Bulguları

4.3.1. Deney Hayvanlarında Aşılama ve Çelinc

Çizelge 4.6. Aşılama ve Çelinc Uygulama Bilgileri

	Dilüsyon miktarı				Uygulama		
	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	Aşı uygulama dozu 0.gün	Aşı uygulama dozu 14.gün	Çelinc uygulama dozu 28.gün (MLD50/ml)
1.formülasyon (Bakteri)	3 fare	3 fare	3 fare	3 fare	0,2 ml	0,2 ml	1 x 10 ^{3,85}
	3 kobay	3 kobay	3 kobay	3 kobay	1 ml	1 ml	5 x 10 ^{2,5}
	3 tavşan	3 tavşan	3 tavşan	3 tavşan	1 ml	1 ml	5 x 10 ^{2,85}
2.formülasyon (Toksin)	3 fare	3 fare	3 fare	3 fare	0,2 ml	0,2 ml	1 x 10 ^{3,85}
	3 kobay	3 kobay	3 kobay	3 kobay	1 ml	1 ml	5 x 10 ^{2,5}
	3 tavşan	3 tavşan	3 tavşan	3 tavşan	1 ml	1 ml	5 x 10 ^{2,85}
3.formülasyon (Bakteri+Toksin)	3 fare	3 fare	3 fare	3 fare	0,2 ml	0,2 ml	1 x 10 ^{3,85}
	3 kobay	3 kobay	3 kobay	3 kobay	1 ml	1 ml	5 x 10 ^{2,5}
	3 tavşan	3 tavşan	3 tavşan	3 tavşan	1 ml	1 ml	5 x 10 ^{2,85}

Çizelge 4.7. Farelerde Aşılama Sonrası Koruma Dozu Belirleme Sonuçları

Dilüsyon	Formülasyon					
	Bakteri		Bakteri +Toksin		Toksin	
	Ölen	Sağ	Ölen	Sağ	Ölen	Sağ
10 ⁻⁷	3	0	3	0	3	0
10 ⁻⁸	2	1	1	2	3	0
10 ⁻⁹	1	2	0	3	3	0
10 ⁻¹⁰	0	3	0	3	2	1
Koruma dozu	1 x 10 ^{8,5}		1 x 10 ^{9,1}		1x10 ^{6,8}	

Ölüm görülen dilüsyonlardaki hayvan sayısına göre koruma dozu değeri belirlendi.

Farelerde en yüksek koruma dozuna sahip olan formülasyon Bakteri + Toksin kültürü formülasyonu olduğu görüldü ve sonuç olarak koruma dozu $1 \times 10^{9.1}$ olarak belirlendi.

Çizelge 4.8. Kobaylarda Aşılama Sonrası Koruma Dozu Belirleme Sonuçları

Dilüsyon	Formülasyon					
	Bakteri		Bakteri + Toksin		Bakteri	
	Ölen	Sağ	Ölen	Sağ	Ölen	Sağ
10^{-7}	3	0	3	0	3	0
10^{-8}	2	1	2	1	3	0
10^{-9}	2	1	0	3	2	1
10^{-10}	0	3	0	3	2	1
Koruma dozu	$1 \times 10^{8.16}$		$1 \times 10^{8.83}$		$1 \times 10^{7.16}$	

Kobaylarda en yüksek koruma dozuna sahip olan formülasyon Bakteri + Toksin kültürü formülasyonu olduğu görüldü ve sonuç olarak koruma dozu $1 \times 10^{8.83}$ olarak belirlendi.

Çizelge 4.9. Tavşanlarda Aşılama Sonrası Koruma Dozu Belirleme Sonuçları

Dilüsyon	Formülasyon					
	Bakteri		Bakteri + Toksin		Bakteri	
	Ölen	Sağ	Ölen	Sağ	Ölen	Sağ
10^{-7}	3	0	3	0	3	0
10^{-8}	3	0	1	2	3	0
10^{-9}	2	1	1	2	3	0
10^{-10}	0	3	0	3	0	3
Koruma dozu	$1 \times 10^{7.83}$		$1 \times 10^{8.83}$		$1 \times 10^{7.5}$	

Tavşanlarda en yüksek koruma dozuna sahip olan formülasyon Bakteri + Toksin kültürü formülasyonu olduğu görüldü ve sonuç olarak koruma dozu $1 \times 10^{8.83}$ olarak belirlendi.

4.3.2. Hedef Hayvanda Aşılama ve Çelme

Çizelge 4.10. Aşılama ve Çelme Uygulama Bilgileri

	Dilüsyon	Uygulama		
	1×10^9 CFU/ml	Aşı uygulama dozu 0.gün	Aşı uygulama dozu 14.gün	Çelme uygulama dozu 28.gün (MLD50/ml)
Formülasyon (Bakteri+Toksin)	5 koyun	1 ml	1 ml	1×10^7
Kontrol	5 koyun	1 ml Plasebo	1 ml Plasebo	1×10^7

Çizelge 4.11. Koyunlarda Aşılama Sonrası Hayvanların Takibi

	Formülasyon		
	Bakteri +Toksin		
	Sağlıklı	Hasta	Ölen
Aşılı	4	1	0
Kontrol	0	1	4

Koyunlarda antikor titresinin belirlenmesi için 0. gün, 14. gün, 28. gün (epruvasyon öncesi) kan serumu alınarak antikor ELISA yapıldı.

4.4. ELISA Bulguları

4.4.1. Antijen ELISA Bulguları

4.4.1.1. Standart Antijen Optimizasyonu

Eski ve yeni üretimi yapılan 3 farklı antijenin (bakteri, toksin ve bakteri+toksin) yapıldı.

Çizelge 4.12. Antijen ELISA OD Değerleri

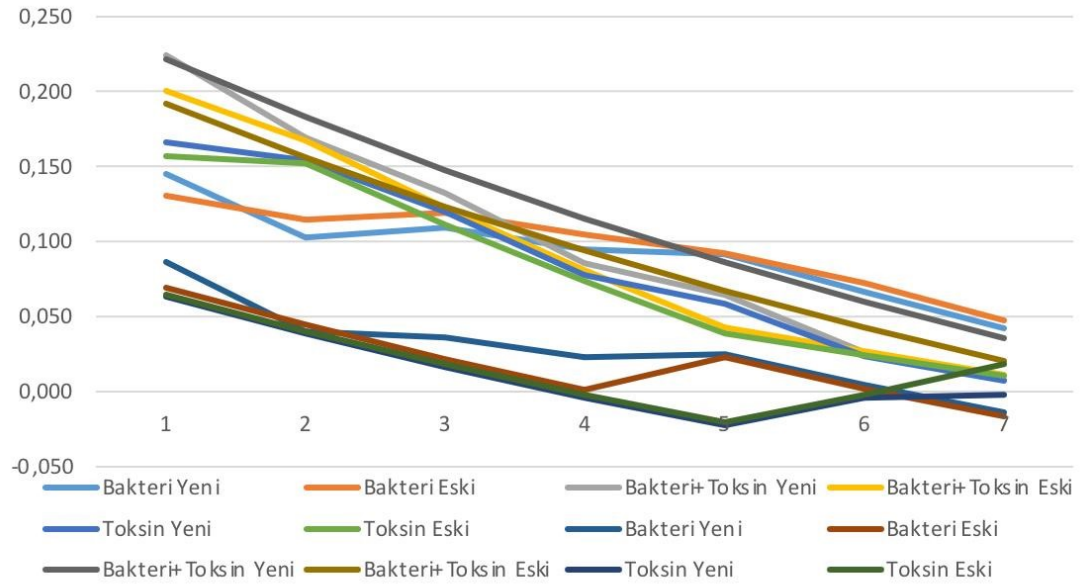
Sekonder antikor	Toksin kobay hiperimmün serum 1/100						Bakteri kobay hiperimmün serum 1/100					
Kaplama	Toksin tavşan hiperimmün serum 1/1000						Bakteri tavşan hiperimmün serum 1/1000					
Dilüsyon	Bakteri		Bakteri+Toksin		Toksin		Bakteri		Bakteri+Toksin		Toksin	
	Yeni	Eski	Yeni	Eski	Yeni	Eski	Yeni	Eski	Yeni	Eski	Yeni	Eski
32	0,272	0,257	0,351	0,315	0,282	0,261	0,287	0,273	0,427	0,393	0,269	0,267
64	0,230	0,241	0,297	0,282	0,270	0,256	0,241	0,249	0,388	0,357	0,245	0,242
128	0,237	0,245	0,260	0,237	0,236	0,215	0,237	0,226	0,353	0,325	0,223	0,220
256	0,222	0,231	0,213	0,195	0,194	0,178	0,224	0,205	0,321	0,295	0,202	0,200
512	0,219	0,218	0,192	0,158	0,174	0,143	0,226	0,227	0,291	0,268	0,184	0,182
1024	0,193	0,199	0,154	0,141	0,140	0,128	0,206	0,206	0,265	0,244	0,202	0,200
2048	0,169	0,174	0,135	0,126	0,123	0,115	0,187	0,188	0,241	0,222	0,204	0,220
NK	0,127	0,126	0,127	0,114	0,116	0,104	0,201	0,204	0,205	0,201	0,206	0,202

Çizelge 4.12'deki veriler, standart antijen optimizasyonu amacıyla yapılan ELISA sonuçlarını göstermektedir. Bu test, serumdaki antikor ile en optimal birleşme konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi. Kullanılan yöntem Sandviç ELISA'dır ve bakteri kültürü ile toksin immunizasyonları sonucu elde edilen tavşan hiperimmün serumları karbonat bikarbonat solüsyonu ile 1/1000 oranında dilüe edilerek kaplama yapılmıştır. Eski ve yeni üretimi yapılan üç farklı antijenin (bakteri, toksin ve bakteri+toksin) performansı değerlendirildi.

Verilere bakılarak, yeni üretim antijenlerin genel olarak daha yüksek performans sergilediği göz önüne alındığında, üretim sürecindeki değişikliklerin antijen etkinliğini artırdığı söylenebilir. Bu, yeni üretim sürecinin benimsenmesi gerektiğini gösterir. Bakteri+Toksin kombinasyonunun en yüksek OD değerlerini vermesi, bu kombinasyonun daha etkili bir bağlanma yeteneğine sahip olduğunu ve ELISA'da daha iyi sonuçlar verebileceğini göstermektedir. Bu kombinasyonun, özellikle hassasiyetin kritik olduğu testlerde tercih edilmesi önerilir. Ayrıca, farklı üretim partileri arasındaki tutarlılığı test etmek de önemlidir. Bu kapsamlı değerlendirme, standart antijen optimizasyonu çalışmalarının doğruluğunu ve etkinliğini artırmak için gerekli adımları ve stratejileri belirlemektedir. Net OD değerinin hesaplanması için aşağıdaki formül kullanıldı.

Net OD değeri = Test numune dilüsyonlarının OD değeri – Ortalama Negatif kontrolün OD değeri

Numune dilüsyonlarının net OD değerleri grafiksel olarak gösterilmiştir.

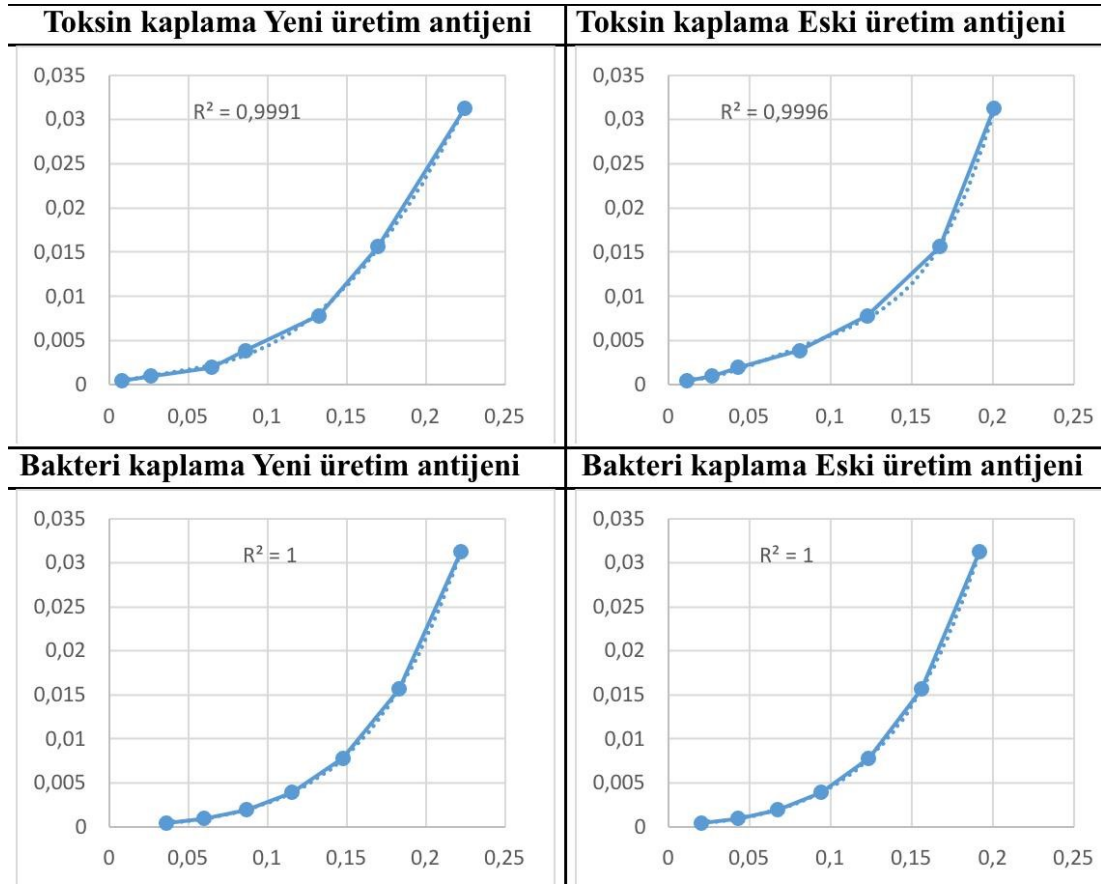
Çizelge 4.13. Numune dilüsyonlarının net OD değerleri

Net OD değerlerinin grafiklerine baktığımızda en yüksek ve doğrusal olan eğriyi toksin ve bakteri hiperimmün serum kaplama gruplarında bakteri+toksin antijeni verdi. Kaplama gruplarında belirlenen bakteri+toksin antijen eğrileri için R^2 değeri istatistiksel olarak excel programında hesaplandı.

Çizelge 4.14. Standart eğride kullanılacak antijen OD değerleri

Dilüsyon oranı	Unit	Toksin kaplama		Bakteri kaplama	
		Bakteri+Toksin		Bakteri+Toksin	
		Yeni	Eski	Yeni	Eski
32	0,031	0,224	0,201	0,222	0,192
64	0,016	0,170	0,167	0,183	0,156
128	0,008	0,132	0,122	0,148	0,124
256	0,004	0,086	0,081	0,116	0,094
512	0,002	0,065	0,043	0,087	0,067
1024	1E-03	0,026	0,027	0,060	0,043
2048	5E-04	0,008	0,012	0,036	0,021

Çizelge 4.14'teki verileri daha ayrıntılı incelediğimizde, her iki kaplama ve iki farklı antijen için R^2 değerlerinin 1'e yakın olduğunu görüyoruz

Çizelge 4.15. Toksin kaplama ve Bakteri kaplama yeni- eski üretim antijeni

Hem toksin kaplama hem de bakteri kaplama için yeni üretim antijenleri eski üretim antijenlerine göre daha düşük ünit değerleri gösterdi. Benzer şekilde, bakteri kaplamada da yeni üretim antijenleri, eski üretim antijenlerine göre daha düşük ünit değerleriyle daha etkili bir performans sergilemektedir.

4.4.1.2. Standart antijen ile farklı serilerin formülasyon için ELISA ile test edilmesi

Bu çalışmada farklı serilerin antijen koruma unitleri hem toksin hem de bakteri kaplama ile belirlenen standart antijen ile ayrı ayrı test edilip R^2 eğrisi oluşturularak formülasyon için konsantrasyonları hesaplandı. Yeni üretimleri yapılan 2 seri bakteri+toksin kültürü test edildi.

Çizelge 4.16. Toksin kaplama ile yapılan standart antijene göre seri sonuçları

Dilüsyon	Standart antijen (1 koruma ünit)		1. seri		2. seri	
32	0.350	0.348	0.408	0.385	0.414	0.408
64	0.313	0.294	0.345	0.361	0.391	0.374
128	0.263	0.257	0.355	0.368	0.383	0.367
256	0.217	0.211	0.333	0.346	0.347	0.348
512	0.175	0.190	0.328	0.327	0.295	0.308
1024	0.157	0.152	0.290	0.298	0.254	0.260
2048	0.140	0.134	0.254	0.261	0.204	0.218
NK	0.127	0.126	0.122	0.118	0.119	0.120

Çizelge 4.16’da, toksin kaplama ile yapılan standart antijene göre seri sonuçları gösterildi. Standart antijen (1 koruma ünit) için farklı dilüsyonlardaki OD değerleri sırasıyla 32x, 64x, 128x, 256x, 512x, 1024x, 2048x ve NK (negatif kontrol) için verildi. Her iki seri de yüksek OD değerleri göstererek etkin koruma sağladığı görüldü. 1. seri ve 2. seri karşılaştırıldığında, 2. serinin OD değerlerinin genellikle 1. seriye göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu durum, 2. serinin antijenlerinin bağlanma kapasitesinin daha yüksek olduğunu ve daha etkili bir koruma sağladığını göstermektedir. Dilüsyon oranları arttıkça OD değerlerinin azaldığı gözlemlenmiştir ki bu beklenen bir sonuçtur, çünkü dilüsyon arttıkça antijen konsantrasyonu azalır ve bağlanma kapasitesi düşer. En yüksek OD değerleri 32x dilüsyonda elde edilmiştir ve bu değerler her iki seride de standart antijen ile uyumludur. Negatif kontrol sonuçları, OD değerlerinin çok düşük olduğunu göstermektedir, bu da testin doğruluğunu ve spesifikliğini teyit eder çünkü negatif kontrol gruplarında beklenildiği gibi bağlanma olmadı.

Çizelge 4.17. Bakteri kaplama ile yapılan standart antijene göre seri sonuçları

		Standart Koruma ünit	1.seri Koruma ünit	2.seri Koruma ünit
Toksin kaplama	Ortalama	1.03	13.73	7.72
	STD	0.04	2.05	0.19
	Varyans %	3.61	14.93	2.48
Bakteri kaplama	Ortalama	1.00	13.08	7.93
	STD	0.01	1.17	0.48
	Varyans %	1.10	8.98	6.02

Çizelge 4.17’de sunulan verilere göre, ELISA ile standart antijen ve farklı serilerin formülasyonları karşılaştırılmıştır. Dilüsyon serileri ve buna karşılık gelen OD değerleri ölçülmüş ve analiz edilmiştir. Standart antijen için OD değerleri dilüsyon arttıkça düzenli olarak azalmakta, bu da antijenin seyreltilmesiyle sinyalin zayıfladığını göstermektedir. Birinci ve ikinci seri için de benzer bir trend gözlemlenmektedir; her iki serinin de dilüsyon arttıkça OD değerleri azalmaktadır, bu durum antijen konsantrasyonunun azalmasını yansıtır.

Bununla birlikte, her iki serinin OD değerleri, standart antijenin OD değerlerinden genel olarak daha yüksektir. Örneğin, 32 dilüsyonunda standart antijenin OD değeri yaklaşık 0.431 iken, birinci seri 0.621 ve ikinci seri 0.581 değerlerine sahiptir. Bu fark, serilerin antijeni daha güçlü bir şekilde bağladığını veya daha yüksek bir antijen konsantrasyonuna sahip olduğunu gösterebilir. Dilüsyon oranları arttıkça OD değerlerinin azaldığı gözlemlenmiştir ki bu beklenen bir sonuçtur, çünkü dilüsyon arttıkça antijen konsantrasyonu azalır ve bağlanma kapasitesi düşer. En yüksek OD değerleri 32x dilüsyonda elde edilmiştir ve bu değerler her iki seride de standart antijen ile uyumludur. Negatif kontrol sonuçları, OD değerlerinin çok düşük olduğunu göstermektedir, bu da testin doğruluğunu ve spesifikliğini teyit eder çünkü negatif kontrol gruplarında beklenildiği gibi bağlanma olmadı.

Çizelge 4.18. Standart antijene göre üretilen diğer serilerin koruma unit miktarları

		Standart Koruma unit	1.seri Koruma unit	2.seri Koruma unit
Toksin kaplama	Ortalama	1.03	13.73	7.72
	STD	0.04	2.05	0.19
	Varyans %	3.61	14.93	2.48
Bakteri kaplama	Ortalama	1.00	13.08	7.93
	STD	0.01	1.17	0.48
	Varyans %	1.10	8.98	6.02

Çizelge 4.18'de, standart antijene göre üretilen diğer serilerin koruma unit miktarları incelendi. Standart antijenin koruma unit dozu 1 olarak belirlendi. Toksin kaplama ve bakteri kaplama yöntemleriyle yapılan ELISA'da , 1. seri antijenin koruma unit miktarı toksin kaplamada 13.73, bakteri kaplamada ise 13.08 olarak ölçüldü. Aynı testlerde, 2. seri antijenin koruma unit miktarı toksin kaplamada 7.72, bakteri kaplamada ise 7.93 olarak belirlendi. Bu değerler, 1. serinin standart antijene göre ortalama 13.5 kat, 2. serinin ise 7.5 kat dilüe edilerek kullanılabileceğini gösterdi. Her iki kaplama yönteminde de serilerin koruma unit dozları ve dilüe edilecek miktarları birbirine yakın olup, varyasyon değerlerinin %20'nin altında olması elde edilen sonuçların güvenilirliğini teyit etti. Bu sonuçlar, serilerin standart antijene kıyasla yüksek koruma unit değerlerine sahip olduğunu ve uygun dilüsyon oranlarıyla kullanıldığında koyunlara etkili bir koruma sağlayabileceğini gösterdi.

4.4.2. Antikor ELISA Bulguları

Çizelge 4.19. Aşılı koyunlarda Antikor ELISA sonuçları (Toksine kaplama)

Dilüsyon	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün
	HAYVAN 1			HAYVAN 2			HAYVAN 3			HAYVAN 4			HAYVAN 5		
64	0,155	0,521	0,819	0,160	0,622	0,786	0,156	0,617	0,869	0,183	0,412	0,615	0,164	0,420	0,872
128	0,159	0,485	0,807	0,148	0,558	0,718	0,158	0,621	0,825	0,177	0,385	0,532	0,159	0,385	0,813
256	0,150	0,464	0,754	0,108	0,46	0,607	0,168	0,527	0,84	0,176	0,362	0,462	0,142	0,314	0,766
512	0,154	0,391	0,667	0,153	0,379	0,5	0,170	0,421	0,784	0,178	0,359	0,377	0,135	0,180	0,741
1024	0,151	0,345	0,567	0,162	0,275	0,387	0,153	0,354	0,743	0,161	0,161	0,266	0,138	0,162	0,652
2048	0,151	0,175	0,466	0,154	0,22	0,291	0,173	0,246	0,641	0,181	0,171	0,175	0,145	0,183	0,580
4096	0,150	0,168	0,301	0,141	0,189	0,235	0,154	0,169	0,56	0,161	0,154	0,164	0,141	0,162	0,468
8192	0,146	0,166	0,275	0,146	0,175	0,186	0,144	0,154	0,467	0,151	0,151	0,155	0,134	0,152	0,381

Çizelge 4.19'da aşılı koyunlarda antikor ELISA sonuçları, toksine kaplama yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Farklı dilüsyonlarda ve belirli zaman noktalarında (0. gün, 14. gün, 28. gün) beş koyunun antikor seviyeleri ölçüldü. Tüm hayvanlarda 0. gün değerleri oldukça düşük ve benzer seviyelerde başlamaktadır, yaklaşık 0.15-0.16 civarında olan bu değerler, aşılama öncesi durumlarını yansıtmaktadır. Aşılama sonrasında, 14. ve 28. günlerde dilüsyon oranı ne olursa olsun OD değerlerinde genel bir artış gözlemlenmektedir. Her hayvan için antikor yanıtı benzer bir artış eğilimi göstermesine rağmen, 14. ve 28. günlerdeki OD değerleri arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin, Hayvan 3, 28. günde diğer hayvanlara kıyasla daha yüksek OD değerlerine sahiptir, özellikle 64 ve 128 dilüsyonlarında (0.869 ve 0.825). Öte yandan, Hayvan 4'ün 28. gün değerleri, dilüsyon oranı arttıkça (özellikle 2048 ve 4096 dilüsyonlarında) belirgin şekilde düşmektedir.

Düşük dilüsyonlarda (64 ve 128), OD değerleri genellikle daha yüksektir. Yüksek dilüsyonlarda (2048 ve üstü), OD değerleri düşme eğilimindedir. Ancak 28. gün değerleri hala 0.3 ile 0.6 arasında değişmekte olup, antikor yanıtının hala belirgin olduğunu göstermektedir. Zaman içinde değişim incelendiğinde, 0. gün değerleri aşılama öncesi düşükken, 14. gün değerleri aşının etkisini göstermeye başlamış ve tüm dilüsyonlarda belirgin bir artış görülmüştür. 28. gün değerleri ise antikor yanıtının zirveye ulaştığını ve çoğu dilüsyonda en yüksek seviyelere çıktığını göstermektedir. Öne çıkan değerler arasında, Hayvan 1'de 64 dilüsyonunda 28. gün değeri 0.819, Hayvan 2'de 64 dilüsyonunda 28. gün değeri 0.786, Hayvan 3'te 64 dilüsyonunda 28. gün değeri 0.869, Hayvan 4'te 64 dilüsyonunda 28. gün değeri 0.615 ve Hayvan 5'te 64 dilüsyonunda 28. gün değeri 0.872 olarak dikkat çekmektedir.

Çizelge 4.20. Kontrol grubu koyunlarda Antikor ELISA sonuçları (Toksin Kaplama)

Dilüsyon	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün
	HAYVAN 6			HAYVAN 7			HAYVAN 8			HAYVAN 9			HAYVAN 10		
64	0,161	0,167	0,184	0,175	0,165	0,182	0,181	0,183	0,172	0,164	0,171	0,197	0,156	0,167	0,168
128	0,156	0,162	0,195	0,178	0,176	0,183	0,186	0,177	0,173	0,169	0,165	0,203	0,158	0,162	0,168
256	0,155	0,161	0,180	0,173	0,173	0,177	0,176	0,174	0,185	0,160	0,165	0,192	0,168	0,161	0,172
512	0,157	0,163	0,173	0,166	0,163	0,171	0,181	0,166	0,187	0,164	0,167	0,197	0,170	0,163	0,168
1024	0,142	0,147	0,177	0,180	0,158	0,157	0,177	0,167	0,190	0,161	0,150	0,193	0,172	0,147	0,214
2048	0,160	0,166	0,175	0,156	0,174	0,175	0,177	0,185	0,181	0,161	0,169	0,193	0,164	0,166	0,165
4096	0,142	0,148	0,176	0,158	0,156	0,170	0,176	0,185	0,190	0,160	0,151	0,192	0,173	0,148	0,168
8192	0,133	0,138	0,164	0,140	0,146	0,188	0,171	0,188	0,178	0,155	0,141	0,186	0,162	0,138	0,168

Çizelge 4.20'de kontrol grubundaki koyunlarda antikor ELISA sonuçları, toksin kaplama yöntemi kullanılarak incelendi. Farklı dilüsyonlarda ve belirli zaman noktalarında (0. gün, 14. gün, 28. gün) beş koyunun antikor seviyeleri ölçüldü. Tüm hayvanlarda 0. gün, 14. gün ve 28. gün değerleri genel olarak düşük ve birbirine yakın seviyelerdedir. Bu durum, kontrol grubunun aşılınmamış olduğunu ve doğal olarak gelişen bir bağışıklık tepkisinin olmadığını gösterdi. Her hayvan için antikor seviyeleri düşük olup, zaman içerisinde önemli bir değişiklik göstermedi. Örneğin, Hayvan 6'nın 64 dilüsyonundaki OD değerleri 0.161 (0. gün), 0,167 (14. gün) ve 0.184 (28. gün) olup, küçük artışlar görülse de bu değişiklikler minimal düzeydedir. Benzer şekilde, diğer hayvanlarda da OD değerlerinde hafif artışlar veya dalgalanmalar vardır, ancak bu değişiklikler anlamlı bir bağışıklık tepkisini işaret etmemektedir.

Dilüsyon arttıkça OD değerleri genel olarak azalma eğilimindedir, ancak bu azalma, aşı grubunda gözlemlenen antikor artışı gibi belirgin bir tepkiyi yansıtmamaktadır. Yüksek dilüsyonlarda (2048 ve üstü), OD değerleri hafifçe düşse de yine de belirli bir seviyede kaldığı görüldü. Ancak, bu seviyeler aşılınmış grubun değerleriyle kıyaslandığında oldukça düşüktür. Zaman içinde 0. gün, 14. gün ve 28. gün arasındaki OD değerlerinde belirgin bir artış veya düşüş gözlemlenmedi. Bu durum, kontrol grubunun aşılınmamış olması nedeniyle doğal antikor seviyelerinin stabil kaldığını gösterdi. Genel olarak bakıldığında antikor ELISA sonuçları, kontrol grubundaki koyunlarda belirgin bir antikor yanıtının oluşmadığını gösterdi. 0. gün, 14. gün ve 28. gün boyunca OD değerlerinde önemli bir değişiklik gözlemlenmedi. Bu da aşı uygulanmadığı için koyunların doğal bağışıklık tepkisi geliştirmediğini ve antikor seviyelerinin düşük kaldığını gösterdi. Dilüsyon arttıkça OD değerleri hafifçe

azalmakta, ancak bu değişimler minimal düzeydedir. Genel olarak, kontrol grubundaki hayvanlarda antikor yanıtı gözlemlenmemiştir ve bu durum, aşının etkinliğinin ve bağışıklık yanıtının aşılama grubunda belirgin olduğunu destekledi.

Çizelge 4.21. Aşılı ve Kontrol grubu koyunlarda Antikor titreleri (Toksine kaplama ELISA sonuçları)

		Toksine Kaplama Antikor		
		0. gün	14. gün	28. gün
Aşılı	Hayvan 1	0	1024	2048
	Hayvan 2	0	512	1024
	Hayvan 3	0	1024	8192
	Hayvan 4	0	512	512
	Hayvan 5	0	256	8192
Kontrol	Hayvan 6	0	0	0
	Hayvan 7	0	0	0
	Hayvan 8	0	0	0
	Hayvan 9	0	0	0
	Hayvan 10	0	0	0

Çizelge 4.21'de, aşılı ve kontrol grubundaki koyunlarda antikor titreleri, toksine kaplama ELISA sonuçları kullanılarak değerlendirildi. Aşılı koyunlarda 0. gün tüm hayvanlar için antikor titreleri sıfırdır, bu da başlangıçta hiçbir hayvanın antikor seviyesinin olmadığını gösterdi. Ancak, 14. günde aşılı hayvanlarda antikor titrelerinde belirgin bir artış gözlemlendi. Örneğin, Hayvan 1 ve Hayvan 3'te antikor titreleri 1024'e ulaşırken, Hayvan 2 ve Hayvan 4'te 512'ye ve Hayvan 5'te 256'ya ulaştı. 28. günde ise antikor titreleri daha da yükseldi; Hayvan 3 ve Hayvan 5'te 8192 gibi çok yüksek titreler gözlemlenirken, Hayvan 1'de 2048, Hayvan 2'de 1024 ve Hayvan 4'te 512 seviyesinde kaldığı görüldü. Kontrol grubundaki tüm hayvanlar (Hayvan 6'dan Hayvan 10'a kadar) için antikor titreleri 0. gün, 14. gün ve 28. günde sıfır olarak görüldü. Bu, kontrol grubunda herhangi bir aşılama yapılmadığı ve dolayısıyla doğal bir antikor tepkisi gelişmediği anlamına gelmektedir. Aşılı grupta gözlemlenen antikor titrelerinin zamanla artması, aşının güçlü bir bağışıklık tepkisi oluşturduğunu göstermektedir. 28. günde, antikor titreleri özellikle Hayvan 3 ve

Hayvan 5'te çok yüksek seviyelere ulaşmış olup, aşının bu hayvanlarda çok etkili olduğu gözlemlendi. Aşılı hayvanlar arasında bazı farklılıklar olmasına rağmen, genel eğilim aşının etkili olduğunu ve antikor seviyelerini önemli ölçüde artırdığını gösterdi. Aşılı ve kontrol grupları arasındaki belirgin fark, aşının etkisini net bir şekilde ortaya koymaktadır. Aşı uygulanmamış kontrol grubunda hiçbir antikor tepkisi gelişmemişken, aşılanmış grupta güçlü bir antikor yanıtı oluşmuştur. Bu sonuçlar, aşının koyunlarda etkili bir bağışıklık tepkisi oluşturduğunu ve yüksek antikor titrelerine ulaşıldığı sonucuna varıldı.

Çizelge 4.22. Aşılı koyunlarda Antikor ELISA sonuçları (Bakteri kaplama)

Dilüsyon	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün
	HAYVAN 1			HAYVAN 2			HAYVAN 3			HAYVAN 4			HAYVAN 5		
4	0,137	0,678	0,717	0,141	0,706	0,747	0,141	0,759	0,803	0,131	0,676	0,727	0,153	0,575	0,665
8	0,135	0,660	0,671	0,139	0,687	0,699	0,139	0,739	0,752	0,129	0,670	0,676	0,162	0,491	0,640
16	0,137	0,597	0,630	0,141	0,622	0,656	0,141	0,669	0,706	0,131	0,600	0,595	0,150	0,424	0,538
32	0,137	0,548	0,599	0,141	0,502	0,523	0,141	0,614	0,671	0,131	0,541	0,520	0,145	0,370	0,484
64	0,145	0,468	0,519	0,149	0,417	0,437	0,149	0,524	0,581	0,139	0,455	0,415	0,148	0,308	0,381
128	0,143	0,368	0,420	0,147	0,283	0,321	0,147	0,412	0,470	0,137	0,326	0,277	0,166	0,158	0,343
256	0,132	0,270	0,309	0,136	0,243	0,155	0,136	0,276	0,346	0,127	0,229	0,196	0,147	0,116	0,177
512	0,139	0,192	0,172	0,143	0,202	0,137	0,143	0,215	0,357	0,133	0,159	0,106	0,137	0,083	0,127

Çizelge 4.22, aşılı koyunlarda bakteri kaplamada antikor seviyelerini ölçmek için yapılan ELISA sonuçlarını göstermektedir. Farklı zaman dilimlerinde (0. gün, 14. gün, 28. gün) ve çeşitli dilüsyon oranlarında (4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512) beş farklı hayvanın antikor seviyeleri incelendi. Genel olarak, antikor seviyeleri aşılanmanın ardından zamanla artış göstermiştir. 0. gün ile kıyaslandığında, 14. ve 28. günlerde tüm hayvanlarda antikor seviyelerinde belirgin bir artış gözlemlendi.

Bu artış, özellikle düşük dilüsyonlarda (4, 8, 16) daha belirgin olup, yüksek dilüsyonlarda (256, 512) antikor seviyelerinde azalma gözlemlendi. Dilüsyon oranı arttıkça, yani numunenin daha fazla seyreltilmesiyle ölçülen antikor seviyelerinin azaldığı görüldü. Bu, genellikle ELISA'da beklenen bir durumdur, çünkü seyreltilmiş örneklerde antikor konsantrasyonu düşer. En düşük dilüsyonlarda (4, 8) antikor seviyeleri en yüksekken, en yüksek dilüsyonlarda (256, 512) en düşük seviyededir. Bireysel hayvanlar arasında da farklılıklar mevcuttur. Her bir hayvanın antikor seviyesi başlangıçta oldukça düşük ve benzerken, 14. ve 28. günlerde bazı bireysel farklılıklar görüldü. Özellikle Hayvan 3'te, diğer hayvanlara kıyasla antikor seviyelerinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. Zaman içindeki değişime bakıldığında, 0. günden 14. güne kadar antikor seviyelerinde hızlı bir artış görülürken, 14. günden 28. güne kadar bu artış devam etmiş ancak daha az belirgin bir hızla arttığı görüldü. Bu

durum, aşılanın ardından bağışıklık yanıtının ilk iki hafta içinde en yoğun olduğu, ardından stabil hale geldiğini gösterdi. Genel olarak bakıldığında, aşıli koyunlarda antikor seviyeleri, aşılanın ardından belirgin bir şekilde artmış ve zamanla stabil hale gelmiştir. Bu sonuçlar, aşının etkili olduğunu ve koyunlarda güçlü bir bağışıklık yanıtı oluşturduğunu göstermektedir. Ayrıca, dilüsyon oranı arttıkça antikor seviyelerinin beklenildiği gibi azaldığı ve bireysel farklılıkların bulunduğu gözlemlendi.

Çizelge 4.23. Kontrol grubu koyunlarda Antikor ELISA sonuçları (Bakteri Kaplama)

Dilüsyon	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün	0.gün	14.gün	28.gün
	HAYVAN 6			HAYVAN 7			HAYVAN 8			HAYVAN 9			HAYVAN 10		
4	0,126	0,133	0,139	0,142	0,122	0,163	0,141	0,184	0,178	0,138	0,156	0,135	0,124	0,130	0,087
8	0,133	0,136	0,143	0,150	0,118	0,158	0,139	0,195	0,196	0,146	0,158	0,137	0,122	0,131	0,133
16	0,123	0,129	0,135	0,139	0,086	0,128	0,141	0,180	0,166	0,136	0,140	0,109	0,124	0,092	0,125
32	0,118	0,132	0,139	0,134	0,082	0,122	0,141	0,173	0,180	0,130	0,142	0,109	0,124	0,089	0,111
64	0,121	0,130	0,136	0,137	0,082	0,124	0,150	0,177	0,161	0,133	0,128	0,099	0,132	0,082	0,108
128	0,136	0,130	0,136	0,153	0,091	0,131	0,148	0,199	0,188	0,149	0,144	0,107	0,130	0,091	0,123
256	0,120	0,129	0,135	0,136	0,091	0,127	0,137	0,176	0,178	0,132	0,128	0,099	0,121	0,089	0,114
512	0,112	0,125	0,131	0,127	0,093	0,121	0,143	0,164	0,158	0,123	0,120	0,099	0,126	0,098	0,122

Çizelge 4.23, kontrol grubu koyunlarda antikor seviyelerini ölçmek için yapılan ELISA sonuçlarını göstermektedir. Farklı zaman dilimlerinde (0. gün, 14. gün, 28. gün) ve çeşitli dilüsyon oranlarında (4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512) beş farklı hayvanın (Hayvan 6, 7, 8, 9, 10) antikor seviyeleri incelendi.

Kontrol grubunda gözlemlenen antikor seviyeleri, aşıli gruptaki gibi belirgin bir artış göstermemiş, genel olarak sabit kalmış veya çok az değişmiştir. Antikor seviyeleri, kontrol grubunda aşıli grupta olduğu gibi belirgin bir artış göstermedi; zamanla, 0. gün ile 14. ve 28. günlerde antikor seviyelerinde çok az bir değişiklik gözlemlendi.

Bazı hayvanlarda (örneğin, Hayvan 8) 14. ve 28. günlerde antikor seviyelerinde hafif artışlar gözlenirken, genel olarak bu artışlar minimal düzeyde kaldığı görüldü. Dilüsyon oranı arttıkça, ölçülen antikor seviyeleri genel olarak azalmaktadır. Bu, ELISA testlerinin tipik bir sonucudur. En düşük dilüsyonlarda (4, 8) antikor seviyeleri nispeten daha yüksek iken, en yüksek dilüsyonlarda (256, 512) en düşük seviyededir. Her bir hayvanın antikor seviyelerinde bireysel farklılıklar gözlemlendi. Özellikle Hayvan 8'de 14. ve 28. günlerde diğer hayvanlara kıyasla daha yüksek antikor seviyeleri ölçüldü. Bunun dışında, hayvanlar arasında ciddi bir

farklılık olmamakla birlikte bazı varyasyonlar mevcuttur. Kontrol grubunda, 0. günden 14. ve 28. günlere kadar antikor seviyelerinde belirgin bir değişim olmadığı görüldü.

Bu, kontrol grubunun aşılammamış olduğu ve dolayısıyla bağışıklık yanıtının tetiklenmediği anlamına gelir. Genel olarak bakıldığında, kontrol grubunda antikor seviyeleri zamanla önemli bir değişiklik göstermemiş ve nispeten sabit kalmıştır. Bu durum, kontrol grubundaki koyunların bağışıklık yanıtının tetiklenmediğini ve antikor seviyelerinin doğal varyasyonlar dışında sabit kaldığını gösterdi. Dilüsyon oranı arttıkça antikor seviyelerinde beklenen azalma görülmüş ve bireysel hayvanlar arasında küçük farklılıklar tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, kontrol grubu koyunlarda aşılamanın yapılmadığını ve dolayısıyla güçlü bir bağışıklık yanıtının oluşmadığı sonucuna varıldı.

Çizelge 4.24. Aşılı ve Kontrol grubu koyunlarda Antikor titreleri (Bakteri kaplama ELISA sonuçları)

		Bakteri Kaplama Antikor		
		0. gün	14. gün	28. gün
Aşılı	Hayvan 1	0	128	256
	Hayvan 2	0	64	128
	Hayvan 3	0	128	≥512
	Hayvan 4	0	128	128
	Hayvan 5	0	64	128
Kontrol	Hayvan 6	0	0	0
	Hayvan 7	0	0	0
	Hayvan 8	0	0	0
	Hayvan 9	0	0	0
	Hayvan 10	0	0	0

Çizelge 4.24, aşılı ve kontrol grubu koyunlarda antikor titrelerini (Bakteri kaplama ELISA sonuçları) karşılaştırmaktadır. Aşılı grupta (Hayvan 1-5) ve kontrol grubunda (Hayvan 6-10) 0. gün, 14. gün ve 28. gün ölçülen antikor titreleri verilmiştir. Aşılı grupta, antikor titrelerinin 0. günde sıfır olduğu ve 14. gün ile 28.

gün arasında belirgin bir artış gösterdiği görüldü. Özellikle, Hayvan 1, Hayvan 2 ve Hayvan 5 gibi koyunlarda antikor titrelerinde artış dikkat çekicidir.

Bu durum, aşılanan koyunların bağışıklık sistemlerinin bakteriye karşı tepki verdiğini ve koruyucu antikorlar ürettiğini görüldü. Kontrol grubunda ise, antikor titreleri tüm zaman dilimlerinde sıfır (0) olarak kaldı.

Bu sonuçlar, kontrol grubunda bağışıklık yanıtının tetiklenmediğini ve antikor üretiminin gerçekleşmediğini gösterdi. Aşılanan grup ile kontrol grubu arasındaki farklar, aşılanmanın etkili olduğunu ve koyunlarda güçlü bir bağışıklık yanıtı oluşturduğunu doğruladı. Ayrıca, Hayvan 3 gibi bazı koyunlarda 28. gün antikor titresinin ≥ 512 gibi yüksek bir değere ulaşması, aşının etkinliğini ve bağışıklık yanıtının güçlü olduğunu vurgulamaktadır. Bu bulgular, aşılanan hayvanların bakteriye karşı koruma sağlayabileceğini ve hastalığa karşı direnç geliştirebileceğini gösterdi.

Çizelge 4.25. Aşılı ve Kontrol grubu koyunlarda Antikor titrelerinin karşılaştırılması (Bakteri ve toksin kaplama ELISA sonuçları)

Günler		0. gün		14. gün		28. gün	
Kaplama		Bakteri	Toksin	Bakteri	Toksin	Bakteri	Toksin
Aşılı	Hayvan 1	0	0	128	1024	256	2048
	Hayvan 2	0	0	64	512	128	1024
	Hayvan 3	0	0	128	1024	≥ 512	8192
	Hayvan 4	0	0	128	512	128	512
	Hayvan 5	0	0	64	256	128	8192
Kontrol	Hayvan 6	0	0	0	0	0	0
	Hayvan 7	0	0	0	0	0	0
	Hayvan 8	0	0	0	0	0	0
	Hayvan 9	0	0	0	0	0	0
	Hayvan 10	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.25'te aşılı ve kontrol grubu koyunlarda antikor titrelerinin (Bakteri ve toksin kaplama ELISA sonuçları) karşılaştırılması yapıldı.

Aşılı grup (Hayvan 1-5) ve kontrol grubu (Hayvan 6-10) için 0. gün, 14. gün ve 28. günlerde bakteri ve toksin kaplamalı ELISA sonuçları verildi.

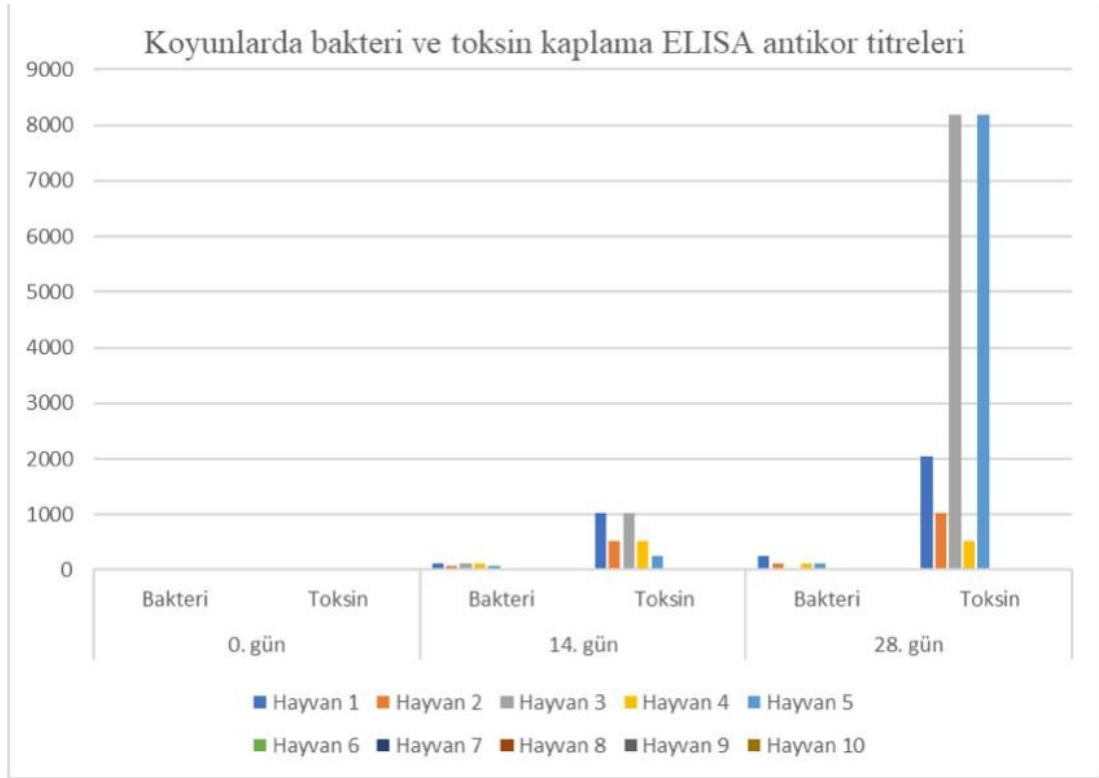
Aşılı grupta, bakteri ve toksin kaplamalı ELISA sonuçları incelendiğinde,

antikor titrelerinin 0. günde sıfır olduğu ve 14. gün ile 28. gün arasında belirgin bir artış gösterdiği görülmektedir. Özellikle, bazı hayvanlarda (örneğin, Hayvan 1 ve Hayvan 3) antikor titrelerindeki artış dikkat çekicidir. 14. günde artan antikor titreleri, aşının etkili olduğunu ve bağışıklık yanıtının başladığını göstermektedir. 28. günde ise antikor titrelerinde daha da belirgin bir artış gözlenmiş ve bu durum, aşının etkinliğinin devam ettiğini ve bağışıklık yanıtının güçlendiğini işaret etmektedir. Özellikle, Hayvan 5'te 28. gün toksin kaplamalı ELISA sonucunda yüksek bir antikor titre tespit edildi.

Kontrol grubunda ise, 0. gün, 14. gün ve 28. günlerde bakteri ve toksin kaplamalı ELISA sonuçlarında herhangi bir antikor tespit edilmedi. Bu sonuçlar, kontrol grubunda aşılamanın olmadığını ve dolayısıyla bağışıklık yanıtının başlamadığını doğrulamaktadır. Aşılanmış grup ile kontrol grubu arasındaki bu farklar, aşılamanın etkili olduğunu ve koyunlarda güçlü bir bağışıklık yanıtı oluşturduğunu göstermektedir. Bu bulgular, aşının bakteri ve toksinlere karşı koruma sağlayabileceğini ve hastalığa karşı etkili bir koruyucu rol oynayabileceğini desteklemektedir.

Beş adet aşıları hayvanda 0. gün, 14.gün ve 28. gün alınan kan serumlarına yapılan Toksin Kaplama antikor ELISA'da 0. gün hayvanlarda hiç antikor olmadığı, 14. gün minimum 1/256 antikor olduğu, 28. günde de minimum 1/512 antikor olduğu yani koruma sağladığı görüldü. Beş adet kontrol grubu hayvanda ise 28.gün sonunda bile antikor miktarının 0 olduğu görüldü.

5 adet aşıları hayvanda 0. gün, 14.gün ve 28. gün alınan kan serumlarına yapılan Bakteri Kaplama antikor ELISA'da 0. gün hayvanlarda hiç antikor olmadığı, 14. gün minimum 1/64 antikor olduğu, 28. günde de minimum 1/128 antikor olduğu yani koruma sağladığı görüldü. Ancak kontrol grubundaki hayvanlarda her iki antikor tipi için de belirgin bir artış gözlenmiyor ve koruyucu düzeylere ulaşılmadı.

Çizelge 4.26. Koyunlarda bakteri ve toksin kaplama ELISA antikor titreleri

5. TARTIŞMA

C. pseudotuberculosis'in neden olduğu hastalık vakaları, 19. yüzyılın sonlarından itibaren birçok ülkede bildirilmiştir. İngiltere'de yetiştirilen bir keçi sürüsünde ilk kez 1989 yılında teşhis edilmiştir. Bu, hastalığın küresel dağılımının ve küçükbaş hayvancılık üzerindeki etkisinin giderek arttığını göstermektedir (Baird ve ark., 2007). Amerika, Avrupa, Asya, Afrika ve Avustralya kıtalarında, tüm dünya coğrafyasında küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin önemli bir problemi olarak değerlendirilmektedir. Bu durum, hastalığın kontrolünün ve önlenmesinin zorluğunu göstermektedir (Baird ve ark., 2007).

Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalar, *C. pseudotuberculosis* hastalığının prevalansının %8 ile %90 arasında değişebileceğini göstermiştir. Bu geniş aralık, hastalığın kontrol ve önleme stratejilerinin bölgeye özgü olması gerektiğini vurgulamaktadır. Prevalansdaki bu değişkenlik, çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir. Bunlar arasında hayvancılık uygulamaları, hijyen ve sanitasyon standartları, bölgesel iklim koşulları ve *C. pseudotuberculosis* suşlarının virülansı yer almaktadır (Brogden ve ark., 1984; Cameron ve ark., 1982; Eggleton ve ark., 1991; Ellis ve ark., 1995).

Formalinle inaktive *C. pseudotuberculosis* aşısının koyunlarda koruyuculuğuna yönelik bir çalışmada, etkenin yüksek dozda intravenöz verilmesi ile pulmoner ödem ve ani ölümler oluşturması sebebiyle tatmin edici, sonuçlar alınması güçleşmiştir. Bununla birlikte, aşılama ile enfeksiyon etkenlerinin letal dozuna karşı koyunlarda koruma sağlanırken, kronik enfeksiyon ile ilişkili lezyonların oluşumu engellenememiştir. Ayrıca, etkili korumanın kan dolaşımındaki antikorlara bağlı olmadığı, hücresel bağışıklığın önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Batey, 1986; Eggleton ve ark., 1991).

Bu çalışma, standart antijen optimizasyonu amacıyla yapılan antijen ELISA'nın sonuçlarını değerlendirerek, yeni üretilen antijenlerin performansını incelemiştir. Sandviç ELISA yöntemi kullanılarak yapılan testlerde, bakteri kültürü ve toksin immunizasyonları sonucu elde edilen tavşan hiperimmun serumları kullanılarak farklı antijen kombinasyonlarının bağlanma kapasitesi ölçülmüştür.

Formülasyonu yapılan bakteri, toksin, bakteri + toksin kültürlerinden hangisinin daha etkin koruma sağlayıp hedef hayvanlarda antikor oluşturup oluşturmadığı değerlendirilmiştir.

Verilerin genel değerlendirmesinde, bakteri+toksin kombinasyonunda yeni ve eski üretilen antijenler karşılaştırıldığında yapılan bağımsız örneklem t testine göre p değeri (0.025) anlamlılık düzeyinden (0.05) küçük olduğundan, sıfır hipotezi reddedilir. Yani, yeni ve eski antijenlerin ortalama etkinlikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu sonucuna varıldı. Bu durumda, yeni üretilen antijenin daha etkin olduğu görüldü.

Analiz sonuçlarına göre, yeni üretilen bakteri+toksin formülasyonunun özellikle toksin kaplama ile daha yüksek bağlanma kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, antijen üretim sürecinde yapılan değişikliklerin etkinliği üzerinde belirgin bir etkisi olduğunu göstermektedir.

Ancak, bu bulguların genel geçerliliğini sağlamak için daha fazla araştırma ve deney yapılması gerekmektedir. Özellikle, farklı koşullar altında yapılan deneylerin sonuçlarına dayanarak, bu sonuçların ne kadar geniş bir yelpazede geçerli olduğu değerlendirilmelidir. Ayrıca, farklı üretim partileri arasındaki tutarlılığın da test edilmesi gerekmektedir.

Hem toksin kaplamalı hem de bakteri kaplamalı serilerin performansı incelenmiş ve bunların formülasyon için uygun konsantrasyonları belirlenmiştir. Yeni üretilen 2 seri bakteri+toksin kültürü de test edilmiştir. Çizelge 4.16'da, toksin kaplamalı standart antijene göre seri sonuçları gösterilmiştir. İlk seri ile ikinci seri karşılaştırıldığında, ikinci serinin genellikle daha yüksek OD değerlerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu da ürünün kullanılmadan önce daha fazla dilüe edilmesi gerektiğine göstermektedir.

Çizelge 4.18' de, ELISA ile standart antijen ve farklı serilerin formülasyonları karşılaştırılmıştır. Her iki seride de standart antijene göre daha yüksek OD değerleri gözlemlenmiştir. En yüksek OD değerleri 32x dilüsyonda elde edilmiştir ve bu değerler her iki seride de standart antijen ile uyumludur. Negatif kontrol sonuçları, testin doğruluğunu ve spesifikliğini teyit eder çünkü negatif kontrol gruplarında beklenildiği gibi bağlanma olmamıştır.

Çizelge 4.19'da, standart antijene göre üretilen diğer serilerin koruma ünit miktarları incelenmiştir. Her iki serinin de standart antijene göre daha yüksek koruma ünit değerlerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, serilerin standart antijene kıyasla yüksek koruma ünit değerlerine sahip olduğunu ve uygun dilüsyon

oranlarıyla kullanıldığında etkili bir koruma sağladığını göstermektedir.

Aşılanmış koyunlarda, 0. gün öncesi antikor seviyeleri düşük ve benzer seviyelerdedir. Ancak, aşılamadan sonra, 14. ve 28. günlerde tüm dilüsyonlarda belirgin bir artış gözlenmiştir, bu da aşının antikor seviyelerini artırdığını göstermektedir. Her hayvan için antikor yanıtı benzer bir artış eğilimi gösterse de, bazı farklılıklar vardır. Örneğin, 28. günde bazı hayvanlarda diğerlerine kıyasla daha yüksek OD değerleri görülmüştür. Düşük dilüsyonlarda genellikle daha yüksek OD değerleri gözlenmiştir, bu da daha yüksek antikor konsantrasyonunu yansıtmaktadır. Yüksek dilüsyonlarda OD değerlerinin azalması beklenen bir durumdur ancak, antikor seviyeleri hala belirgin olduğunu göstermektedir.

Kontrol grubundaki koyunlarda ise, antikor seviyeleri zaman içinde belirgin bir değişiklik göstermemiştir. OD değerleri genellikle düşük seviyelerde kalmıştır ve dilüsyon arttıkça azalma eğilimi göstermiştir. Aşı uygulanmamış kontrol grubunda antikor yanıtı gelişmemiş ve antikor seviyeleri stabil kalmıştır. Bu durum, aşının olmadığı grubun doğal bağışıklık tepkisi geliştirmediğini ve antikor seviyelerinin düşük kaldığını göstermektedir.

Aşılanmış ve kontrol grupları arasında yapılan karşılaştırmada, aşıli grupta gözlenen belirgin antikor artışı ve yüksek antikor titreleri, aşının etkinliğini ortaya koymaktadır. Bakteri + toksin formülasyonu ile aşılanmış koyunlarda zamanla artan antikor titreleri, geliştirilecek aşının antikor oluşturup, bağışıklık sisteminde etkin olabileceğini göstermektedir. Kontrol grubundaki koyunlarda ise, herhangi bir aşı uygulanmadığı için antikor seviyeleri düşük kalmış ve zaman içinde önemli bir değişiklik göstermemiştir.

Aşılanmış gruplarda, zamanla antikor seviyelerinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Her bir hayvanın antikor seviyesi başlangıçta düşük ve benzerken, zamanla bazı bireysel farklılıklar ortaya çıkmıştır. Aşılamadan sonra bağışıklık yanıtı ilk iki hafta içinde en yoğun olmuş, ardından daha stabil hale gelmiştir. Genel olarak, aşılanmış koyunlarda antikor seviyeleri artmış ve zamanla stabil hale gelmiştir, bu da aşının etkili olduğunu ve güçlü bir bağışıklık yanıtı oluşturduğunu göstermektedir.

Kontrol gruplarında ise, antikor seviyeleri genellikle sabit kalmış veya çok az değişmiştir. Aşılanmış gruptaki belirgin artış gözlenmemiş, zamanla antikor seviyelerinde az bir değişiklik olmuştur. Kontrol grubunda aşılanmanın yapılmadığı ve dolayısıyla bağışıklık yanıtının tetiklenmediği görülmüştür. Genel olarak, kontrol

grubunda antikor seviyeleri sabit kalmış ve zamanla önemli bir değişiklik göstermemiştir.

Aşılanmış ve kontrol grupları arasındaki karşılaştırmada, aşılama sonucunda aşılanmış grupta belirgin bir antikor artışı gözlenirken, kontrol grubunda bu tür bir artış görülmemiştir. Bu bulgular, aşının etkinliğini ve koyunlarda güçlü bir bağışıklık yanıtı oluşturduğunu doğrulamaktadır.

Literatürde de benzer şekilde, PLD önemli bir virülens faktör olduğundan, pld geninin genetik inaktivasyonu canlı bir rekombinant aşı için temel sağlayabilir. PLD geni olmayan *C. pseudotuberculosis* (Toxminus) suşundan 107 bakterinin koyunlara verilmesiyle, virulent *C. pseudotuberculosis* ile apselerin oluşmadığı görülmüştür (Hodgson ve ark., 1992). Formalin ile inaktive edilen ekzotoksinin kobaylara uygulamalarının homolog çelince karşı bir dereceye kadar koruma sağladığı bildirilmiştir. Bundan dolayı, hastalığın patogeneğinde etkin rol oynayan PLD'nin de korumada faydalı olabileceği fikri üzerinde durulmuştur (Eggleton ve ark., 1991a).

Avusturalya'da klostridial aşılar ile kombine edilen bir *C. pseudotuberculosis* aşısı mevcuttur (Eggleton ve ark., 1991b). Bu aşı ile aşılanan keçilerde, *C. pseudotuberculosis* suşuyla yapılan deneysel enfeksiyonlara karşı lezyonların görülme sıklığında azalma ile birlikte belirgin bir koruma sağlandığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, klostridial komponentlerle kombine edilen aşılardan tek başına hazırlanan aşılardan daha iyi koruma sağladığı bildirilmiştir (Anderson & Narin, 1984). KLA'ya karşı koruma humoral ve hücrel olmakla birlikte, PLD dolaşımdaki antikorları nötralize etmektedir (Batey, 1986). PLD'nin formalinle muamelesi sonrasında çok az bir kısmının (%1) aktif kaldığı ve koruma için yeterli olduğu belirtilmektedir. Genetik olarak inaktif ve formalin ile inaktif PLD aşılı koyunları aşıladıklarını ve *C. pseudotuberculosis* ile çelince yaptıklarını bildirmişlerdir (Hodgson ve ark., 1999). *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonuna karşı genetik olarak inaktif PLD aşısının %44 ve formalinli aşısının %95 oranında koruma sağladığını belirtmişlerdir. *C. pseudotuberculosis*'in sekret ve ekskretlerinin humoral ve hücrel bağışıklığı uyarmasından dolayı aşı geliştirilmesinde önemli bir potansiyele sahip olduklarını ifade edilmiştir (Hodgson ve ark., 1999).

Koyunları çeşitli *C. pseudotuberculosis* aşılı (rekombinant PLD, formalin ile inaktif bakterin veya rekombinant PLD ilaveli bakterin) ile immunize ettiklerini; çelince sonrasında PLD ve bakterin aşılardan enfeksiyona karşı belirgin bir koruma sağladığını gözlediklerini belirtmişlerdir. Daha da önemlisi kombine aşının

enfeksiyona karşı tam bir koruma sağlanmasında başarılı olduğunu ve bütün aşıları hayvanlarda çelinc suşunun elimine olduğunu rapor etmişlerdir (Fontaine ve ark., 2006).

C. pseudotuberculosis'in neden olduğu kazeöz lenfadenitis, hayvan ölümleri, karkas değerinde düşüş ve tedavi masrafları yoluyla önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu kayıplar, küçükbaş hayvancılık ile uğraşan çiftçileri ve bu sektörden gelir elde eden diğer kişileri doğrudan etkilemektedir (Baird ve ark., 2007).

C. pseudotuberculosis enfeksiyonu, lenf düğümlerinde şişme ve apseler, ateş, halsizlik, iştahsızlık ve kilo kaybı gibi belirtilere neden olabilir. Hastalık ilerledikçe, enfeksiyon internal organlara yayılabilir ve ölümcül olabilir. Kontrolü ve önlenmesi için çeşitli stratejiler mevcuttur. Bunlar arasında sanitasyon ve hijyen uygulamalarının iyileştirilmesi, hayvanların aşılınması ve hastalıklı hayvanların izole edilmesi yer almaktadır. Araştırmacılar, hastalığa karşı daha etkili aşılar ve tedavi yöntemleri geliştirmek için çalışmalar yürütmektedir (Baird ve ark., 2007).

Hayvancılık uygulamaları ve hayvan hareketleri, *C. pseudotuberculosis*'in yeni bölgelere taşınmasına ve yayılmasına katkıda bulunabilir. Bu durum, özellikle hijyen ve sanitasyon standartlarının düşük olduğu bölgelerde hastalığın prevalansında artışa neden olabilir. Küresel yayılımını ve farklı coğrafyalardaki suşlar arasındaki benzerliği daha iyi anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu araştırmalar, hastalığın kontrol ve önlenmesi için daha etkili stratejiler geliştirilmesine yardımcı olabilir (Olson ve ark., 2002).

C. pseudotuberculosis izolatlarının teşhisinde biyokimyasal testler, yaygın olarak kullanılan ve önemli bir rol oynayan yöntemler arasındadır. Özellikle oksidaz ve katalaz testleri, bu amaçla en sık kullanılan testlerdendir (Çetinkaya ve ark., 2002; Pacheco ve ark., 2007). Çalışmamızda da bu iki testin *C. pseudotuberculosis* izolatlarının teşhisinde etkinliğini doğruladık. Sonuçlarımız, oksidaz ve katalaz testlerinin *C. pseudotuberculosis*'in diğer bakterilerden ayrıştırılmasında ve doğru teşhis konmasında önemli bir araç olduğunu göstermektedir.

Bunun yanında, çalışmamızda kullanılan Vitek 2 sistemi ile elde edilen biyokimyasal özellikler arasında da benzerlikler gözlemlenmiştir. Bu bulgu, Vitek 2 sisteminin *C. pseudotuberculosis* izolatlarının teşhisinde güvenilir bir araç olduğunu ve farklı laboratuvarlar arasında tutarlı sonuçlar sağlayabileceğini göstermektedir.

Canlı zayıflatılmış veya inaktifleştirilmiş bakterilerden oluşan bakteri formülasyonları, *C. pseudotuberculosis*'e karşı uzun süreli bağışıklık sağlayabilir. Bu formülasyonlar, geleneksel aşılarda sağladığı hücrel ve humoral bağışıklık tepkilerini tetikleyebilir. Canlı zayıflatılmış bakteriler, daha güçlü bir bağışıklık tepkisi sağlayabilir, ancak canlı bakterilerin taşıdığı riskler nedeniyle inaktifleştirilmiş bakterilerden daha az tercih edilir. İnaktifleştirilmiş bakteriler, daha güvenlidir ancak bağışıklık tepkisi canlı zayıflatılmış bakteriler kadar güçlü olmayabilir.

Toksin formülasyonları, *C. pseudotuberculosis*'in ürettiği toksinlerden oluşur. Bu formülasyonlar, bağışıklık sistemini toksinlere karşı duyarlı hale getirerek çalışır. Toksin formülasyonları, daha az riskli ve daha kolay üretilebilir olabilir. Ancak toksin formülasyonlarının etkinliği bakteri formülasyonlarına göre daha az olabilir ve bağışıklık tepkisi sadece humoral bağışıklık ile sınırlı kalabilir.

Bakteri ve toksin formülasyonlarının kombinasyonu, iki yaklaşımın da avantajlarını bir araya getirebilir. Bu tür formülasyonlar, güçlü bir bağışıklık tepkisi sağlayabilirken riskleri de azaltabilir. Kombine formülasyonlar, *C. pseudotuberculosis*'e karşı en umut verici aşı adaylarından biri olarak kabul edilir. Yaptığımız çalışmada da Bakteri +Toksin formülasyonlarının daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür.

ELISA, *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonunun teşhisinde kullanılan yaygın bir serolojik yöntemdir. Bu çalışmada, *C. pseudotuberculosis* antikor ELISA'sının performansı çalışılmıştır. Çalışmamızda, antikor ELISA'nın sonuçlarına göre hayvanlarda yüksek koruma sağladığı gösterilmiştir. Bu bulgular, antikor ELISA'nın *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonunun teşhisinde güvenilir bir yöntem olduğunu göstermektedir.

C. pseudotuberculosis antijen ELISA'sı, enfeksiyonun erken aşamasında bile bakterilerin varlığını tespit edebilme özelliği ile antikor ELISA'sına göre önemli bir avantaja sahiptir. Bu durum, özellikle akut enfeksiyonlarda antikorların oluşması için zamanın yetmediği durumlarda kritik önem taşır. Ayrıca, antijen ELISA'sı daha yüksek spesifiteye sahip olarak çapraz reaksiyon riskini azaltır.

KLA ile mücadelede hayvan hijyeninin sağlanması önemlidir. Aşılama da hastalığın önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ancak, *C. pseudotuberculosis* izolatlarında serotip ve genotip farklılıkları olduğu bilinmektedir.

Bu durum, ticari aşılarda her zaman yeterli koruma sağlamayabileceği anlamına gelir. Bazı araştırmalar, yerel/ülkesel suşlardan hazırlanan aşılarda daha yüksek etkinlik sağlayabileceğini göstermiştir. Bunun sebebi, yerel aşılarda bölgedeki yaygın suşlara karşı özel olarak oluşturulmuş olmasıdır. Bu nedenle, KLA ile mücadelede yerel/ülkesel aşılarda geliştirilmesi ve kullanımı önemli bir araştırma ve uygulama alanıdır.

Genel olarak baktığımızda, *C. pseudotuberculosis* izolatlarının teşhisinde kullanılan biyokimyasal testlerin, özellikle oksidaz ve katalaz testlerinin, etkinliği doğrulanmıştır. Bu testler, *C. pseudotuberculosis*'in diğer bakterilerden ayrıştırılmasında ve doğru teşhis konmasında önemli araçlardır. Ayrıca, Vitek 2 sistemi ile elde edilen biyokimyasal özellikler, sistemin güvenilir bir teşhis aracı olduğunu ve farklı laboratuvarlar arasında tutarlı sonuçlar sağlayabileceğini göstermiştir.

Aşı geliştirme çalışmaları kapsamında, canlı zayıflatılmış ve inaktifleştirilmiş bakteri formülasyonlarının, *C. pseudotuberculosis*'e karşı uzun süreli bağışıklık sağlama potansiyeli üzerinde durulmuştur. Canlı zayıflatılmış bakteriler, daha güçlü bağışıklık tepkileri sağlarken, taşıdıkları riskler nedeniyle inaktifleştirilmiş bakterilere göre daha az tercih edilir. İnaktifleştirilmiş bakteriler ise daha güvenli olmasına rağmen bağışıklık tepkisi daha zayıf olabilir. Toksin formülasyonları, bağışıklık sistemini toksinlere karşı duyarlı hale getirerek çalışır ve daha az riskli, kolay üretilebilir olmalarına rağmen etkinlikleri sınırlı kalabilir.

Bakteri ve toksin formülasyonlarının kombinasyonu, güçlü bağışıklık tepkisi sağlama potansiyeli ile en umut verici aşı adaylarından biri olarak kabul edilir. Çalışmamızda da bu kombinasyonun daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür.

Serolojik teşhis yöntemlerinden ELISA, *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonlarının teşhisinde yaygın olarak kullanılır. Antikor ELISA'sı, yüksek koruma sağladığını gösterirken, antijen ELISA'sı enfeksiyonun erken aşamasında bakterilerin varlığını tespit edebilme avantajına sahiptir. Antijen ELISA'sı, daha yüksek spesifite ile çapraz reaksiyon riskini azaltır. Kazeöz lenfadenit (KLA) ile mücadelede antibiyotik tedavisi ve hayvan hijyeninin sağlanması önemlidir. Aşılama da hastalığın önlenmesinde kritik bir rol oynar. Ancak, *C. pseudotuberculosis* izolatlarındaki serotip ve genotip farklılıkları, ticari aşılarda her zaman yeterli koruma sağlamayabileceğini göstermektedir. Yerel/ülkesel suşlardan hazırlanan aşılarda, bölgedeki yaygın suşlara karşı daha yüksek etkinlik sağlayabileceği görülmüştür. Bu

nedenle, KLA ile mücadelede yerel/ülkesel aşıların geliştirilmesi ve kullanımı önemli bir araştırma ve uygulama alanıdır.

6. SONUÇLAR

Bu çalışma, *C. pseudotuberculosis*'in koyun sürülerinde neden olduğu KLA hastalığının patogeneğinde önemli rol oynayan virülans faktörlerini ve bu hastalığın kontrolü için mevcut tedavi ve önleme yöntemlerini değerlendirmektedir. Araştırmalar, *C. pseudotuberculosis*'in en etkili virülans faktörünün, hücre zarında yapısal bozukluklara yol açarak hastalığın yayılmasını kolaylaştıran PLD ekzotoksini olduğunu göstermiştir. Türkiye'de KLA'nın yaygınlığına ilişkin bölgesel çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, ülke genelinde kapsamlı bir epidemiyolojik çalışma eksikliği bulunmaktadır. Bununla birlikte, mevcut veriler hastalığın özellikle koyun sürülerinde yaygın olduğunu ortaya koymaktadır. Tedavi seçeneklerinin sınırlı olması ve antibiyotiklerin etkisizliği, enfeksiyonun kontrol altına alınmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, aşı kullanımı ve hijyen uygulamaları hastalığın önlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Mevcut aşılar ve aşı geliştirme çalışmaları, hastalığın kontrolü için umut vaat etmektedir, ancak henüz %100 etkili bir aşı formülüne ulaşamamıştır. Bu bağlamda, farklı bölgelerden izole edilen suşlara özgü aşıların geliştirilmesi ve kullanılması gerekmektedir.

Aşılar, KLA'ya karşı immünoprofilaktik koruma sağlamak için kullanılır ve bakterinin tüm antijenleri, zayıflatılmış veya inaktive edilmiş *C. pseudotuberculosis* suşları, kültür süpernatantlarından izole edilen antijenler ve DNA aşıları gibi çeşitli aşılar geliştirilmiştir. Ancak henüz %100 etkili bir aşı formülü geliştirilemediğinden farklı bölgelerden izolatların farklılık gösterebileceği, aşıların hedef aşılama bölgesinden izole edilen suşlar kullanılarak hazırlanması gerekmektedir.

Bakteri ve toksin kaplama ELISA sonuçları da incelendiğinde, aşılanmış gruplarda antikor titrelerinde belirgin bir artış gözlenmiş, kontrol grubunda ise herhangi bir antikor tespit edilmemiştir. Bu da aşılanan koyunlarda bakteri ve toksinlere karşı koruma sağlayabileceğini ve etkili bir koruyucu rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, aşılanan koyunlarda etkili bir bağışıklık yanıtı oluşturduğunu ve hastalığa karşı koruma sağladığını desteklemektedir. Aşılanmış gruplarda gözlenen antikor artışı ve kontrol grubundaki sabit antikor seviyeleri, aşının etkinliğini açıkça ortaya koymaktadır.

7. ÖNERİLER

C. pseudotuberculosis hastalıklarını önlemek ve kontrol etmek için etkili bir aşı geliştirme ihtiyacı önemlidir. *C. pseudotuberculosis*'e karşı bilinen aşılardan bakterisinin kendisi veya toksoid formülasyonlarına dayalı olarak doğrulamalarının önemi ve sonuçları seçilebilir. *C. pseudotuberculosis*'e karşı aşının yayılması için iki temel yaklaşım bulunmaktadır: canlı bakteri aşılı ve toksoid aşılı. Canlı bakteri aşılı, güçlendirilmiş veya modifiye edilmiş *C. pseudotuberculosis* bakterilerini içerir. Bu aşılı, enfeksiyon sistemi doğrudan bakteriye karşı reaksiyon gösterdiği için ortaya çıkar. Toksoid aşılı, *C. pseudotuberculosis* bakterisinin meydana geldiği inaktive edilmiş (toksoid) formülasyonlarını içerir. Bu toksoidler, metabolizma sisteminin patojenlerinin ortaya çıkmasına karşı reaksiyon uygulamalarını teşvik eder. Toksoid aşılı genellikle daha güvenli olarak kabul edilir, ancak bazen daha zayıf bir istikrarın sağlanmasına neden olabilirler. *C. pseudotuberculosis*'e karşı aşılardan Bakteri + Toksin formülasyonlarıyla hazırlanan aşılardan daha iyi koruma sağladığı için kullanılması daha uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

- Achal, P., Nicholas, M. V., & Jerr, B. U. (2005). Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nature Medicine*, 11(4), 63–68. <https://doi.org/10.1038/nm0405-63>
- Akman, M., & Gülmezoğlu, E. (1980). *Tıbbi mikrobiyoloji* (3rd ed.). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- Anderson, M. L., & Narin, M. E. (1984). Control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. In *Les maladies de la chèvre: Les colloques de l'INRA* (Vol. 28, pp. 605–609).
- Anonim. (2013). Enzimler. Retrieved from <http://www.balikesir.edu.tr/~osinan/enzimsaf.html>
- Arda, M., Mimbay, A., Aydın, N., Leloğlu, N., & Akay, Ö. (1992). *Özel Mikrobiyoloji*. Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi.
- Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., İzgür, M., & Diker, K. S. (1997). *Özel mikrobiyoloji* (4. baskı). Medisan Yayınları.
- Aydın, N. (1977). *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* suşlarının ve ekzotoksinlerinin antijenik özellikleri üzerinde araştırmalar (Doctoral dissertation). Ankara University, Ankara, Turkey.
- Baird, G. K., & Fontaine, T. A. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In *Infectious diseases of sheep and goats* (pp. 429–448).
- Barksdale, L., Linder, R., Sulea, I. T., & Pollice, M. (1981). Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (formerly *Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 13(6), 1046-1051. <https://doi.org/10.1128/JCM.13.6.1046-1051.1981>
- Batey, R. G. (1986). Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Australian Veterinary Journal*, 63(10), 269–272.
- Batey, R. G. (1986). Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Australian Veterinary Journal*, 63(9), 269–272. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1986.tb12218.x>
- Berg, A., Rodseth, O. M., & Hansen, T. (2007). Fish size at vaccination influences the development of side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 265(1–4), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.014>
- Bernheimer, A. W., Linder, R., & Avigad, L. S. (1980). Stepwise degradation of membrane sphingomyelin by corynebacterial phospholipases. *Infection and Immunity*, 29(1), 123-131. <https://doi.org/10.1128/IAI.29.1.123-131.1980>
- Biberstein, E. L., Knight, H. D., & Jang, S. (1971). Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *The Veterinary Record*, 89(26),

691-692. <https://doi.org/10.1136/vr.89.26.691>

- Bilgehan, H. (1995). *Gram olumlu koklar*. Klinik Mikrobiyoloji Tanı. İzmir: Barış Yayınları.
- Billington, S. J., Esmay, P. A., Songer, J. G., & Jost, B. H. (2002). Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, 208(1), 41-45. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00543-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00543-0)
- Brogden, K. A., Cutlip, R. C., & Lehmkuhl, H. D. (1984). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. *American Journal of Veterinary Research*, 45(8), 1532-1534. <https://doi.org/10.2460/ajvr.1984.45.1532>
- Burrell, D. H. (1980). A haemolysis inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium ovis* exotoxin. *Research in Veterinary Science*, 28(2), 190-194. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)31483-3](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31483-3)
- Cameron, C. M., Minnaar, J. L., Engelbrecht, M. M., & Purdom, M. R. (1972). Immune response of Merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 39(1), 27-34. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v39i1.1064>
- Connor, K. M., Quirie, M. M., Baird, G., & Donachie, W. (2000). Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2633-2637. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2633-2637.2000>
- Çetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin, R., De Baere, T., & Vaneechoutte, M. (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Veterinary Microbiology*, 88(1-2), 75-83. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00132-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00132-4)
- D'Afonseca, V., Prosdocimi, F., Dorella, F. A., Pacheco, L. G. C., Moraes, P. M., Pena, I., ... & Azevedo, V. (2010). Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Microbiological Research*, 165(4), 312-320. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.10.003>
- Dorella, F., Pacheco, L. G. C., Oliveira, S., Miyoshi, A., & Azevedo, V. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research*, 37(2), 201-218. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005048>
- Egen, N. B., Cuevas, W. A., McNamara, P. J., Sammons, D. W., Humphreys, R., & Songer, J. G. (1989). Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. *American Journal of Veterinary Research*, 50(8), 1319-1322. <https://doi.org/10.2460/ajvr.1989.50.1319>
- Eggleton, D. G., Doidge, C. V., Middleton, H. D., & Minty, D. W. (1991). Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: Efficacy of

- monocomponent *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid vaccine and combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Australian Veterinary Journal*, 68(10), 320–321. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1991.tb09244.x>
- Eggleton, D. G., Doidge, C. V., Middleton, H. D., & Minty, D. W. (1991). Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: Efficacy of the monocomponent *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid vaccine and combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Australian Veterinary Journal*, 68(10), 320–321.
- Eggleton, D. G., Haynes, J. A., Middleton, H. D., & Cox, J. C. (1991a). Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: Correlation between *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid contents and protective efficacy in combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Australian Veterinary Journal*, 68(10), 322–325.
- Eggleton, D. G., Middleton, H. D., Doidge, C. V., & Minty, D. W. (1991b). Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: Comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. *Australian Veterinary Journal*, 68(10), 317–319.
- Ellis, J. A., Campos, M., Snyder, M., Chelak, B., & Haines, D. M. (1995). Local production of tumor necrosis factor- α in corynebacterial pulmonary lesions in sheep. *Veterinary Pathology*, 32(1), 68–71. <https://doi.org/10.1177/030098589503200114>
- Erganiş, O., Kaya, O., Ateş, M., & Istanbuluoğlu, E. (1990). Microbiological studies on purulent lymph nodes of sheep slaughtered at the abattoir of the Konya Meat and Fish Organization and a serological survey. *Veterinarium*, 1(1), 8–11.
- Erganiş, O. (2010). Koyunlarda mikrobik hastalıklardan korunmada aşı kullanımının önemi. *Uzunyayla Dergisi*, 3, 16–19.
- Erganiş, O., Kaya, O., Ateş, M., & Istanbuluoğlu, E. (1990). Microbiological studies on purulent lymph nodes of sheep slaughtered at the abattoir of the Konya Meat and Fish Organization and a serological survey. *Veterinarium*, 1(1), 8–11.
- Fontaine, M. C., Baird, G. J., Connor, K. M., Rudge, K., Sales, J., & Donachie, W. (2006). Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*, 24(43-44), 5986-5996. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.011>
- Fontaine, M. C., Baird, G. J., Connor, K. M., Rudge, K., Sales, J., & Donachie, W. (2006). Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*, 24(32), 5986–5996. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.032>

- Freney, J., Duperron, M. T., Courtier, C., Hansen, W., Allard, F., Boeufgras, J. M., ... & Fleurette, J. (1991). Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(1), 38–41. <https://doi.org/10.1128/JCM.29.1.38-41.1991>
- Goldberger, A. C., Lipsky, B. A., & Plorde, J. J. (1981). Suppurative granulomatous lymphadenitis caused by *Corynebacterium ovis* (pseudotuberculosis). *American Journal of Clinical Pathology*, 76(4), 486–490. <https://doi.org/10.1093/ajcp/76.4.486>
- Hadimli, H. H., Erganiş, O., Sayın, Z., & Yıldırım, B. (2007). Fare ve koyunlarda ginseng katılmış inaktif *Salmonella Typhimurium* aşılarının etkinliği. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 21(2), 17–24.
- Hanahan, D. J., & Chaikoff, I. L. (1947). Phosphorus-containing lipides of the carrot. *Journal of Biological Chemistry*, 168(1), 233–240. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64373-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64373-6)
- Hodgson, A. L., Tachedjian, M., Corner, L. A., & Radford, A. J. (1994). Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity*, 62(12), 5275–5280. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.12.5275-5280.1994>
- Hodgson, A. L. M., Carter, K., Tachedjian, M., Krywult, J., Corner, L. A., McColl, M., & Cameron, A. (1999). Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine*, 17(6), 802–808. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00286-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00286-3)
- Hodgson, A. L. M., Krywult, J., Corner, L. A., Rothel, J. S., & Radford, A. J. (1992). Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infection and Immunity*, 60(7), 2900–2905.
- İlhan, Z. (2020). Kazeöz lenfadenitisli koyunlardan izole edilen *Corynebacterium pseudotuberculosis* suşlarının in-vitro antibiyotik duyarlılıkları. *Kocatepe Veterinary Journal*, 13(3), 267–271. <https://doi.org/10.33784/kocatepevetj.761176>
- İzgür, M., Akan, M., & İlhan, Z. (1999). Koyunlarda kazeöz lenfadenitis olgularından izole edilen etkenler. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 46(1), 43–50.
- Ilhan, Z. (2013). Detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep lymph nodes by PCR. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 164(2), 60–66. <https://doi.org/10.19182/rmv.2013.2.285>
- Jones, D., & Collins, M. D. (1986). Irregular, nonsporing Gram-positive rods. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (pp. 1261–1282). Williams and Wilkins.
- Kampstrup, S., Roensholt, L., Jensen, M. H., & Dalsgaard, K. (2006). Production of

- a highly immunogenic subunit ISCOM vaccine against Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vaccine*, 24(8), 1140–1146. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.018>
- Khamis, A., Raoult, D., & La Scola, B. (2004). rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), 3925–3931. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.9.3925-3931.2004>
- Li, H., Yang, H., Zhou, Z., Li, X., Yi, W., Xu, Y., ... & Hu, S. (2018). Isolation, antibiotic resistance, virulence traits and phylogenetic analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in southwestern China. *Small Ruminant Research*, 168, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.09.003>
- Lloyd, S., Lindsay, H. J., Slater, J. D., & Jackson, P. G. G. (1990). Caseous lymphadenitis in goats in England. *Veterinary Record*, 127(19), 487–490. <https://doi.org/10.1136/vr.127.19.487>
- Lund, A., Almlid, T., Larsen, H. J., & Steine, T. (1982). Antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in adult goats from a naturally infected herd. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 23(4), 473–479. <https://doi.org/10.1186/BF02979019>
- Magdy, H. A.-G., Salama, A. O., Mohamed, S., Ahmed, B., & Atef, F. (2010). Abattoir survey on caseous lymphadenitis in sheep and goats in Tanta, Egypt. *Small Ruminant Research*, 89(2-3), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.007>
- Menzies, P. I., Muckle, C. A., Hwang, Y. T., & Songer, J. G. (1994). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *Small Ruminant Research*, 13(2), 193–198. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(94\)90034-6](https://doi.org/10.1016/0921-4488(94)90034-6)
- Muckle, C. A., & Gyles, C. L. (1986). Exotoxin activities of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Current Microbiology*, 13(1), 57–60. <https://doi.org/10.1007/BF01570698>
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2), 86–91. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3397213/>
- Pacheco, L. G., Pena, R. R., Castro, T. L., Dorella, F. A., Bahia, R. C., Carminati, R., ... & Azevedo, V. (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*, 56(4), 480–486. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46709-0>
- Pathirana, H. N. K. S., Cho, H. S., Cho, Y. I., Kim, C. L., Wimalasena, S. H. M. P., Rajapaksha, L. G. T. G., ... & Shin, G. W. (2022). Molecular characterization

- and antimicrobial susceptibility of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from skin abscesses of native Korean goats (*Capra hircus coreanae*). *Journal of Applied Microbiology*, 133(3), 2074-2082. <https://doi.org/10.1111/jam.15662>
- Paton, M. W. (2000). Applying the experience of KLA in the Southern Hemisphere. In *Proceedings of the Moredun Research Institute/Scottish Agricultural College Workshop on Caseous Lymphadenitis* (pp. 3-15). Moredun Research Institute.
- Paton, M. W., Collett, M. G., Pepin, M., & Bath, G. F. (2005). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. In J. A. W. Coetzer & R. C. Tustin (Eds.), *Infectious diseases of livestock* (3rd ed., pp. 1917-1930). Oxford University Press Southern Africa.
- Paton, M. W., Rose, I. R., Hart, R. A., Sutherland, S. S., Mercy, A. R., Ellis, T. M., & Dhaliwal, J. A. (1994). New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Australian Veterinary Journal*, 71(2), 47-49. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1994.tb05351.x>
- Peel, M. M., Palmer, G. G., Stacpoole, A. M., & Kerr, T. G. (1997). Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of ten cases from Australia and review. *Clinical Infectious Diseases*, 24(2), 185-191. <https://doi.org/10.1086/515701>
- Pepin, M., Paton, M., & Hodgson, A. L. M. (1994). Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Current Topics in Veterinary Research*, 1, 63-82.
- Pincus, D. H. (2006). Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system. In *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods* (pp. 1-32). Bethesda, MD: Parenteral Drug Association.
- Piontkowski, M. D., & Shivvers, D. W. (1998). Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 212(11), 1765-1768. <https://doi.org/10.2460/javma.1998.212.1765>
- Ramakrishnan, M. A. (2016). Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World Journal of Virology*, 5(2), 85-86. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27, 493-497.
- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113-128. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.11.003>
- Sakmanoğlu, A., Hadimli, H. H., Erganiş, E., Pınarkara, Y., Sayın, Z., & Kav, K. (2015). Koyunlardan izole edilen *Corynebacterium pseudotuberculosis* suşlarının identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Eurasian Journal*

- Saygı, Ş. (2003). Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45(3), 291–298. <https://doi.org/10.36891/gthd.645379>
- Seddik, I., Timawy, E. L., El-Amrousi, A. A., Zaki, S., El-Allawy, M. M., & Aziz, T. C. K. (1983). Some studies on caseous lymphadenitis of sheep in Upper Egypt. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 11(1), 99–106.
- Selim, S. A. (2001). Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. *Journal of Veterinary Medicine B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 48(4), 241–258. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2001.00427.x>
- Shigidi, M. T. A. (1979). A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. *British Veterinary Journal*, 135(2), 172–177. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)33881-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)33881-7)
- Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(26), 32678–32684. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)37487-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)37487-2)
- Solanet, J. J., Malena, R., Estein, S. M., & Paolicchi, F. A. (2011). Development of an ELISA test to detect antibodies in vaccinated sheep or infected *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Revista Argentina de Microbiología*, 43(1), 9–17. <https://doi.org/10.1590/S0325-75412011000100002>
- Songer, J. G., Libby, S. J., Iandolo, J. J., & Cuevas, W. A. (1990). Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 58(1), 131–136. <https://doi.org/10.1128/IAI.58.1.131-136.1990>
- Srivastava, A., Alam, P., & Caughey, B. (2022). RT-QuIC and related assays for detecting and quantifying prion-like pathological seeds of α -synuclein. *Biomolecules*, 12(4), 576. <https://doi.org/10.3390/biom12040576>
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A., & Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 479–491. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-479>
- Stanford, K., Brogden, K. A., McClelland, L. A., Kozub, G. C., & Audibert, F. (1998). The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 62(1), 38–42. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3404798/>
- Stapleton, S., Bradshaw, B., & O’Kennedy, R. (2009). Development of a surface plasmon resonance-based assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Analytica Chimica Acta*, 651(1), 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.017>

- Stefańska, I., Gieryńska, M., Rzewuska, M., & Binek, M. (2010). Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocyte death. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13(1), 143–149. <https://doi.org/10.2478/v10181-010-0017-5>
- Sutherland, S. S., Hart, R. A., & Buller, N. B. (1993). Ribotype analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats. *Australian Veterinary Journal*, 70(12), 454–456. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1993.tb07854.x>
- Ter Laak, E. A., Bosch, J., Bijl, G. C., & Schreuder, B. E. (1992). Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 53(7), 1125–1132. <https://doi.org/10.2460/ajvr.1992.53.1125>
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). (2023). Hayvansal üretim istatistikleri [Animal production statistics]. Retrieved from <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-2023-49681>
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., & van Sinderen, D. (2007). Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 495–548. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>
- Walker, J., Jackson, H. J., Eggleton, D. G., Meeusen, E. N., Wilson, M. J., & Brandon, M. R. (1994). Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Infection and Immunity*, 62(6), 2562–2567. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.6.2562-2567.1994>
- Wigdorovitz, A., Carrillo, C., Dus Santos, M., Trono, J. K., Peralta, A., Gómez, M. C., Ríos, R. D., Franzone, P. M., Sadir, A. M., Escibano, J. M., & Borca, M. V. (1999). Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice either orally or parenterally immunized with alpha transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology*, 257(2), 347–353. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9695>
- Williamson, L. H. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 17(2), 359–371. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30085-7](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30085-7)
- Zaitoun, A. M., & Bayoumi, A. H. (1994). Some epidemiological studies on ovine pseudotuberculosis. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 31(61), 238–250.
- Zasada, A. A., & Mosiej, E. (2018). Contemporary microbiology and identification of *Corynebacteria* spp. causing infections in humans. *Letters in Applied Microbiology*, 66(6), 472–483. <https://doi.org/10.1111/lam.12895>