

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Rhodococcus equi* VapA Geninin Rekombinasyonu, Proteinin
Saflaştırılması ve Aşı Hazırlanması**

Gökçenur SANİOĞLU GÖLEN

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

KONYA-2019

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Rhodococcus equi* VapA Geninin Rekombinasyonu, Proteinin
Saflaştırılması ve Aşı Hazırlanması**

Gökçenur SANİOĞLU GÖLEN

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

İkinci Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Aslı SAKMANOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından **18202003** proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA-2019

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora Öğrenci Gökçenur SANIOĞLU GÖLEN tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Veterinerlik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı- Danışman: Prof.Dr. Osman ERGANİŞ

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Üye: Prof.Dr.Hakan YARDIMCI

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Üye: Prof.Dr. Sibel YAVRU

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Üye: Prof.Dr. Uçkun Sait UÇAN

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Üye: Prof.Dr. Murat YILDIRIM

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi

ONAY :

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hasan HüseyinDÖNMEZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Rhodococcus equi (*R. equi*), 6 aydan küçük taylarda pyogranüloz bronkopnömoniye neden olan Gram pozitif, hareketsiz, zorunlu aerob, hücre içi mikroorganizmadır. Enfeksiyondan korunmada neonatal taylarda bağışıklığın yeterince gelişmemesi nedeniyle gebe kısırakların aşılınması önem arz etmektedir. *R. equi* enfeksiyonuna yönelik aşı çalışmaları bulunmasına rağmen yaygın olarak kullanılan ruhsatlı etkili aşı bulunmamaktadır. Biyoteknoloji alanında hızlı ilerlemeler mikrobiyoloji alanında da devam etmektedir ve rekombinant DNA teknolojisinin önemi de günden güne artmaktadır. Bu çalışmada, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak sahadan izole edilen *R. equi*' den rekombinant VapA proteininin elde edilmesi ve antijenik benzerliğinin doğal VapA ile karşılaştırılması, 2 farklı adjuvant ile kombine edilerek 4 farklı aday aşının geliştirilmesi amaçlandı.

Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgilerini ve desteklerini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleri ile çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren danışman hocalarım Prof.Dr. Osman ERGANİŞ ve Dr.Öğr. Üyesi Aslı SAKMANOĞLU' na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmam sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen S.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD Öğretim üyeleri Prof. Dr. U. Sait UÇAN, Prof. Dr. H. Hüseyin HADİMLİ, Doç. Dr. Zafer SAYIN'a ve Öğr. Gör. Yasemin PINARKARA'ya, Arş. Gör. Ali USLU' ya, doktora dönemi arkadaşlarım Ayşegül İLBAN'a, Bilal Al- OBAİDİ ye, Mustafa M. SAEED' e, Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD öğretim üyesi Doç.Dr. Zeki Aras' a, hayatım boyunca emeği geçen Prof.Dr. Fatma Aslan, Prof.Dr. Halil Taşkın'a, tez projemin yürütülebilmesi için gerekli desteği sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne ve çalışmalarım boyunca ilgi ve desteğini hiç esirgemeyen sevgili eşim ve sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ÖZET.....	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tanım.....	1
1.2. Tarihçe.....	2
1.3.Taksonomi	2
1.4. Etiyoloji	3
1.5. Epidemiyoloji	6
1.6. Virülens Faktörleri	8
1.6.1. Mikolik Asit	8
1.6.2. Enzimler	9
1.6.3. Virülens ile İlişkili Proteinler (Vap).....	9
1.7. Patogenez.....	11
1.8.Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	15
1.8.1.CAMP Benzeri Reaksiyon.....	15
1.9. Korunma ve Kontrol.....	16
1.9.1.Pasif İmmünizasyon Yoluyla Korunma.....	17
1.9.2. Aktif immünizasyon Yoluyla Korunma	19
1.10. Rekombinant Aşılar.....	21
1.10.1. rVapA ile İlgili Yapılan Aşı Çalışmaları	21
1.11. Klonlama Amacıyla Kullanılan Vektör Sistemi.....	22
1.11.1. Champion™ pET SUMO Protein Expression Vektör	22
1.12. rVapA Protein Üretimi için Farklı Besiyeri Formülasyonlarının Etkileri.....	23
1.13. Adjuvant Kullanımı	24
1.13.1. Partiküllü Adjuvantlar.....	26

1.13.2. Partiküllü Olmayan Adjuvantlar	27
1.13.3. Vap Proteinleri ile İmmunizasyonda Kullanılan Adjuvantlar	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
2.1. Gereç	30
2.1.1. Bakteriyel Suşlar ve Plazmid.....	30
2.1.2. VapA Geni Open Reading Frame (ORF) Bölgesi ve VapA Proteininin Biyoinformatik Verilere Göre Değerlendirilmesi	31
2.1.3. Besiyerleri.....	32
2.1.4. Kullanılan Kitler	34
2.1.5. Kanamisin Stok Solüsyonu.....	36
2.1.6. IPTG (1M) Stok Solüsyonu	36
2.1.7. DNA Amplifikasyonu.....	37
2.1.8. Agaroz Jel Elektroforezi	37
2.1.9. Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE).....	38
2.1.10. Western Blot.....	41
2.1.11. Protein Konsantrasyonu	42
2.1.12. Adjuvant.....	42
2.1.13. Kullanılan Serolojik Testler	43
2.2. Yöntem	46
2.2.1. <i>R. equi</i> Suş Seçimi	46
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	46
2.2.3. PZR Ürününün Agaroz Jelden Arındırılması.....	49
2.2.4. Vektöre Ligasyon Protokolü	50
2.2.5. Transformasyon Protokolü.....	50
2.2.6. Rekombinant Plazmid Taşıyan Koloni Seçimi	50
2.2.7. Rekombinant Kolonilerden Plazmid İzolasyonu	50
2.2.8. İzole Edilen Plazmidin Doğrulanması	51

2.2.9.	Rekombinant Protein Ekspresyonu İçin Besiyeri Denemesi	52
2.2.10.	rVapA Proteinin Ekspresyonu.....	53
2.2.11.	Çözünmeyen/Çözünebilir Protein Düzeyinin Belirlenmesi	53
2.2.12.	Aşıların Hazırlanması ve Uygulaması	56
2.2.13.	Enzim Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	57
3.	BULGULAR.....	59
3.1.	<i>R. equi</i> ile İlgili Çalışma Sonuçları.....	59
3.1.1	<i>R. equi</i> İzolatlarının PZR ile Doğrulanması.....	59
3.1.2.	<i>R. equi</i> 'de VapA Geninin PZR ile Çoğaltılması.....	59
3.2.	Klonlama Yapılan Vektörün Doğrulanması	60
3.2.1.	PZR ile Doğrulanması	60
3.2.2.	Dizi Analizi ile Doğrulama ve Bioinformatik Yöntemler ile Analizi..	62
3.3.	Çözünmeyen ve Çözünebilir Protein Varlığının Belirlenmesi.....	63
3.3.1.	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Gel Elektrophorez (SDS-PAGE)..	63
3.3.2.	Western Blot	64
3.4.	RVapA Proteinin Elde Edilmesi ve Konsantrasyonu Sonuçları	65
3.4.1.	RVapA Ekspresyonu Amacıyla Besiyeri Denemesi	65
3.4.2.	Ni-NTA Kolon ile Protein Saflaştırılması	66
3.4.3.	SUMO Proteaz Enzim ile Kesim	66
3.5.	Protein Konsantrasyonu Ölçümü ve Sterilite Kontrolü.....	67
3.6.	Rekombinant VapA Proteininin İmmun Yanıtı.....	67
3.6.1.	Seropotens Grupları	67
3.6.2.	Kısırlardan Alınan Serum Örnekleri ELISA Sonuçları.....	69
3.6.3.	Çelinç Grupları.....	70
4.	TARTIŞMA	73
4.1.	rVapA Proteinin Sentezlenmesi ve Değerlendirilmesi.....	73
4.2.	Humoral Bağışıklığın Değerlendirilmesi	75

4.3. Aşı Çalışmaları	78
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	83
6. KAYNAKLAR	84
7. EKLER.....	96
8. ÖZGEÇMİŞ	104



SİMGELER VE KISALTMALAR

Al(OH)₃	Alüminyum hidroksit
APS	Amonyum persülfat
bp	Baz çifti
BSA	Bovine serum albumin
CAMP	Christie-Atkins-Munch-Petersen Like Reaction
CFA	Complete Freund's Adjuvant
dk	Dakika
dNTP	Deoksi nükleotid trifosfat
dVapA	Doğal VapA proteini
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	Enzim Linked İmmuno Sorbent Assay
FAO	Food and Agriculture Organization of United Nations
FTS	Fizyolojik tuzlu su
H₂SO₄	Sülfürik asit
HCl	Hidroklorik asit
IFA	İncomplete Freund's Adjuvant
IL	Interlökin
IMS 3012	Montanide IMS 3012
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
kb	Kilobaz
KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria Bertani
LD	Letal doz değeri
MCS	Multiple klonlama bölgesi
MgCl₂	Magnezyum klorür
MgSO₄	Magnezyum sülfat
MO	Mineral yağ
NCBI	National Center for Biotechnology Information
(NH₄)₂SO₄	Amonyum sülfat
O/W	Su içinde yağ

OD	Optik dansite
ORF	Open reading frame
PBS	Fosfat tuz solüsyonu
PLD	Fosfolipaz D
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RBS	Ribozom bağlanma bölgesi
RE	Restriksiyon enzimi
RNase A	Ribonükleaz A
rVapA	Rekombinant VapA proteini
SB	Super Broth
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid gel elektroforez
SOC	Super optimal medium
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TAE	Tris Asetat EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TY	Trypton yeast sıvı besiyeri
W/O	Su içinde yağ
W/O/W	Su içine yağ, yağ içinde su
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Rhodococcus equi* VapA Geninin Rekombinasyonu, VapA Proteinin Saflaştırılması ve Aşı hazırlanması**

Gökçenur SANIOĞLU GÖLEN
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/ KONYA-2019

Rhodococcus equi (*R. equi*), yenidoğan taylarda ağır pyogranülomatoz pnömoniyle seyreden ve dünyada da yaygın olarak önemli kayıplara neden olan önemli bir patojendir. Etkenin bağırsak florasında bulunması, fekal-oral-solunum yollarından bulaşması ile taylarda başta solunum sistemi olmak üzere tüm iç organlarda ve eklemlerde piyojenik enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Hücre içi üremesinden dolayı da antibiyotiklerle gerçekçi bir sağaltım yapılamamaktadır. *R. equi*'nin immunosupresif insanlarda zoonoz olduğu bilinmektedir.

Taylarda *R. equi*'nin teşhisi mikrobiyolojik ve serolojik yapılmaktadır. Serolojik teşhis ise enfeksiyondan ziyade geçirilen veya devam eden enfeksiyonu tanımlamaktadır. Neonatal taylarda bağışıklık sistemi yeterince gelişmediğinden genellikle aşılama başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Patojenite için VapA'nın bulunması önemli bir kriter kabul edilmektedir.

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (SÜVF) Mikrobiyoloji Anabilim Dalında daha önce yapılan çalışmalarda; bakterin+VapA'lı aşının bakterin aşından daha etkin olması dikkate alınarak planlandı. Çalışmada SÜVF kültür koleksiyonundaki *R. equi* suşu/suşları kullanıldı. CAMP testiyle en etkili hemolize neden olan suş belirlendi.

R. equi'nin VapA geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile amplifiye edildikten sonra pET SUMO ekspresyon vektörüne klonlanarak *E. coli* BL21 (DE3) hücresine aktarıldı. Vektöre aktarılan rekombinant VapA (rVapA) geninin doğrulanması, PZR ve dizi analizleri ile yapıldı. Doğal VapA'nın (dVapA) ile rVapA antijenleri IMS 3012 veya Petgel A adjuvantları ile formüle edilerek dört farklı aday aşı hazırlandı. Aşıların seropotens fare gruplarındaki antikor titreleri, dVapA ve rVapA antijenleriyle tasarlanan ELISA kitleri hazırlanıp, ölçülerek karşılaştırıldı. Aşıların koruyuculuğunu ve antijenik yapılarını karşılaştırmak için çelinc grubu farelere ikinci aşılamaadan 10 gün sonra patojen *R. equi* intraperitoneal yolla enjekte edildi. Aşılı ve aşısız gruplardaki fareler bir hafta arayla dekapitasyon uygulanarak iç organlarından geri izolasyon yapıldı. Sonuçlarının değerlendirilmesinde eşleştirilmiş T-testi istatistik analizi kullanıldı.

Dizi analizi sonuçlarına göre; çalışmada kullanılan *R. equi*'nin VapA geni ile NCBI Gen Bankasındaki referans *R. equi*'nin VapA geninin baz dizilimi ile %99.4 oranında uyumlu bulundu. ELISA sonuçlarına göre; i) aşı antijeninin test antijeni olarak kullanılması ile daha güvenilir sonuçlar elde edileceği, ii) dört farklı aşı grubuna ait ELISA değerlerinin ortalamalarının istatistiksel olarak değerlendirildiğinde sonucun kontrol grubuna göre anlamlı olduğu, iii) PetgelA adjuvantı ile formüle edilen rVapA antijeninin immun sistemi nispeten daha güçlü uyardığı ve çelinc grubu fare iç organlarından geri izolasyonun daha az olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: Aşı, IMS 3012, PetgelA, Rekombinant VapA, *Rhodococcus equi*.

SUMMARY

T.C.
SELÇUK UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCE
**Recombination of *Rhodococcus equi* VapA Gene, Purification of Protein and
Vaccine Preparation**

Gökçenur SANIOĞLU GÖLEN

**Department of Veterinary Microbiology
THESIS OF DOCTORATE-2019**

Rhodococcus equi (*R. equi*) is an important pathogen in neonatal foals with severe pyogranulomatous pneumonia and causes widespread loss in the world. The presence of the causative agent in the intestinal flora, transmission through the fecal -oral-respiratory tract, leads to pyogenic infections in all internal organs and joints, especially the respiratory system in foals. Because of the intracellular growth of *R. equi*, a realistic treatment with antibiotics is not possible. *R. equi* is known to be zoonosis for immunosuppressive humans.

The diagnosis of *R. equi* in the foals is microbiological and serological. The serological diagnosis refers to the infection that is passed or ongoing rather than the infection. The presence of VapA for pathogenicity is considered an important criterion.

This study was planned to produce a more effective VapA bacterial vaccine than the bacterial vaccine previously produced in Selcuk University Faculty of Veterinary Medicine, Microbiology Department. In this study, *R. equi* strains were obtained from Selcuk University Veterinary Faculty culture collection, and the most effective hemolysis strain was determined by the CAMP test.

The VapA gene of *R. equi* was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) and transferred to *E. coli* BL21 (DE3) cell by cloning it into the pET SUMO expression vector. The transformation of the recombinant VapA (rVapA) gene into vector was confirmed by PCR and sequence analysis. Four different candidate vaccines were prepared by formulating natural VapA (nVapA) with rVapA antigens IMS 3012 or Petgel A adjuvants. The antibody titers of vaccines in the seropotence mouse groups were measured and compared by preparing ELISA kits designed with nVapA and rVapA antigens. To compare the protective and antigenic structures of the vaccines, the challenging group of mice was injected intraperitoneally with the pathogenic *R. equi* 10 days after the second vaccination. The mice in the vaccinated and unvaccinated groups were decapitated after one week to isolate the microorganism again from the internal organs. A paired T-test statistical analysis was used to evaluate the results.

According to the results of sequence analysis; The VapA gene of *R. equi* which used in this study was 99.4% compatible with the base sequence of the VapA gene of reference *R. equi* in the NCBI Gene Bank. According to the results of ELISA; i) more reliable results can be obtained by using the vaccine antigen as a test antigen, ii) When the average of ELISA values of four different vaccine groups were evaluated statistically, the result was significant compared to the control group, iii) The rVapA antigen formulated with the PetgelA adjuvant was found to stimulate the immune system relatively strongly and less back-isolation from the internal organs of mice in challenging group.

Keywords: Vaccine, IMS 3012, PetgelA, Recombinant VapA, *Rhodococcus equi*.

1. GİRİŞ

1.1.Tanım

Rhodococcus equi (*R. equi*) özellikle 1- 6 ay arasında genç taylarda pyogranülomatoz bronkopnömoniye neden olan hücre içi fırsatçı bir mikroorganizmadır. Ayrıca taylarda osteomyelitis, septik arthritis, ülseratif enterokolitis, mezenterik lenfadenopati ve diyare olguya eşlik etmesiyle ani ölüme neden olabilmektedir (Prescott 1987, Giguère ve ark 2011). Son yıllarda bağışıklık sistemi baskılanmış insan vakalarının artmasıyla *R. equi* 'nin zoonotik potansiyelinin farkındalığı ortaya çıkmış ve bu nedenle patojenin daha iyi gözetilmesinin önemi vurgulanmıştır (Weinstock ve Brown 2002, Ocampo-Sosa ve ark 2007).

R. equi, toprakta saprofit olan ve atların dışkılarında çoğalan Gram pozitif kokobasil, hareketsiz, fakültatif aerobik hücre içi bakteridir. Rezervuar kaynağı toprak olmasına rağmen at bağırsaklarında da çoğalabilir (Giguère ve ark 2011, Muscatello 2012). Bulaşma fekal-oral ve aerosol yolla olup, aerosol yolla yayılması klinik enfeksiyonda önemli bir rol oynar. *R. equi* 'nin yalnızca belirli suşları patojeniktir ve çeşitli virülens genleri tanımlanmıştır. Çevrede bulunan çoğu *R. equi* izolatu virülens özelliklerinden yoksun olmasına rağmen plazmidlerin rol oynadığı virulent izolatları bulunmaktadır. Taylarda virülens, 15–17 kDa lipoprotein “virülens ile ilişkili protein A” (VapA)' yı kodlayan 80-90 kb plazmidlerin varlığı ile ilişkilidir (Giles ve ark 2014).

R. equi 'nin epidemiyolojisi, çevre, subklinik taşıyıcılar ve duyarlı konakçılar arasında hassas bir denge göstermektedir. Birçok at tesisinde endemik olarak toprakta bulunur ve endemik olmayan yerlerde de sporadik olarak görülmektedir. Hayvan yoğunluğunun arttığı dönemlerde ve tozlu sıcak kuru iklimlerde enfeksiyon riski artmaktadır (Muscatello 2012)

R. equi pnömonisi, atçılık endüstrisini maddi kayıplarla karşı karşıya bırakarak önemli ölçüde etkiler çünkü hastalıktan kurtulan tayların yarışma olasılığı daha düşüktür. Antibiyotik tedavisi pahalıdır, uzun sürmektedir ve tam olarak başarılı değildir (Giguère ve Prescott 1997). Bundan dolayı *R. equi*, tayların en önemli patojenlerinden biri olmaya devam etmekte ve rhodococcosis hastalığını önlemek için aşılama stratejileri artan bir şekilde araştırılmaktadır. Koruyucu aşılar

elde etmek için birçok çalışma gerçekleştirilmiş olmasına rağmen *R. equi* pnömonisinin taylarda etkin şekilde önlenmesi için tam olarak etkili immunizasyon prosedürü mevcut değildir (Takai ve ark 1999, Hines ve ark 2001)

Yeni aşılama stratejilerinin geliştirilmesinde rekombinant DNA teknolojisinin kullanılması ile istenilen proteinlerin yüksek miktarda ve saf bir şekilde ekspresyonu, taşıyıcı bakterilerin hızla çoğaltılabilmesi, koşulların oluşturulmasının ekonomik olması nedenleriyle koruyucu aşı elde etmek amacıyla umut vaad eden yöntemlerden biri olarak görülmektedir (Sørensen ve Mortensen 2005).

1.2. Tarihçe

R. equi ilk kez 1923'te Magnusson tarafından İsveç taylarındaki granümatöz akciğer enfeksiyonlarından izole edilerek *Corynebacterium equi* (*C. equi*) olarak isimlendirilmiştir (Hondalus 1997). Günümüze kadar domuz, sığır, manda, keçi, alpaka, koyun, geyik, kedi, köpek, koala, marmoset, timsah gibi çeşitli hayvanlardan izole edilmiştir (Elliott ve ark 1986, Carrigan ve ark 1988, Prescott 1991, Tkachuk-Saad ve ark 1998, Davis ve ark 1999, Cuteri ve ark 2001) İnsanlarda ilk vaka 1967 yılında bildirilmiştir. (Golub ve ark 1967). Sonrasında özellikle HIV virüsü taşıyan, immunosüpresif tedavi uygulanan (organ nakli yapılan, kanser tedavisi gören) hastalardan sıklıkla izole edildiği rapor edilmiştir (Clotet ve ark 1993, Munoz ve ark 1998, Gray ve ark 2000, Fidvi ve ark 2003).

R. equi ülkemizde ise ilk kez taylardan 1997 yılında Bursa çevresinde bulunan bir at yetiştirme çiftliğinde irinli pnömoniden ölen bir tayın akciğerinden izole edilmiştir (Çetin ve Kahraman, 1997). Aynı yıl içerisinde Malatya ilinde bulunan Sultansuyu Harasında 2 arap tayının nekropsisinde makroskopik olarak gözlenmiş ve ayrıca bakteriyolojik olarak da *R. equi* izole edilmiştir (Karadaş ve ark 1997).

1.3. Taksonomi

R. equi (*Rhodococcus hoagi* / *Prescottella equi*) günümüzde halen devam eden bir sınıflandırma geçmişine sahiptir (Goodfellow 1987, Garrity 2014, Tindall 2014). *R. equi*, hücre duvarında mikolik asit içeren ve yaklaşık % 61-72 kadar G+ C içeriğine sahip Actinobacteria sınıfında yer almaktadır (Zakrzewska-Czerwinska ve

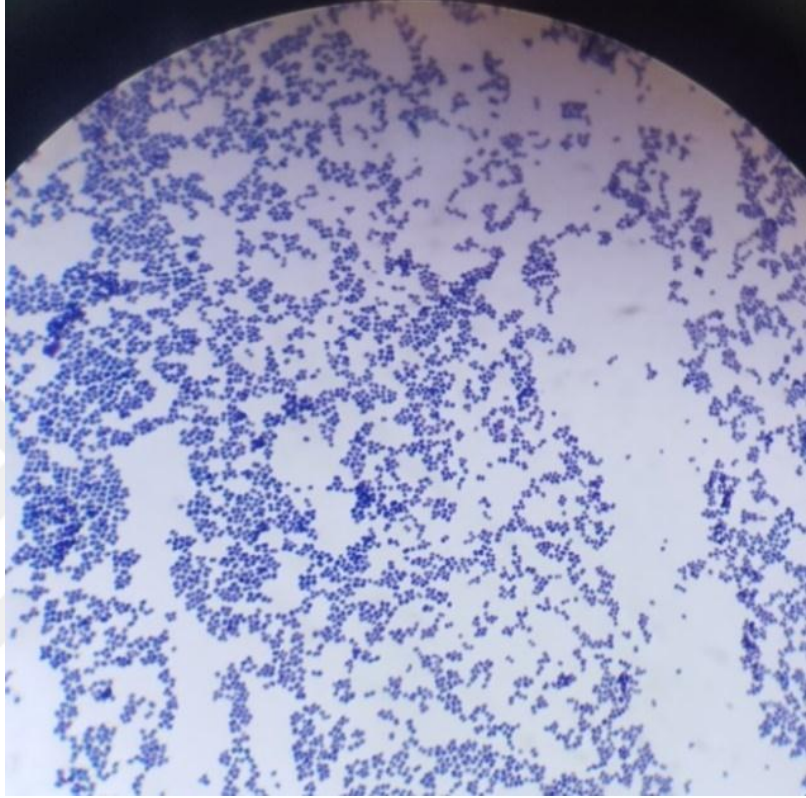
ark 1988). *Rhodococcus* cinsi mikroorganizmalar *Actinobacteria* sınıfı, *Actinomycetales* takımı, *Nocardiaceae* familyasında sınıflandırılmaktadır (Goodfellow 1987, Bell ve ark 1998, Aydın ve ark 2006). Bu sınıfa ait diğer cinsler *Mycobacterium spp*, *Corynebacterium spp*, *Nocardia spp*, *Gordona spp*, *Tsukamurella spp* ve *Dietzia spp*' dir. İlk kez 1923'te izole edildiğinde *R. equi*, *Corynebacterium* sınıfı morfolojisine benzeyen Gram pozitif difteroid görünümüne dayanarak *C. equi* olarak sınıflandırılmıştır (Barton 1992). İzole edildiği günden beri birçok kez yeniden adlandırılmıştır. Lutje (1923) aynı mikroorganizmayı pnömonili taylardan izole ederek *C. pyogenes equi roseum* olarak isimlendirmiştir. Jensen (1934) ve Krasilnikov (1966) yılında etkenin *Mycobacterium* cinsine benzediğini belirleyerek etkenin *Mycobacterium equi* olarak isimlendirilmesi gerektiğini öne sürmüştür (Barton ve Hughes 1980). Sonraki yıllarda etkenin domuzlardan izole edilmesiyle *C. magnusson-holth* olarak isimlendirilmesi gerektiğini bildirilmiştir. Holtman 1945 yılında pnömonili buzağıdan izole ettiği etkenin *R. equi* olduğunu belirleyerek ve farklı konakçılarda da enfeksiyonun oluşabildiğini belirtmek için *C. purulentus* ismini önermiştir (Barton ve Hughes 1980).

Lipid kompozisyonu üzerine yapılan genetik, fenotipik ve immunodifüzyon çalışmaları sonrasında bakteri *R. equi* olarak adlandırılmıştır (Goodfellow ve Minnikin 1977, Barton ve Hughes 1980, Goodfellow 1987). *R. equi*'nin % 66-72 G+ C içeriğine sahip olması ve *Corynebacteria* sınıfından farklı immunodifüzyon profilinde yer alması da sınıflandırılmasında yardımcı olmaktadır (Barton ve Hughes 1984, Goodfellow 1987). Diğer taksonomik çalışmalar, organizmanın kendi cinsinin *Prescottella* veya *Prescottia* cinsine sahip olması gerektiğini ve bunun genomik çalışmalar ile desteklendiğini göstermiştir (Jones ve ark 2013, Vázquez- Boland ve Meijer 2019). Ayrıca *R. equi* türü yerine *R. hoagii* türünün olarak adlandırılması gerektiği bildirilmektedir (Kämpfer ve ark 2014). Taksonomik olarak tartışma devam etmesine rağmen, *R. equi* adının korunması önerilmektedir (Garrity 2014, Vázquez- Boland ve Meijer 2019).

1.4. Etiyoloji

R. equi Gram pozitif, nispeten yavaş gelişen, hareketsiz, kapsüllü ve sporsuz bir kokobasil olmasına rağmen pleomorfik özellik gösterebilen 0.8-1.5 mikrometre boyutlarında ve (Takai ve ark 1995, Vanniasinkam ve ark 2005) optimum üreme

ısı 28-30°C'dir (Weinstock ve Brown 2002). (Şekil 1.1). Makrofajlar içinde kalıcı şekilde çoğalabilen fakültatif aerobik hücre içi patojendir (Hondalus ve Mosser 1994). Kronik ve bazen şiddetli pyogranüloz pnömoni ve akciğer apseleri ile karakterizedir. Bu tip lezyonlar hem insanlarda hem de hayvanlarda görülmektedir (Takai ve ark 1991, Takasugi ve Godwin 1991, Vanniasinkam ve ark 2005).



Şekil 1.1. *R. equi* mikroskopik görüntüsü

R. equi kanlı agarda 2-3 gün süresinde 37°C'de hemolizi olmayan, mukoid, parlak pembe, krema görünümlü koloni oluşturmaktadır (Şekil 1.2). Sıvı ortamda üretildiği zaman dipte tortu, yaygın bulanıklık meydana getirmektedir (Takai ve ark 1991). Karbonhidrat fermentasyonu yoktur; jelatin, indol testleri negatiftir. Buna karşın üreaz, lipaz, nitrat redüksiyon, H₂S, katalaz ve proteaz testleri pozitifdir (Rogosa ve ark 1974, Barton ve Hughes 1980, Phumoonna 2005).



Şekil 1.2. *R. equi*'nin kanlı agar üzerinde görüntüsü

R. equi, ısıya, kuru ortama ve formaldehit gibi bazı kimyasallara karşı kısmen dirençlidir. *R. equi*, 60°C ısıda, % 0,5'lik formaldehit, ve % 2,5'luk oksalik asitte 1 saat canlılığını koruyabilmesine rağmen 80°C'de 10 dakika canlılığını kaybetmektedir. Toprak, dışkı, bağırsak içeriği ve lenf nodülleri gibi kontamine marazi maddelerden yapılacak ekimlerde bu özelliklerinden faydalanılmaktadır. Ayrıca besiyerine nalidiksik asit, novobiosin, sikloheksamidin ve potasyum tellurit eklenerek selektif besiyerleri de kullanılabilmektedir (Takai ve ark 1991, Vanniasinkam ve ark 2005, Phumoonna ve ark 2008).

R. equi'nin kapsüler polisakkarit antijenleri ile aglütinasyon testi sonucunda 27 adet serotipe ayrıldığı bildirilmiştir (Nakazawa ve ark 1983, Phumoonna 2005). At, insan, domuz, köpek, kedi ve inek türlerinden elde edilen izolatların 7 kapsüler serotipe sahip olduğu gözlenmiştir. Bu serotipler izolat orijinine bağlı olmasına rağmen; virülens ve serotipler arasında ilişkinin bulunmadığı bildirilmektedir (Prescott 1981, Vanniasinkam 2001, Phumoonna 2005). Aynı serotipin hem virulent hem de avirulent suşları bulunabilmektedir (Takai ve ark 1996, Vanniasinkam 2001, Phumoonna 2005). *R. equi* virülens özelliklerini mikolik asit, hücre dışı enzimler olan fosfolipaz C ve kolesterol oksidaz, kapsül, hücre duvarı ve polisakkaritler ve Vap proteinleri belirlemektedir (Prescott 1991, Tan ve ark 1995, Hondalus 1997,

Meijer ve Prescott 2004, Hines 2007, Phumoonna ve ark 2008, von Bargen ve ark 2019).

R. equi' nin fosfolipaz C ve kolesterol oksidaz ekzoenzimleri ve *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) beta toksini veya *C. pseudotuberculosis* fosfolipaz D ile sinerjik inhibisyon sonucunda memeli eritrositlerinde hemolize neden olmaktadır (Prescott ve ark 1982, Phumoonna 2005). *R. equi* tek başına eritrositleri lize edememesine rağmen *S. aureus*'in sentezlediği stafilokokal β - hemolizin ve fosfolipaz D ile birlikte eritrosit membranındaki seramit fosfatı hidrolize edebilen aktif fosfat oluşması ve ile lizis şekillenmektedir.

1.5. Epidemiyoloji

R. equi, saprofitik olarak toprakta ve otoburların bağırsaklarında yaygın olarak görülen önemli fırsatçı patojendir. Genellikle 1-6 aylık taylarda ve immun sistemi baskılanmış insanlarda enfeksiyona neden olmaktadır Her iki türdeki enfeksiyon da yaygın olarak yaşamı tehdit eden pyogranülomatoz pnömoni ve akciğerde apselere neden olması ile karakterizedir (Barton ve Hughes 1980, Barton 1981, Prescott ve Hoffman 1993, Takai ve ark 1995, Giles ve ark 2014). *R. equi*' nin üremesini destekleyen asetat ve propiyonat gibi organik uçucu yağ asitlerinin gübre içerisinde bulunmasından dolayı atların yoğun olduğu bölgelerde etken daha sık görülmektedir. (Hughes ve Sulaiman 1987, Vanniasinkam 2001). Yapılan bir çalışmada at çiftliklerindeki *R. equi* enfeksiyonunun, at barınaklarındaki virülent *R. equi* kontaminasyonunun yoğunluğu ile doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir (Takai ve ark 1991, Phumoonna 2005). Çoğu at çiftliğinde *R. equi* bulunmasına rağmen hastalık bazı çiftliklerde endemik bazılarında sporadik olabilmekte veya bazılarında gözlenmemektedir. Bu durum çevre (sıcaklık, toz, toprak pH vb.), yönetim koşulları ve izolatların virülensindeki farklılıklara bağlı olabileceği düşünülmektedir (Phumoonna 2005, Giguère ve ark 2011).

Yenidoğan taylarda % 3 -17 mortalite oranları ve % 80 gibi yüksek morbitide oranları bulunmaktadır (Takai ve ark 1995, Sekizaki ve ark 1995, Tan ve ark 1995, Vanniasinkam 2001, Phumoonna 2005). Tüm at çiftlikleri *R. equi* ile enfekte olma eğilimindedir, ancak klinik prevalansı çiftlikten çiftliğe değişmektedir. Bu muhtemelen çevre ve yönetim koşullarındaki farklılıkların yanı sıra, virülent veya

avirulent *R. equi* suşlarının farklarından kaynaklanmaktadır. Hastalığın endemik olarak bulunduğu çiftliklerin, genellikle Vap A plazmidi içeren virulent *R. equi* ile enfekte olduğu bildirilmektedir (Takai ve ark 1991, Sekizaki ve ark 1995, Tan ve ark 1995, Vanniasinkam 2001, Phumoonna 2005). Virülensle ilişkili antijenlerin ve plazmidlerin keşfi taylarda *R. equi* enfeksiyonunda ileri epidemiyolojik çalışmalar yapılmasını sağlamıştır. *R. equi*' nin taylardan elde edilen izolatlarında virülens plazmidleri arasında genotipik varyasyon 10 ülkede (Arjantin, Avustralya, Brezilya, Kanada, Fransa, Macaristan, Japonya, Kore, Amerika ve Güney Afrika) incelenmiştir. Virulent *R. equi* izolatlarında dünyada en az 12 virülens plazmid tipinin bulunabileceği gösterilmiştir (Morton ve ark 1998, Takai ve ark 1999, Takai ve ark 2001, Takai ve ark 2003, Ribeiro ve ark 2005, Valero- Rello ve ark 2015).

Ülkemizde virulent *R. equi* izolasyonu sonrasında hastalığın epidemiyolojisi, klinik belirtileri, tanısı, sağaltımı ve kontrolüne yönelik çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (Özgür ve Ilgaz, 2000). Marmara Bölgesi'nde yarış atları bulunan haralardaki taylarda şekillenen *R. equi* enfeksiyonunun teşhisinin erken yapılmasında ELISA'nın başarılı olduğu bildirilmiştir (Özgür ve ark 2002).

İnsanlarda *R. equi* immun sistemi baskılanmış hastalar arasında önemli bir pulmoner patojen olarak ortaya çıkmıştır (Prescott 1991, Cauchard 2004). *R. equi* enfeksiyonu raporları HIV enfeksiyonunun yaygınlığı organ nakli yapılan ve kanser tedavisi gören hastaların artışı ile eş zamanlı olarak artmıştır. İnsanlarda *R. equi* enfeksiyonu, HIV enfeksiyonunun fırsatçı bir komplikasyonu olarak immunosüpresyonun ileri aşamalarında ortaya çıkar. Genellikle bakteriyemi, pulmoner kavitasyon ve zatürre şeklinde ciddi bir hastalık ile sonuçlanır (Prescott 1991, Huffnagle ve Southern Jr 1992, Lopez ve ark 2003). Bununla birlikte, Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu (AIDS) bulunan hastalarda ölüme neden olan *R. equi* pnömonisi vakası da bildirilmiştir (Walsh ve Cunha 1994). Bu organizmanın neden olduğu insan vakalarının hastalığının ilk tanınmasından bu yana 100'den fazla bildirim olduğu belirtilmektedir (Weinstock ve Brown 2002). Yaş veya cinsiyet yanlılığına dair net bir kanıt olmamasına rağmen hastaların %78'inin erkek olduğu gözlemlendi (Prescott 1991). Buna ek olarak bildirilen *R. equi* enfeksiyonu vakalarının yaklaşık %10'u lenforetiküler hastalığa sahip veya kemoterapi nedeniyle immun sistemi baskılanmış çocuklardan oluşmaktadır (McGowan ve Mangano 1991,

Weinstock ve Brown 2002). Raporların yaklaşık üçte birinde çiftlik hayvanları ve gübre ile temas insan vakaları olmasına rağmen insanlar için ana enfeksiyon kaynağı belirsizliğini korumaktadır (Takai ve ark 1994, Weinstock ve Brown 2002). *R. equi* ile kontamine olmuş tozun solunması, yara içine girmesi veya beslenme yoluyla alınması gibi mekanizmalardan birinin hastalığa yakalanma nedeni olabileceği düşünülmektedir (Weinstock ve Brown 2002, Lopez ve ark 2003, Yamshchikov ve ark 2010)

1.6. Virülens Faktörleri

R. equi'nin virülens ile ilişkili elemanları; mikolik asit, hücre dışı enzim olan kolesterol oksidaz, fosfolipaz C, kolin fosfohidrolaz ve Vap ailesinin bağlı olduğu sekiz geni kodlayan plazmitten oluşan patojenite adası, kapsül, hücre duvarı ve polisakkaritlerden oluşmaktadır (Prescott 1991, Tan ve ark 1995, Hondalus 1997, Meijer ve Prescott 2004, Hines 2007, Phumoonna ve ark 2008, von Bargen ve ark 2019).

R. equi virülensinin temeli, etkenin hücre içinde hayatta kalabilmesi çoğalabilmesi ve alveolar makrofajlarını yok edebilmesine dayanmaktadır. *R. equi* konakçının makrofajlarına adhezyonundan sonra makrofaja girer. Bakterinin memeli hücrelerine optimum şekilde yapışması konakçı komplemanı ile desteklenir ve konakçı hücre ile patojen arasındaki bağlanma; lökosit kompleman reseptörü CD3 yoluyla meydana gelir (Hondalus ve ark 1993, Vanniasinkam 2001). *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania major* ve *Cryptococcus neoformans* gibi bazı hücre içi patojenlerin reseptör aracılı mekanizmasıyla konak makrofajlarına girme kabiliyeti iyi bilinmektedir (Schlesinger ve ark 1990, Levitz ve Tabuni 1991, Mosser ve ark 1992, Vanniasinkam 2001, Phumoonna 2005). *R. equi* diğer hücre içi patojenler gibi alternatif kompleman yoluyla uygun bir reseptör içeren makrofajlar ve monositler gibi hücreleri işgal edebilmekte ve hücre içi öldürme yeteneklerine karşı direnebilmektedir (Bellinger-Kawahara ve Horwitz 1990, Hondalus ve ark 1993, Giles ve ark 2014).

1.6.1. Mikolik Asit

Rhodococcus ailesinin ana hücre duvarı bileşeni olan mikolik asit içeren glikolipid, granülom oluşumundaki virülens faktörü olabileceği düşünülmektedir

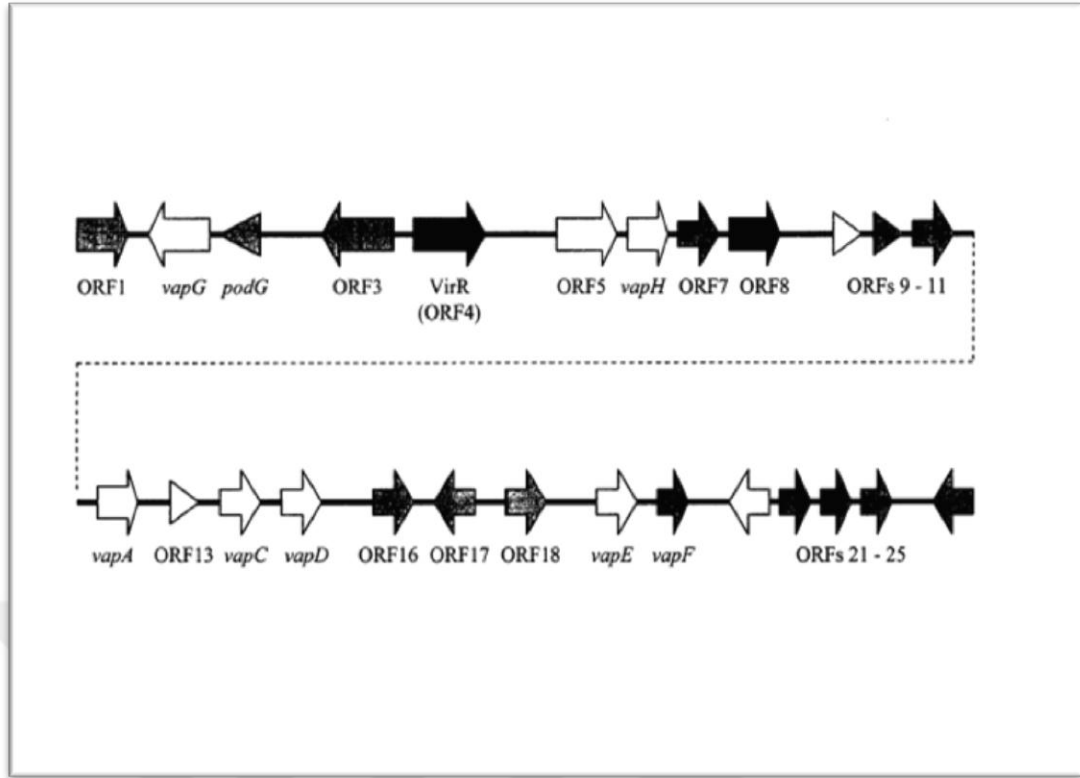
(Gotoh ve ark 1991, Hondalus 1997, Phumoonna 2005). Saflaştırılmış glikolipidlerinin intravenöz uygulamasının, farelerde granülom oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir (Gotoh ve ark 1991, Asano ve ark 1993). Ayrıca daha uzun karbon zincirli mikolik asit içeren *R. equi* suşlarıyla enfekte farelerin daha ağır granülomlar geliştirdikleri ve enfeksiyondan ölme ihtimalinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Gotoh ve ark 1991, Vanniasinkam 2001).

1.6.2. Enzimler

R. equi, kolesterol oksidaz, lesitinaz, fosfolipaz C ekzoenzimlerine sahiptir ve bu enzimler in vivo ile in vitro çalışmalarda konakçı hücre zarlarında harabiyete, makrofaj dejenerasyonuna, sitotoksositeye neden olmaktadır (Smola ve ark 1994). Linder ve Bernheimer (1982) virulent *R. equi* suşu tarafından üretilen kolesterol oksidazın memeli dokularında toksik olduğu ve fagositlerin zarında bulunan kolesterolün oksidasyonuna sebep olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, bu faktörlerin hem virulent hem de avirulent suşlarda bulunması nedeniyle virülensteki etkilerinin dereceleri hala belirsizliğini korumaktadır (Vanniasinkam 2001, Phumoonna 2005).

1.6.3. Virülens ile İlişkili Proteinler (Vap)

R. equi'nin 8 farklı Vap sentezleyen genleri barındıran plazmidleri olduğu bilinmektedir. Atlardan izole edilen izolatların çoğunda 80-90 kb virülens plazmidi tarafından VapB hariç tümü kodlanır. VapA, VapC, VapD, VapE, VapF, VapH ve VapG genleri %60.8 sahip G+C içeriğine 27.536 bp'lik bir patojenik adada olup ve her iki ucunda transpozon bulunmaktadır. Aksine VapB, 79-100 kb'lik başka bir virülens plazmidi tarafından kodlanmaktadır (Takai ve ark 2000, Vanniasinkam 2001). Vap genleri, vapA, vapC ve vapD takımı, vapE ve vapF takımı, vapH ve vapG takımı ayrı gruplarda yer almaktadır (Takai ve ark 2000, Vanniasinkam 2001). (Şekil 1.3). Amino asit seviyesinde, VapC, D ve E, VapA ve VapB ile %50 benzerlik göstermektedir (Byrne ve ark 2001). VapA, vapD ve vapG' nin makrofajların etkinliğini artırdığı bildirilmesine rağmen bu plazmidlerin virülens genlerinin düzenlenmesinde spesifik fonksiyonları hala tam olarak bilinmemektedir. (Benoit ve ark 2001, Benoit ve ark 2002, von Bargen ve ark 2019).



Şekil 1.3. *R. equi*' nin 27.5 kb virülens plazmidinin patojenite adasının doğrusal haritası. Oklar genlerin transkripsiyonunun konumunu ve yönünü göstermektedir (Takai ve ark 2000).

DNA mikroarray çalışması ile 37°C' den yüksek sıcaklıkta ve düşük demir iyonu bulunan ortamda Vap genlerini indüklemektedir. Ancak bu genler düşük magnezyum olan ortamda baskılanmakta ve ekspresyonu ise düşük kalsiyum oranından ve düşük pH' dan etkilenmemektedir (Ren ve Prescott 2003). VapA'nın 189 amino asitten oluştuğu ve bakteri yüzeyinden de eksprese edilen lipit modifiyeli protein olduğu bilinmektedir (Vanniasinkam 2001, von Bargen ve ark 2019). Takai ve arkadaşları (1996) VapA ekspresyonu sıcaklığa ve pH' ya bağlıdır. VapA bakteri yüzeyinde bulunmakta 34-41°C' de eksprese edilmektedir. İn vitro ekspresyon için en uygun koşullar, *R. equi* için uygun bir konakçıda bulunan koşullara benzeyen 38°C sıcaklık ve pH 6.5'tir. Byrne (1999) tarafından, in vitro ortamda VapA ekspresyonunun yüksek düzeyde sentezlenmesinin, 30°C' de ve et suyu içeren besiyerine bağlı olduğu bildirilmiştir. Bu durum bazı faktörlerin VapA proteininin sentezlenmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

Takai ve ark (1991), *R. equi* ile taylarda 10 yıldan fazla süren deneysel enfeksiyon sonuçlarına göre sadece 85- 90 kb' lık virülens plazmidi tarafından

eksprese edilen 15- 17 kDa ağırlığında olan VapA protein bulunan suşların virulent olduğu gözlemlenmiştir. VapA' nın makrofajlara karşı direnç geliştirmesi ile bakteri hayatta kalıp çoğalarak, farelerde ve taylarda hastalık oluşturmaktadır (Hondalus ve Mosser 1994, Giguère ve ark 1999, Byrne ve ark 2001, Vanniasinkam 2001, von Bargen ve ark 2019).

Klinik olarak hasta taylardan elde edilen izolatlarda VapA bulunmakta ve izolatların tanımlanmasında epidemiyolojik belirteç olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, bu protein aynı zamanda AIDS ile ilişkili insanlardan elde edilen izolatlardan da eksprese edilmektedir (Nicholson ve Prescott 1997, Vanniasinkam 2001).

VapA, yüksek oranda immunojenik bir proteindir ve doğal olarak *R. equi* ile enfekte taylardan izole edilen suşlarda bulunmaktadır (Giguère ve ark 2011, Giles ve ark 2014). Domuzlardan izole edilen diğer *R. equi* suşu, 20 kDa'lık bir antijen olan VapB'yi eksprese eder ve bu suş farelerde düşük virülense sahiptir. Bununla birlikte, bugüne kadar hem VapA hem de VapB proteinlerini aynı anda sentezleyen *R. equi* izolatı izole edilememiştir (Vanniasinkam 2001).

1.7. Patogenez

R. equi fakültatif hücre içi bakteri olması nedeniyle enfekte olmuş hayvanların ve insanların alveolar makrofajlarında bulunmaktadır ve yaşamı tehdit edici pyogranülomatöz pnömoniye neden olmaktadır (Şekil 1.4). Ayrıca taylarda tüm iç organlarda ve eklemlerde piyojenik enfeksiyonlara yol açarak diyareye ve sancılı ölüme neden olabilmektedir. Hastalıktan ölen taylarda sancılı mezenteriyal lenf düğümlerinde büyüme ve bağırsaklarında anormal görüntü gözlenmektedir. (Prescott 1987, Giguère ve ark 2011). Son yıllarda enfeksiyonun patogenezinin anlaşılmasında önemli ilerleme kaydedilmiştir. Enfeksiyonun çeşitli yönleri hem in vitro hem de in vivo olarak incelenmiştir. *R. equi*'nin konakçı hücreye yapışması; hem in vitro olarak makrofajlar içinde hem de in vivo olarak farelerde bakteri üremesinin kinetiği ve koruyucu bağışıklık için gerekli olan spesifik konak tepkisi araştırılmaktadır. Bununla birlikte, patogenezinin anlaşılmasındaki en büyük gelişme, varlığı atlarda virülensle yüksek oranda ilişkili olan büyük bir plazmidin keşfi olmuştur (Hondalus 1997, Giguère ve ark 2011).



Şekil 1.4. *R. equi*' nin neden olduğu pyogranülamatöz pnömonili tay akciğeri

Altı aylıktan daha küçük olan taylar, bakteri ile karşılaşması durumunda enfeksiyonun gelişmesine karşı oldukça hassastır (Phumoonna 2005, Giguère ve ark 2011). Yetişkin atlarda nadir görülen *R. equi* hastalığı özellikle immun sistemi baskılanmış hayvanlarda veya sistemik hastalığı olanlarda meydana gelmektedir (Giguère ve ark 2011, Vázquez-Boland ve ark 2013). *R. equi* pnömonisi vakalarının çoğuna, genellikle yaz aylarında, tayın hastalığa duyarlılığının yüksek olduğu ve bakteri çoğalması için çevresel koşulların optimal olduğu durumlarda rastlanmaktadır. *R. equi* toprakta normal koşullarda bulunmakta ve tozun solunması hem hayvanlar hem de insanlar için birincil temas yolu olmaktadır (Weinstock ve ark 2002, Yamshchikov ve ark 2010).

R. equi enfeksiyonu, başlangıçta semptom göstermeyen ileri bronkopnömoniye ve akciğerde büyük çoklu apselerin gelişmesine yol açabilir. Bakterilerin aerosol ve intrabronşiyal inokulasyonu ile yapılan deneysel enfeksiyon, akciğer lezyonlarının ilk aşamalarında az miktarda nötrofile sahip çok çekirdekli dev hücrelerden oluşan alveol boşluklarında ve çok miktarda makrofajlardan oluşan hücresel infiltrasyon ile karakterizedir. (Vázquez-Boland ve ark 2013). Morfolojik olarak sağlam bakteriler, makrofajlar ve dev hücrelerde yaygın olarak bulunmasına rağmen bakteriler alveol, bronş, bronşiyal epitel hücrelerinde bulunmamaktadır (Johnson ve ark 1983, Weinstock 2002, Yamshchikov ve ark 2010). Hastalığın daha ileri evrelerinde dejenere bakteri bulunan makrofajların olduğu akciğer parankiminin

nekrozu ve yıkımı ile karakterize edilmektedir. Klinik *R. equi* pnömonisine sahip tayların yaklaşık olarak yarısında, klinik olarak ishale neden olan ülseratif kolit veya mezenterik lenfadenit de gelişmektedir (Zink ve ark 1986, Weinstock 2002, Yamshchikov ve ark 2010). Bağırsak enfeksiyonu nadiren pnömoni olmaksızın ortaya çıkmaktadır ve genellikle fazla miktarda kontamine balgam yutulmasından kaynaklanmaktadır. Hastalık peyer plaklarında ülser ile tahrip olmuş alanlara neden olmakta ve zamanla tipik olarak mezenterik lenf düğümleri büyümektedir. Deneysel olarak yapılan intragastrik inokulasyonda tayların bağırsaklarında pyogranülomatoz bağırsak lezyonları meydana gelmektedir (Johnson ve ark 1983, Vanniasinkam 2001, Weinstock 2002). Bununla birlikte, 6 aydan küçük taylar tarafından az miktarda bile *R. equi* 'nin doğal yollarla solunması genellikle subklinik kolonizasyona ve bağırsaklarda enfeksiyona yol açmaktadır (Vanniasinkam 2001, Weinstock 2002, Phumoonna 2005). *R. equi*'nin akciğerlerden diğer vücut bölgelerine yayılarak septik arthritis, serozitis ve intervertebral apselere neden olmaktadır (Vanniasinkam 2001, Phumoonna 2005). Nadir olarak *R. equi* enfeksiyonu ile mevcut bir yaranın bakteriyel kontaminasyonundan kaynaklanan kutanöz ülseratif formu da bulunmaktadır. Domuzda *R. equi* kronik servikal lenfadenitise yol açabilmekte ancak organizma lenf düğümlerinden ve diğer sağlıklı domuzların tonsillerinden sıklıkla izole edilmektedir (Vanniasinkam 2001, Weinstock 2002). Sığır, koyun, keçi, geyik, bufalo, kedi ve köpek gibi diğer türler de *R. equi* enfeksiyonu nadir gözlenmesine rağmen bu türlerdeki hastalık genellikle lenf nodullerinde apse veya yara enfeksiyonu ile seyretmektedir. Diğer hayvan türlerinde pnömoni nadir görülmektedir (Vanniasinkam 2001, Yamshchikov ve ark 2010).

R. equi sağlıklı insanlar için tam patojen sayılmaz. Fakat AIDS'li bireyler gibi bağışıklık sistemi zayıflamış insanlarda ölümcül olabilir (Emmons ve ark 1990, Harvey ve Sunstrum 1990, Mastroianni ve ark 1994, Yamshchikov ve ark 2010 von Bargen ve ark 2019). İlk bildirilen insan enfeksiyonu vakası, kronik hepatit için kortikosteroid tedavisi esnasında *R. equi* pnömonisinin şekillenmesidir (Golub ve ark 1967). HIV enfeksiyonu vaka sayıları ile *R. equi* enfeksiyonu vaka artışı arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir (Emmons ve ark 1990, Harvey ve Sunstrum 1990). Nadiren belirgin immunolojik anormalliği olmayan kişilerde lokalize *R. equi* enfeksiyonu meydana gelmektedir (Ebersole ve Paturzo 1988, Hillman ve ark 1989, Castor ve ark 1990, Yamshchikov ve ark 2010). Taylarda olduğu gibi insanlarda da

pnömoni, *R. equi*'nin en baskın klinik semptomudur (Harvey ve Sunstrum 1990) ve histopatolojik bulgular hayvanlarda ve insanlarda benzerdir (McNeil ve Brown 1994, (Drancourt ve ark 1992, Yamshchikov ve ark 2010). İnsanların, *R. equi* ile nasıl karşılaştıkları bilinemediğinden bulaşma kaynağı da çoğu zaman belirlenememektedir (Drancourt ve ark 1992, Yamshchikov ve ark 2010). Fakat *R. equi* toprakta yaygın bulunduğu için insan kaynaklı hastalıkların çoğunda çevre kontaminasyonunun önemli olabileceği düşünülmektedir (Yamshchikov ve ark 2010).

R. equi enfeksiyonu tipik pulmoner lezyon, yoğun nötrofil infiltrasyonun sonucunda meydana gelen apse ve pyogranülomatöz bronkopnömoni ile karakterizedir. Bununla birlikte, yetişkin at polimorfonükleer lökositlerinin in vitro ortamda virulent *R. equi*'yi etkili şekilde fagosite ettiği ve öldürdüğü bildirilmiştir (Yager ve ark 1986, Martens ve ark 1987, Weinstock ve ark 2002, Yamshchikov ve ark 2010). Aynı şekilde, genç tayların nötrofilleri in vitro ortamda bakteriyi yok etmeye çalışmaktadır (Hietala ve Ardans 1987, Yager ve ark 1987, Martens ve ark 1988, Yamshchikov ve ark 2010).

R. equi makrofajları enfekte eder ve çok çekirdekli dev hücre yapısı ile pyogranülom oluşumuna neden olmaktadır (Johnson ve ark 1983). *R. equi*'nin in vitro ortamda makrofajlara optimum yapışması için konakçı komplemanı ve esas olarak makrofaj kompleman reseptörü CD3 (CD11b, CD18) ligasyonu yoluyla gerçekleştiği gösterilmiştir (Hondalus ve ark 1993, Weinstock ve ark 2002). *R. equi*'nin makrofajlara direnmek için kullandığı mekanizmalar tam olarak çözülememesine rağmen Zink ve ark (1985), tayların alveolar makrofajlarını kullanarak in vitro enfektivite çalışmaları gerçekleştirmiş ve enfeksiyondan 4 saat sonra bile etkenin yaşayabildiğini bildirmiştir. Kesin olarak virulent *R. equi* izolatlarının makrofajlarda in vitro olarak çoğalabildiği gösterilmiştir (Hondalus ve Mosser 1994). Brumbaugh ve ark (1990) hücre içi canlı kalabilme yeteneği ile fagozom-lizozom füzyonu oluşması arasında korelasyon olduğunu göstermiştir. Enfeksiyondan sonra çeşitli zamanlarda elektron mikroskobu ile değerlendirme yapılarak morfolojik olarak bozulmamış bakteriler ortaya konulmuş, bunların fagozomların içerisinde çoğaldığı belirlenmiştir. *R. equi*'nin, hücre içi organizmalar, *Mycobacterium* türleri, *Nocardia asteroides* ve *Legionella pneumophila*'ya benzer

şekilde fagozomun olgunlaşma sürecini etkileyebileceği düşünülmüştür (Armstrong ve Hart 1971, Davis-Scibienski ve Beaman 1980, Horwitz ve Silverstein 1983, Clemens ve Horwitz 1995). Hem atlardan hem de farelerden elde edilen makrofajlarda bakteriyel üreme gözlenmiştir.

Birkaç saatlik bir başlangıç fazı gecikme evresinin ardından, *R. equi*'nin hücre içi iki katına çıkma süresi yaklaşık 6-8 saat olarak belirlenmiş ve çoğalmanın fagolizozomlar içerisinde sınırlı olduğu ortaya çıkmıştır. Hücre içinde çoğalan, *R. equi*'nin virulent suşlarının aksine, avirulent suşların in vitro ortamda makrofajlarda çoğaltılamadığı bildirilmiştir (Hondalus ve Mosser 1994, Vanniasinkam 2001).

Nordmann ve ark (1993) *R. equi* ile enfekte farelere anti- γ -IFN veya anti-TNF- α antikorları ile muamele edildiğinde bakteri miktarı önemli ölçüde azaltılmıştır. Bu iki sitokinin sağladığı koruma, makrofajları aktive etme ve fagositin mikrobiyal fonksiyonlarını arttırma kapasitelerinden kaynaklanmaktadır (Nathan ve ark 1983, Feinman ve ark 1987, Phumoonna 2005, Phumoonna ve ark 2006).

Değişen dozlarda *R. equi* ile intrabronşiyal inokulasyon sonrası immunokompetan farelerin pulmoner tepkisini incelenmiştir. Başlangıçta bakteriyel klirensin (birim zamanda temizlenme) ve lezyon gelişiminin doza bağlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Yüksek dozlarda bakteri verilmesi daha yavaş pulmoner klirens ve daha kapsamlı bronkopnömoni ile sonuçlanmıştır. Enfeksiyonun ilk 24 saati boyunca nötrofilik yanıt baskınken 48 ila 72 saat sonra mononükleer hücrelerin infiltrasyonu rol oynamaktadır. Enflamatuar yanıtın 4. günde gelişmesi ile yaygın akciğer pnömonisi şekillenmiş ve alveoler makrofajlarda hücre içi bakteriler gözlemlendiği bildirilmiştir (Hondalus 1997, Vanniasinkam 2001).

1.8.Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

1.8.1.CAMP Benzeri Reaksiyon

CAMP testi ilk olarak 1944 yılında Christie, Atkins ve Munch-Petersen tarafından tanımlanmıştır. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) suşlarının çoğu tarafından üretilen β -hemolizin enziminin hemolitik aktivitesi, hemolitik olmayan B grubu streptokoklar tarafından üretilen hücre dışı protein olan sitolizin ile artmaktadır. Beta hemolizinin bu faktörle etkileşimi kanlı agarda kolayca gözlenen

“sinerjik hemoliz” e neden olmakta ve suşun identifikasyonu yapılmaktadır (Arda ve ark 1992). Benzer şekilde *S. aureus*, *C. pseudotuberculosis* ve *R. equi* ile sinerjistik hemolitik reaksiyon (CAMP testi) bulunmaktadır (Fernandez-Garayzabal ve ark 1996, Vanniasinkam 2001) (Şekil 1.5.)



Şekil 1.5. *R. equi*'nin izolatının *S. aureus* ile CAMP testi

1.9. Korunma ve Kontrol

R. equi hastalığının erken tanısı ile kayıp azaltılmakta ve virü lent izolatların yayılmasının önlenmesi ile enfekte atlarda tedavi maliyeti düşürülmektedir. Enfeksiyonun kontrol edilebilmesi için tayların bulunduğu tavlaların dezenfeksiyonuna önem verilmesi ve biyogüvenlik önlemlerin alınması gerekmektedir. Endemik olarak görüldüğü bölgedeki çiftlikte bulunan tayların erken tanı ile haftada iki kez yapılan klinik muayeneleri sonucunda mortalite önlenebilmektedir (Prescott ve Hoffman 1993, Giguère ve ark 2011). Bu uygulama çoğu çiftlik için pahalı olup pratik değildir. Taylarda, antibiyotik tedavisi tutarsızlık göstermekle beraber maliyetlidir. En etkili antibiyotikler makrolid ve rifamisin olmakla beraber direncin önemli oranda arttığı bildirilmektedir. Etkenin hücre içi olmasından dolayı antibiyotik tedavisi de mümkün görülmemektedir. Tayın ölmesinin engellenmesine rağmen akciğerlerde oluşan deformasyondan dolayı koşu

performansı düşmektedir (Takai ve ark 1997, Giguère ve ark 2010, Burton ve ark 2013). Bu nedenle *R. equi* enfeksiyonundan korunmada aşılama, en etkili ve ekonomik yaklaşımdır. *R. equi*'nin fakültatif hücre içi yapısı nedeniyle bakteriye karşı tam koruma mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır. Ayrıca tayların yaşamının ilk günlerinde veya haftalarında bağışıklık sistemlerinin tam olarak gelişmemesinden dolayı doğumdan sonra korunma ön plana çıkmaktadır. (Giguère ve ark 2011). Bu sebeple gebe kısırakların aşılınması ve yavruların kolostrum yoluyla maternal antikorları alması en etkili korunma yöntemlerinden birisidir. *R. equi*'ye karşı korunmada humoral ve hücrel bağışıklığın önemi ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Hietala ve Ardans 1987, Hines ve ark 1997, Hines ve ark 2001, Patton ve ark 2004, Giguère ve ark 2011).

1.9.1.Pasif İmmünizasyon Yoluyla Korunma

Taylarda pasif immunizasyon amacıyla kolostrumun alınmasıyla ilgili yapılan in vitro çalışmalarda, *R. equi*'e karşı gelişen antikorların, alveolar makrofajlar tarafından etkenin öldürülmesinde etkili olduğu bildirilmektedir (Hietala ve Ardans 1987, Giguère ve ark 2011, Giles ve ark 2014). Bu işlem bakterilerin yok edilmesinde oldukça önemlidir ve taylarda *R. equi* hastalığının önlenmesinde veya kontrolünde büyük önem taşımaktadır.

Yetersiz kolostrum alımı ve kolostral IgG'nin emiliminin düşük olduğu yenidoğan yavrularda, *R. equi* hastalığı dahil olmak üzere birçok enfeksiyöz hastalığa karşı bu tayların duyarlı olma riskinin daha yüksek olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Raidal 1996, Giguère ve ark 2011, Giles ve ark 2014). Martens ve ark (1991), *R. equi* (7×10^8 cfu) ile aşılanmış gebe kısıraklardan alınmış kolostrum ve aşılanmamış kısırak kontrol grubundan alınan kolostrumdan oluşan denemelerde aşılanmış kısırakların aşılanmamış kısıraklardan daha yüksek seviyede *R. equi* antikoru taylarına transfer ettiğini göstermiştir.

Hiperimmün plazmada bulunan opsonize *R. equi* antikorlarının genç taylarda hastalık gelişimine karşı koruma sağlayabileceği bildirilmiştir (Martens ve ark 1989, Madigan ve ark 1991). Endemik çiftliklerde immunize edilmiş annelerden elde edilen hiperimmün (HI) plazmanın 2-3 haftalık taylara intravenöz yolla verilmesinin *R. equi* pnömonisine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Madigan ve ark 1991,

Higuchi ve ark 1999). Aşılanmış annelerden elde edilen HI plazma ile hastalığın ve ölümün etkili şekilde azaltıldığı ve enfeksiyonun endemik bulunduğu çiftliklerde HI plazmanın kullanımı önerilmektedir (Hurley ve Begg 1995). Plazma alan taylarda *R. equi* hastalığı insidansı %6.3 (1/16) iken kontrol taylarında insidansın %26.3 (5/19) olduğu bildirilmiştir (Higuchi ve ark 1999). Taylarda *R. equi*'nin deneysel enfeksiyonu ile ilgili yapılan çalışmada, saflaştırılmış anti-VapA ve anti-VapC antikorlarının enfeksiyondan korunmada etkili ve koruma derecesinin ise HI plazma ile elde edilene benzer olduğu gösterilmiştir (Hooper-McGrevy ve ark 2001). Erganiş ve ark (2014) IMS 3012 ile adjuvantlanmış inaktif bakteri ve VapA ile gebe kısırakların immunizasyonu sonrasında HI plazmaların deneysel enfeksiyon oluşturulan taylara uygulanması ile tayların *R. equi* tehdidine karşı etkili şekilde koruduğunu belirtmişlerdir. Pnömoninin klinik bulguları ve BAL örneklerinden *R. equi*'nin geri izolasyon oranı azaltılmıştır. *R. equi* enfeksiyonuna bağlı mortalite oranı kontrollere kıyasla % 50'den az ve organ ve dokularda oluşan lezyon 3.54 kat daha az olarak belirlenmiştir.

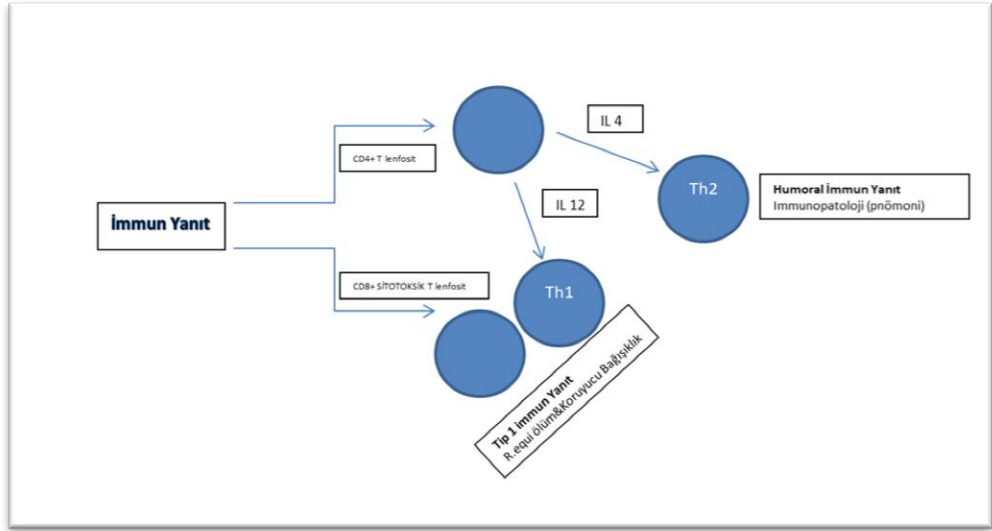
Clinica Equina (Buenos Aires, Arjantin) tarafından üretilen ticari Rhodovac= Bacterin aşısı, *R. equi*, VapA, equi faktörleri ve ekzoenzimleri içermektedir (Becu ve ark 1997). Bu aşı ile aşılanmış yetişkin atların HI serumlarının genç tayların *R. equi* pnömonisinden korunmada katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür (Fontanals ve ark 1997). Rhodovac aşısı ile ilgili yapılan saha denemelerinde aşı deri altı yolla gebe kısıraklara uygulanarak aşılanmış annelerin taylarında mortalitenin ortalama % 3' ten % 1,2' ye düştüğü bildirilmiştir (Becu ve ark 1997).

Hooper-McGrevy ve ark (2001), aşılanmış kısıraklardan doğan taylara *R. equi* HI ile pasif transferine rağmen bu tayların *R. equi* enfeksiyonundan korunmadığını bildirmiştir. Yapılan başka çalışmalar ile de HI plazmanın *R. equi*'nin neden olduğu pnömoniye önleme konusundaki başarısızlığı da bildirilmiştir (Hurley ve Begg 1995, Giguère ve ark 2002). Hurley ve Begg (1995) tarafından, doğumdan sonra 48 saat içinde taylara HI plazma uygulamasının *R. equi* enfeksiyonunda pnömoni gelişimini önemli ölçüde engellemediği veya hastalığın şiddetini önemli ölçüde azaltmadığı bildirilmiştir. Bu bulgular diğer araştırmacılar tarafından elde edilen bulgularla çelişmektedir (Madigan ve ark 1991). *R. equi*'den korunma için gerekli olabilecek plazma bileşenlerinin, bileşen içeriğinde Vap A bulunması veya miktarının

muhtemel farklılık sebebi olabileceği düşünülmüştür. İlaveten HI plazmasının etkinliğinin dozaj, uygulama zamanına bağlı olması, tayın immun sistem durumu, yönetim koşulları ve ortamdaki virulent bakterinin sayısı gibi mekanizmaların göreceli olmasından dolayı önleyici program uygulamaya başlamadan önce tüm faktörlerin tanımlanması gerektiği önerilmektedir (Dawson ve ark 2010).

1.9.2. Aktif immunizasyon Yoluyla Korunma

Bulaşıcı hastalıkların birçoğu aşılama ile kontrol altına alınmaktadır, ancak şimdiye kadar taylarda *R. equi* enfeksiyonunun kontrolü için geliştirilen istenen düzeyde etkili aşı mevcut değildir. Enfeksiyona karşı gelişen bağışıklıkta, organizmanın hücre içi patojen olması nedeniyle, Th1 bağışıklığı, Th2 tipi bağışıklıktan daha etkili olup önlenmesinde ise HI plazmanın intravenöz uygulaması yerine kısırakların ve tayların aktif immunizasyonu ile kontrol edilmesi gerektiği düşünülmektedir (Liu ve ark 2009, Giguère ve ark 2011) (Şekil 1.6). Neonatal dönemde memelilerin çoğu immunolojik olarak olgun değildir ve yetişkin hayvanlara kıyasla immunolojik yönden eksiklikleri bulunmaktadır (Patton ve ark 2005). Taylarda da neonatal dönemde yetişkin atlara kıyasla antijen sunan hücrenin fonksiyon yetersizliği ve tip 1 immun yanıtın oluşamaması immun yanıtı etkilemekte ve bu durum *R.equi*'ye karşı duyarlılığı artırmaktadır (Levy 2005, Liu ve ark 2009). Neonatal dönemde immunolojik bellek olmaması da tayları rhodococcus pnömonisine duyarlı kılar. *R. equi*' ye spesifik sitotoksik lenfositler 3 haftalık- 6 haftalık taylarda kısıtlı aktivite göstermesine rağmen 8 haftalık taylarda artmaktadır. (Giguère ve ark 2011).



Şekil 1.6. Taylarda rhodococcal pnömoninin önlenmesi için etkili bir aşının Tip 1 yanıtı sağlaması gerekmektedir. CD4 + (yardımcı) ve CD8 + (sitotoksik) T hücreleri *R. equi*' ye karşı savunmada rol alan temel lenfositlerdir. IL-2 sitokini Th2, IL-4 Th1 lenfositini indüklemektedir. Tip 1 yanıt; Th1 lenfositler ile makrofajların aktivasyonu ve antijene özgü sitotoksik T lenfositler ile *R. equi* ile enfekte olmuş hücreleri öldürmesini ve koruyucu bağışıklık oluşmasını sağlamaktadır. Aksine, Th2 yanıt humoral immün yanıt oluşmasına rağmen taylarda potansiyel olarak yaşamı tehdit edici pulmoner lezyonlar gelişebilmektedir (Giguère ve ark 2011).

VapA'nın, taylarda *R. equi* enfeksiyonlarına karşı koruyucu bağışıklıkta rol oynayan önemli bir antijen olabileceğine dair birçok kanıt bulunmaktadır (Fernandez ve ark 1997, Prescott ve ark 1997). Farelerde elde edilen verilere göre, VapA ile zenginleştirilmiş antijenlerin enfeksiyonun deneysel oluşturulan peritoneal formunda koruyucu bir hücresel bağışıklık oluşumunu desteklediği kanıtlanmıştır (Prescott ve ark 1997). Farelerde yapılan çalışmada; bakterin, VapA, IMS adjuvantı ile formüle edilen aşının sadece bakterin ve IMS adjuvantı bulunan aşı ile aşılanmış farelere göre antikor titrelerinin daha erken yükselmeye başladığını bildirmişlerdir (Erganiş ve ark 2015). Gebe kısırakların Triton X-100 ile zenginleştirilmiş VapA antijeni ile immunize edilmesiyle taylara göre daha yüksek seviyede IgG transfer edildiği gözlenmiştir (Cauchard ve ark 2004). Kohler ve ark (2003) *R. equi* antijenleri ve *R. equi* kültür süpernatantı kullanarak denemeler gerçekleştirilmiştir ve bu proteinlerin yetişkin atlarda Th1 cevabını önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir.

Genel olarak hücre içi bakteriyel enfeksiyonlara karşı DNA aşılarının koruyucu bir Th1 cevabını etkili şekilde uyardığı gösterilmiştir (Klinman ve ark 1996, Wang ve ark 1998). Bu nedenle bazı araştırmacılar *R. equi*' ye karşı DNA

aşılarının geliştirilmesine odaklanmıştır. *R. equi* VapA' ya dayanan DNA aşıları ile aşılanan BALB/c fare serumlarında antikor seviyesinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Yetişkin atlarda VapA-DNA aşılamaının immun yanıt oluşturduğunu fakat genç taylarda VapA' ya spesifik antikorlar oluşmadığı gösterilmiştir (Vanniasinkam ve ark 2005).

1.10. Rekombinant Aşılar

Antijen olarak kullanılan proteinlerin zahmetli, az miktarlarda ve maliyeti artıran geleneksel saflaştırma işlemleri kullanılarak hazırlanmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi ile invitro olarak elde edilmesi zor, saflaştırılamayan, istenilen miktarda proteinler için pratik bir yöntem olarak aşı gelişimini büyük ölçüde kolaylaştırmıştır.

Hedeflenen antijeni kodlayan gen bir vektör üzerinde klonlanarak *E. coli* gibi bir bakteri veya maya konakçıya aktarılır. Rekombinant mikroorganizmalar, laboratuvarı yüksek hacimlerde üretilir ve istenen proteinin ekspresyonu, IPTG ilavesi gibi farklı teknikler kullanılarak indüklenir. İlgili protein, rekombinant organizmanın diğer proteinlerinden kolayca izole edilebilir. Bununla birlikte konakçının stabilitesini ve korumasını azaltabilen veya kaybedebilen proteinin üç boyutlu yapısını değiştirebilir. Patojen mikroorganizmaların yaptığı gibi geniş bir yanıtı aktive etmezler. İstenilen spesifik immunodominant antijenlere karşı immun cevabı hedeflemektedir (Mak ve Saunders 2005).

1.10.1. rVapA ile İlgili Yapılan Aşı Çalışmaları

pVR1055'e vektörüne klonlanan VapA geni ile (pVR1055vapA) COS-7 kompetan hücrelerine aktarımı yapılarak yetişkin midillileri 14 gün arayla 2 kez kombine intradermal ve intrabronşiyal yolla aşılamışlar ve pVR1055vapA ile aşılanan atların aşılanmayan kontrol grubuna göre bronkoalveolar lavaj örneklerine yapılan ELISA testinde antikor titrelerinde anlamlı artışlar olduğu belirtilmiştir (Lopez ve ark 2003, Giles ve ark 2014).

Giles ve ark (2016) *R. equi* VapA genini HAdV5 vektöre (Clontech, USA) aktararak eksprese edilen rekombinant proteini aşı antijeni olarak kullanmıştır. Fareler HAdV-vapA ile 0. ve 12. günlerde aşılanarak 28. günde canlı virulent *R. equi*

ile çelınç yapıldı. Aşılanan farelerde güçlü IgG ve Th1 yanıtı oluştığı ve farelerin akciğerlerinde bakteriyel temizlenmenin hızlı olduğu gözlenmiştir.

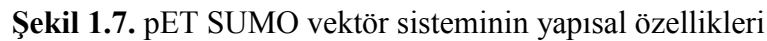
R. equi VapA genini *Lactococcus lactis* (LL-VapA) kompetan bakterisine aktarılmıştır. rvapA sentezleyen bu kompetan bakterinin antijen olarak kullanarak hazırlanan aşı ile intragastrik ve intranazal yolla immunize edilen farelerin BAL numunelerinde daha yüksek antikör titresi tespit edildiğini, intranazal uygulamanın daha yüksek immun yanıtı oluşturduğu bildirilmiştir (Cauchard ve ark 2011).

1.11. Klonlama Amacıyla Kullanılan Vektör Sistemi

Vektör sistemleri, proteinlerin saflaştırmalarını sağlamak, rekombinant proteinlerin eksprese edilmesini kolaylaştırmak ve çözünür protein miktarını artırmak için kullanılmaktadır (Singh ve ark 2012). Rekombinant protein sentezinde *E. coli*, hem araştırma hem de ticari amaçlı olarak en yaygın kullanılan kompetan hücrelerden biridir. *E. coli* kullanımının birçok avantajı bulunmasına rağmen bu bakterinin kullanımı sonrasında fazla miktarda rekombinant proteinin çözülebilir olmaması en büyük problemdir. Çözülebilir protein sentezini artırmak ve çözünemeyen protein oluşumunu engellemek amacıyla sentetik uyarıcılar, ısı, ve promotor gücü uygun düzeyde olması gerekmektedir. İnklüzyon form ve hücrel toksisite bulunmasının, çözülebilir rekombinant protein sentezini ve proteinin süpernanantta bulunma miktarını düşürdüğü bildirilmiştir (Becker ve ark 1996, Singh ve ark 2012).

1.11.1. Champion™ pET SUMO Protein Expression Vektör

Champion™ pET SUMO Ekspresyon Sistemi rekombinant proteinlerin *E.coli*'de klonlanması ve yüksek seviyede çözünür protein ekspresyonu için tasarlanan bir vektör sistemidir. *Small Ubiquitin-like modifier* (SUMO) vektör sistemi ile daha yüksek ekspresyon ve daha yüksek çözünürlükte protein miktarını sağladığı bildirilmektedir. Hücrel proteinlerin ubiquitin benzeri modifiye SUMO tarafından kovalent modifikasyonu, nükleer taşıma, sinyal iletimi ve proteinlerin stabilizasyonu gibi çeşitli hücrel işlemleri düzenlemektedir. Hücrel proteinlere kovalent olarak eklendikten sonra SUMO protein; DNA etkileşimlerini, hedef proteinin lokalizasyonunu ve stabilitesini düzenlemektedir. SUMO, görünür bir moleküler ağırlığa sahip ve 11 kDa'dır. Hedeflenen proteinlerle birleşen SUMO,



E. coli kompetan hücre olarak kullanımda güvenli bir mikroorganizma olarak sınıflandırılır ve protein ürünleri üretmek için ekonomik olarak uygun bir araç olduğunu kanıtlamıştır. Bununla birlikte, tüm proteinler *E. coli*' de maksimum seviyelerde eksprese edilebilmesi için koşulların optimizasyonu gerekmektedir (Broedel ve ark 2001). Rekombinant proteinlerin üretimini optimize etmenin amacı, birim zamanda birim hacim başına en yüksek miktarda fonksiyonel ürün elde etmektir. *E. coli*' de bir rekombinant proteinin hücre içi birikim seviyesi, hücre yoğunluğuna ve proteinin spesifik aktivitesine bağlıdır. Bir rekombinant proteinin üretimini optimize etmek için kültür ortamı seçimi ve zamanlama kontrolü oldukça önemlidir (Kleman ve Strohl 1994, Lee 1996). Buna rağmen, besiyeri formülasyonun

rekombinant proteinlerin ekspresyonu üzerindeki etkilerine çok önem verilmemektedir. Böyle bir üretimin tüm bu avantajlarına rağmen rekombinant proteinlerin ekspresyonu üzerine besiyeri kompozisyonunun etkileri hakkında sınırlı çalışma bulunmakta ve geleneksel olarak Luria- Bertani (LB) buyyon kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda LB ile yüksek verim alınamadığı bildirilmektedir (Broedel ve ark 2001). Optimum bir besiyeri formülasyonu geliştirmek için kullanılan temel yaklaşım ampirik ve deneme yanılma süreçlerine dayanmaktadır.

1.13. Adjuvant Kullanımı

Adjuvantlar (Latince'de adjuvare yardımcı olmak) 1920'lerin başından itibaren aşının etkinliğini arttırmak için kullanılmaktadır (Lewis ve Loomis 1924, Glenny ve ark 1926, Erganiş ve İstanbulluoğlu 1993) Yardımcı aktiviteye sahip olan maddelerin kullanımı ve bu konudaki literatür büyük ölçüde genişlemiş olsa da mekanizma biçimleri çoğunlukla sınırlı ve deneysel kalmıştır (Cox ve Coulter 1992, Stewart-Tull 1995). Adjuvantların etki mekanizması Çizelge 1.1' de gösterilmiştir (Cox ve Coulter 1997)

Çizelge 1.1. Adjuvantların etki mekanizması (Cox ve Coulter 1997)

Etki Mekanizması	Adjuvant Tipi	Yararları
İmmunomodulasyon	Genellikle küçük moleküller	İmmun yanıtın düzenlenmesi ve Th1 veya Th2 seçimi
Sunum	Genellikle amfipatik moleküller (hidrofilik-hidrofobik özellik)	Antikor yanıtının artırılması
Sitotoksik T Lenfosit İndüksiyonu	İmmünojeni bağlayabilen hücre zarını bozabilen partiküller MHC-1 e doğrudan bağlanabilen W/O emülsiyonları	Proteinin sitozolik işlenmesi Kompleks proteinlerin işlenmesi
Hedefleme	İmmünojeni bağlayan partiküllü adjuvantlar Makrofajlarda bulunan lektin reseptörlerini hedefleyen karbonhidrat yapılı adjuvantlar	Adjuvant ve immünojen olarak etkili kullanım Hedefe özgü immün yanıt
Depo etkisi	W/O emülsiyonları Mikropartiküllü ve nanopartiküllü	Etkili tek doz aşılama için potansiyel aday

Bir hastalığın patogenezi biliniyorsa, aşı formülasyonu için koruyucu bir bağışıklık tepkisi oluşturabilen bir adjuvant seçilebilir. Alternatif olarak, eğer patogenezi ve immunoloji iyi anlaşılmamışsa, bir dizi farklı immün yanıt oluşturabilen adjuvantlar çalışma için rasyonel olarak seçilebilir. İstenilen farklı etkileri arttırmak için çeşitli adjuvantlar karşılaştırılarak kullanılabilir (Cox ve Coulter 1992).

Adjuvantların kazanılmış immün yanıtı antijene karşı artırma ve yönlendirme konusunda oldukça önemli olması nedeniyle uygun adjuvantların bulunması aşı formülasyonları için temel öneme sahiptir, çünkü güçlü adjuvant etkisi genellikle spesifik adjuvant ve antijenin etkileşimlerinden etkilenmektedir ve kullanılan aşılara göre değişmektedir. Bu bağışıklık güçlendirici maddelerin dikkate alınması elde edilmiş antijenlerden oluşan yeni alt ünite aşılarının geliştirilmesinde son yıllarda önem kazanmıştır (Pashine ve ark 2005).

1.13.1. Partiküllü Adjuvantlar

Alüminyum hidroksit, alüminyum fosfat gibi alüminyum tuzları çözünmeyen, jel benzeri çözeltilerdir. İmmünojen jelle elektrostatik etkileşim ile bağlanmaktadır (Levine ve ark 1955, Cox ve Coulter 1997, Gupta 1998, Coffman ve ark 2010). İnsan ve hayvan aşılarında 1930'dan beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Güçlü Th2 uyarımını sağlamakta ve depo etkisi bulunmaktadır. Ayrıca güçlü IgE yanıtı sıklıkla bildirilmiştir (Hamaoka ve ark 1973, Singh ve O'Hagan 1999, Aguilar ve Rodriguez 2007). Alüminyum tuzları ucuz ve formüle edilmesi kolaydır (Bomford 1989, Gupta 1998, Coffman ve ark 2010).

Yağda su emülsiyonları (W/O), yağ fazında (tipik olarak mineral yağ) yüzey aktif cismi ile stabilize edilmiş mikro su dalgalarıdır. Zayıf immunomodulatördürler, kısa vadeli depo etkisi vardır, özellikle hidrofilik immünojenlerde iyi antikor uyarmak için nispeten ucuzdurlar. W/O formunda olan %10 mannide monooleate içeren "Incomplete Freund's Adjuvant" (IFA) ve yine W/O formunda olan, inaktif BCG bulunan "Complete Freund's Adjuvant" (CFA) olarak iki önemli adjuvant bulunmaktadır (Salk ve ark 1951, BD ve Berg 1966, Singh ve O'Hagan 1999, Coffman ve ark 2010). Freund's adjuvantları insan ve veteriner aşıları için uzun süre kullanılmış olmakla birlikte toksik etkileri nedeniyle ticari olarak kullanılmamaktadır (Ott ve Van Nest 2007, Coffman ve ark 2010).

Su içinde yağ (O/W) emülsiyonları bir su fazında yüzey aktif cisimleri (örneğin Tween 80) ile stabilize edilmiş yağ partikülleridir. Antijen sunumunun önemli olduğu amfipatik moleküller için uygundurlar (Cox ve Coulter 1997, Coffman ve ark 2010).

İmmün uyarıcı kompleksler, ISCOM matriksi, saponinlerin kolesterol ve fosfolipid ile etkileşiminden kaynaklanan yaklaşık 40 nm çapında açık bir kafes benzeri yapıdır. ISCOM'lar, içine protein veya diğer immünojenik moleküllerin dahil edildiği yapılardır. Bunlar veteriner aşıları için kullanılmaktadır ve tanımlanmış saponin fraksiyonları ile birlikte insanlarda çeşitli aday aşılarda çalışılmaktadır. ISCOM'lar güçlü Th1 ve Th2 yanıtlarını hedeflemektedir. Ucuz olması, hayvan çalışmalarında güvenli olması nedenleriyle kullanılmaktadır. Bununla birlikte, immünojeni dahil etmek zordur ve çoğu durumda etkili olması için çözünür

immunomodölatörlere ihtiyaç duyarlar (Hunter ve ark 1981, Playfair ve Souza 1986, Cox ve Coulter 1997, Singh ve O'Hagan 1999, Ott ve Van Nest 2007)

Nano ve mikropartiküller siyanoakrilatlar ve PLG kopolimerlerinden oluşan bir dizi biyouyumlu polimerin oluşturduğu 10-1000 nm (nanopartiküller) ve 1-100 µm (mikropartiküller) boyutunda küçük katı halde partiküllerdir. Haftalar aylar süren uzun süreli bir depo etkisi bulunmaktadır, tek dozlu çoklu salımlı aşılar için uygun adjuvantlardır. İmmünmodölatör adjuvantların partiküllere katılması etkinliklerini artırır. Hazırlık ve üretim aşamaları diğer adjuvantlara kıyasla nispeten zordur (Kreuter 1988, Eldridge ve ark 1991, Cox ve Coulter 1997, Ott ve Van Nest 2007, Dawson ve ark 2010, Zhao ve ark 2014).

1.13.2. Partiküllü Olmayan Adjuvantlar

Tek başına tam bir adjuvant etkisi gösteremese dahi partiküllü bir adjuvant ile birlikte uygulandığında etkisini artırmaktadır. Muramil dipeptid Mycobacterium' dan ekstrakte edilen lipofilik derivatları Th1 yanıtını indüklerken, hidrofilik derivatlar Th2 yanıtını indüklemeye yardımcı olmaktadır. Saponin güçlü Th1 ve TH2 yanıtın indüklenmesini desteklemekte ve veteriner aşılarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Lipid A insan aşılarında yaygın kullanılan Th1 yanıtı güçlendiren yağ asitidir. Bunlar diğer adjuvanlar ile kombine kullanılmaları durumunda aşının etkinliğini artırmaya yardımcı olmaktadır (Cox ve Coulter 1997, Dawson ve ark 2010, Zhao ve ark 2014).

1.13.3.Vap Proteinleri ile İmmünizasyonda Kullanılan Adjuvantlar

Farelerde yapılan Vap proteinleri ile adjuvant olarak alüminyum hidroksitin kullanımında Th2 yanıtının yükseldiği fakat bakteriyel temizlenmenin olmadığı bildirilmiştir (Prescott ve ark 1997)

Atlarda yağ bazlı adjuvantların su bazlı adjuvantlara kıyasla daha fazla inflamasyona neden olduğu bildirilmektedir (Lunn ve Townsend 2000). Su bazlı nanoparçacık içeren IMS 3012 adjuvantının yangı oluşturmadağı ve antikor cevabını tetiklediği gözlenmiştir (Cauchard ve ark 2004). Cauchard ve ark (2004) su bazlı bir nanopartikül adjuvantı IMS 3012 ile birlikte VapA proteininin gebe kısıraklara verilmesi sonucunda, sadece inaktif tüm hücre *R. equi* ve sadece VapA antijeni ile aşılanmış iki farklı kontrol grubunda bulunan atlara kıyasla daha yüksek serum IgG

sağladığı bunun da taylara aktarıldığı bildirilmiştir. IMS 3012 ile VapA aşıl原因an kısırakların 32 tayında hiçbir vaka gözlenmemişken, diğer kısırakların 15 tayının 4'ünde *R. equi* pnömonisi gelişmiştir.

Cauchard ve ark (2014), IMS 3012 ve PetGel A adjuvantlarını kullanarak atlarda yaptıkları aşılmalarda her iki adjuvantında *R. equi* antijenine karşı bağışıklık amacıyla oluşan immun yanıtı güçlendirdiğini fakat polimerik adjuvant PetGel A'nın, nanopartiküler adjuvant IMS 3012'den daha iyi bir immun güçlendirme kapasitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu durumun etkili bir adjuvantın aşı formülasyonunda az miktarda kullanılmasının, daha az doku reaksiyonuna neden olacağı bildirilmiştir.

Erganiş ve ark (2017) *R. equi* (K2002 suşu) kullanılarak Montanide IMS 3012 (IMS) ve Montanide Pet Gel A (PGA) adjuvantları ile (bakteri + VapA + IMS ve bakteri VapA + PGA) iki inaktif aday aşı hazırlanmıştır. Gebe kısıraklar 8., 9. ve 10. aylarda, aşıl原因arak, PGA adjuvantı ile hazırlanan *R. equi* aşısının antikor cevabının IMS ile hazırlanan aşıdan daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Su bazlı adjuvantlar arasında gözlenen etkinlik farkları, büyüklüklerine ve kimyasal yapılarına bağlı olarak değişen etki mekanizmalarına bağlanabilir (Aguilar ve Rodriguez 2007). PetGel A hem depo etkisi hem de doğal bağışıklığın direkt aktivasyonunu indükleyebilir. Depo adjuvantların etki mekanizması antijenlere yavaş salınım sağlama ve antijen sunan hücrenin aktivasyonunu artırma eğilimine dayanır. IMS 3012 adjuvantının etki mekanizması, enjeksiyon bölgesindeki depo etkisiyle değil antijen sunan hücrelerle doğrudan etkileşimine bağlıdır ve immunstimülatör olması nedeniyle hücresel immunité amacıyla geliştirilen bir adjuvanttır (Waghmare ve ark 2009).

Bu çalışmada i) kullanılan pET SUMO vektör sistemi ile rVapA proteininin saflaştırılması, çözünürlüğünün artırılması, fazla miktarda eksprese edilmesinin sağlanması; ii) Tryptone- Yeast (TY), LB, Terrific Broth (TB), 2Yeast- Tryptone (2YT), Super Broth (SB) ve besiyerlerinde; 90 dk, 120 dk, 180 dk, 240 dk indüklemé süreleri denenerek yüksek miktarda rVapA proteinin elde edilmesi; iii) rVapA proteinin antijenik benzerliğinin doğal VapA (dVapA) ile karşılaştırılması, rVapA ve dVapA proteinlerini 2 farklı adjuvant (IMS 3012, PetGel A) ile kombine edilerek 4

farklı aday aşının geliştirilmesi ve fareler üzerinde etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Gereç

2.1.1. Bakteriyel Suşlar ve Plazmid

R. equi suşu

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (SÜVF) Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan sahadan izole edilen 18 adet suş içerisinde CAMP testi ile çalışmada kullanılmak üzere VapA aktivitesi en yüksek olan suş SÜVF 185 nolu *R. equi* suşu seçildi.

CAMP test

Besiyeri

Kanlı Agar (Merck, 113414) 40 gr

Koyun kanı 50 ml

Distale su ile hacmi 1000 ml' ye tamamlandıktan sonra pH 7 olarak ayarlandı. 121 0C'de 15 dakika otoklavlandı.

C. pseudotuberculosis suşu

Çalışmada SÜVF Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan SÜVF 323 nolu *C. pseudotuberculosis* suş kullanıldı.

E. coli suşları ve plazmid

Kompetan hücre olarak *E. coli* alt tipi olarak; I- One Shot®Mach1™-T1R F-Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 hsdR(rK- mK+) ΔrecA1398 endA1 tonA (Champion™ pET SUMO Protein Expression System-Invitrogen) II- One Shot®BL21(DE3) F-ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3) (Champion™ pET SUMO Protein Expression System-Invitrogen, K300-01) kullanıldı.

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

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

National Center for Biotechnology Information (NCBI) verilerine göre *R. equi* VapA geni 543 bp uzunluğundadır. Klonlama çalışması için NCBI veri tabanına göre, VapA geninin Open Reading Frame (ORF) bölgesi ve VapA enziminin metiyonin ile başlayan triptofan ile sonlanan aminoasit dizilimi belirlendi (Şekil 2.1).

```
VERSION      KT443895.1
KEYWORDS     .
SOURCE      Rhodococcus hoagii (Rhodococcus equi)
ORGANISM    Rhodococcus hoagii
            Bacteria; Actinobacteria; Corynebacteriales; Nocardiaceae;
            Rhodococcus.
REFERENCE   1 (bases 1 to 543)
AUTHORS     Nehra,K., Choubey,S.K., Kumar,S.B., Dubey,R., Sharma,V. and
            Kumar,A.
TITLE       Rhodococcus equi 17-kDa virulence associated protein A (vapA) gene
            from Indian Equine samples
JOURNAL     Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 543)
AUTHORS     Nehra,K., Choubey,S.K., Kumar,S.B., Dubey,R., Sharma,V. and
            Kumar,A.
TITLE       Direct Submission
JOURNAL     Submitted (18-AUG-2015) Biotechnology, Central Military Veterinary
            Laboratory (CMVL), Sardhana Road, Meerut Cantt, Meerut, UP 250001,
            India
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES    Location/Qualifiers
     source   1..543
              /organism="Rhodococcus hoagii"
              /mol_type="genomic DNA"
              /strain="CMVL_517"
              /db_xref="taxon:43767"
     gene     <1..>543
              /gene="vapA"
     CDS      <1..>543
              /gene="vapA"
              /codon_start=1
              /transl_table=11
              /product="virulence associated protein A"
              /protein_id="AMB36549.1"
              /translation="KTVSKAIAATAVAAAAHIPAGVANATVLDSSGSSAILNSGAGS
              GIVGSGSYDSSTTS LNLQKDEPNRASDTAGQEQQYDVHGDVISAVVYQRFHVFGE
              KVFDDGAGGLTLPAGAGFWGTLFTNDLQRLYKDTVSFQYNVAGPYLNINFFDSSG
              SFLGHIQSGGVSTVVGVGGS"
ORIGIN      1 aagacggttt ctaagcgcat cgcagccaca gccgtagctg cggctcggc tatgattccc
            61 gccggcgtcg ctaatcgac cgttcttgat tccgtagca gcagtgcgat tctcaatagt
            121 ggggcaggca gtggcattgt cgttctggg agctatgaca gctcgagac ttcgttaaac
            181 cttcagaag acgaaccgaa cggtcgagca agcgataccg cgggcaaga gcagcagtac
            241 gacgttcacg gagacgtcat cagcgggtc gttaccaga ggtttcacgt attcggcca
            301 gaaggaaagg tcttcgatgg cgatgcaggg ggaatcacgc ttctggggc cggcgcttc
            361 tgggggactc tcttcacaaa tgaccttcag cgtctctaca aagacacgt ctgattccag
            421 tacaacgccc tggggccata cctgaacatc aactcttcg atagctcagg tagcttcctc
            481 ggccatatcc agtccgtag agttagtact gtgtagggc tcggcggcg ctctgtagc
            541 tgg
```

Şekil 2.1. NCBI Genbank Erişim No KT443895 olan *R. equi* VapA geni ile ilgili veriler

2.1.3. Besiyerleri

R. equi besiyeri ortamı

VapA proteinini fazla miktarda sentezletirmek için %5 at serumu içeren ve %5 glikoz ile zenginleştirilen Brain Heart Infüzyon Broth (Merck, 1.10493) sıvı besiyeri ve bakterinin koloni morfolojisini ve etkinliğini gözlemlemek amacıyla %5 koyun kanı içeren Blood Agar Base (Merck, 1.10886) katı besiyeri kullanıldı.

Rekombinant Protein Üretimi İçin Kullanılan Besiyerleri

Rekombinant kolonileri geliştirmek Luria Bertani (LB) Agar (Merck, VM361985) ve stoklamak için LB Broth (Merck, 71753) kullanıldı. Çözünür VapA proteinini fazla miktarda elde etmek için LB, TY, TB, 2YT, SB sıvı besiyerleri kullanıldı.

Luria Bertani (LB)

Trypton	10.0 gr
Maya ekstraktı	5.0 gr
NaCl	5.0 gr

Distile su ile hacmi 1000 ml' ye tamamlandıktan sonra pH 7 olarak ayarlanarak 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

Trypton Yeast (TY)

Tryptone	26.8 gr
Maya ekstraktı	21.4 gr
Monopotassium fosfat	5.4 gr
Di-ammonium hydrogen fosfat	1.6 gr
Magnezyum sülfat	1.2 gr
NaCl	8.5 gr

Gliserol	10 gr
----------	-------

Distile su ile hacmi 1000 ml' ye tamamlandıktan sonra pH 7 olarak ayarlanarak 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

Terrific Broth (TB)

Maya ekstraktı	24.0 gr
----------------	---------

Di-potasyum fosfat	9.4 gr
--------------------	--------

Monopotasyum fosfat	2.2 gr
---------------------	--------

Gliserol	4 gr
----------	------

Kazein	12.0 gr
--------	---------

Distile su ile hacmi 1000 ml' ye tamamlandıktan sonra pH 7 olarak ayarlanarak 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

2 Yeast Tripton (2YT)

Tripton	16.0 gr
---------	---------

Maya ekstraktı	10 gr
----------------	-------

NaCl	5.0 gr
------	--------

Distile su ile hacmi 1000 ml' ye tamamlandıktan sonra pH 7 olarak ayarlanarak 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

Super Broth (SB)

Maya ekstraktı	24.0 gr
----------------	---------

Di-potassium phosphate	11.4 gr
------------------------	---------

Monopotassium phosphate	1.7 gr
-------------------------	--------

Gliserol	5 gr
----------	------

Distile su ile hacmi 1000 ml' ye tamamlandıktan sonra pH 7 olarak ayarlanarak 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

2.1.4. Kullanılan Kitler

DNA ekstraksiyon kiti

R. equi' nin DNA ekstraksiyonu Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120) ile gerçekleştirildi. İlave olarak; 50 mM etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), lizozim (10 mg/ml) ve %70 soğuk etanol kullanıldı.

EDTA (50mM, PH:8)

EDTA	0,93 gr
------	---------

Distile su	50 ml
------------	-------

Lizozim (20 mg/ml)

Lizozim	20 mg
---------	-------

Distile su	1000 µl
------------	---------

Soğuk Etanol %70 (w/v)

Etanol	70 ml
--------	-------

Distile su	100 ml
------------	--------

Champion™ pET SUMO protein ekspresör sistem kiti

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

pET SUMO T/A klonlama solüsyonları

pET SUMO vektör

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

10X PZR solüsyon

100 mM Tris-HCl, pH 8,3 (at 42°C); 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, %0,01 gelatin içermektedir.

dNTP miks

12,5 mM dATP, 12,5 mM dCTP, 12,5 mM dGTP, 12,5 mM dTTP (pH8,0)'den oluşmaktadır.

10x bağlanma solüsyonu

60 mM Tris-HCl (pH 7,5), 60 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 70 mM β-mercaptoethanol, 1 mM ATP, 20 mM dithiothreitol, 10 mM spermidinden oluşmaktadır.

T4 DNA Ligaz

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

Süper optimal besiyeri

Super optimal besiyeri (SOC) % 2 tryptone, % 0,5 maya ekstrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukozdan oluşmaktadır.

SUMO proteaz solüsyonları

SUMO proteaz

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

10X SUMO proteaz solüsyon+ tuz

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

10X SUMO proteaz solüsyonu– tuz

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

Jel ekstraksiyon kiti

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

Plazmid ekstraksiyon kiti

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

Rekombinant protein saflaştırma kiti

Ni-NTA Spin Kit (QIAGEN, 31314) kullanılarak rVapA proteininin saflaştırma işlemi yapıldı.

Protein ölçümü

Bradford solüsyonu

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

2.1.5. Kanamisin Stok Solüsyonu

Kanamisin saf (AppliChem, A1493) 10 mg ultra saf su 1000 µl'ye tamamlanarak 0,22 µm (Merck, Millipore) ile filtre edildikten sonra -20°C de saklandı.

2.1.6. IPTG (1M) Stok Solüsyonu

IPTG (AppliChem, A4773 0,238 gr ultra saf su 1000 µl'ye tamamlanarak 0,22µm (Merck, Millipore) ile filtre edildikten sonra -20°C'de saklandı.

2.1.7. DNA Amplifikasyonu

Taq polimeraz ve PZR karışımı

Taq polimeraz (Fermentas, EP0402) amplifikasyon aşamasında kullanıldı. PZR miksi için 10× Taq buffer 750 mM Tris-HCl (pH 8,8, 25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, % 1 (v/v) Tween 20 kullanıldı.

Deoksinükleotid trifosfat seti

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

Kullanılan primerler

REQUI-F 5'-GGTCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTC 3'

REQUI-R 5'-CGCAAGCTTGGGGTTGAGCCCAA 3' (Javed ve ark 2017)

VAPA-R 5'-ATGAAGACGGTTTCTAAGGCGAT -3'

VAPA-F 5'- TCACCAGCTACCAGAGCC -3'

SUMO Forward 5'-AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3'

T7 Reverse 5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3' (Champion Pet SUMO, Thermo, USA)

Marker

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

2.1.8. Agaroz Jel Elektroforezi

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

Tris base 242 gr

0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 ml

Glasiyal asetik asit	57.2 ml
----------------------	---------

Distile su	1000 ml
------------	---------

Agaroz jel (%1) (w/v)

Agaroz	2 gr
--------	------

TAE	200 ml
-----	--------

Etidyum bromür stok solüsyonu (10 mg/ml)

Etidyum bromür	20 mg
----------------	-------

Distile su	1.98 ml
------------	---------

Işık olmayan ortamda muhafaza edildi, agaroz jelde son konsantrasyonu 5 g/ml olacak şekilde ilave edildi.

Yükleme tamponu

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

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

Unstained protein marker

Elektroforez işleminde stained protein marker (Precision Plus Protein Dual Color, 1610374, Biorad) kullanıldı.

Akrilamid/Bisakrilamid

Akrilamid	14,88
-----------	-------

Bisakrilamid	0,12 gr
--------------	---------

Distile su	50 ml
------------	-------

4×Tris-Cl 1.5 M (pH: 8,8)

Tris-Cl	11,82 gr
---------	----------

Distile su	50 ml tamamlandı ve 1N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı.
------------	--

4×Tris-Cl 1 M (pH: 6,8)

Tris/Cl	7,88 gr
---------	---------

Distile su	50 ml tamamlandı ve 1N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı.
------------	--

Amonyum Persülfat (%20)

APS	0.2 gr
-----	--------

Distile su	1 ml
------------	------

Amonyum Persülfat (%20)

SDS	0.2 gr
-----	--------

Distile su	1 ml
------------	------

Tris-Glisin Tamponu

Tris	6 gr
------	------

Glisin	28,8 gr
--------	---------

SDS	2 gr
-----	------

Distile su	2000 ml
------------	---------

4×SDS Boya Tamponu

Tris-Cl (1 M)	2 ml
---------------	------

SDS	0.8 gr
-----	--------

Gliserol	2 ml
----------	------

Bromothymol blue	0.04 gr
------------------	---------

Distile su	10 ml
------------	-------

Ayırma Jeli

Akrilamid/Bisakrilamid	3.3 ml
------------------------	--------

1.5.M Tris HCl (PH 8.8)	2.5 ml
-------------------------	--------

SDS (%20)	50 µl
-----------	-------

APS (%20)	50 µl
-----------	-------

TEMED	4 µl
-------	------

Distile su	4.1 ml
------------	--------

Yürütme jeli

Akrilamid/Bisakrilamid	650 µl
------------------------	--------

1.M Tris HCl (PH 6.8)	1.25 ml
-----------------------	---------

SDS (%20)	50 µl
-----------	-------

APS (%20)	50 µl
-----------	-------

TEMED	5 µl
-------	------

Distile su	3.5 ml
------------	--------

Commasie Brilliant Blue boya çözeltisi

Commasie Brilliant Blue	1 gr
-------------------------	------

Metanol	400 ml
---------	--------

Glasiyel Asetik Asit	100 ml
----------------------	--------

Distile su	500 ml
------------	--------

Boya giderme çözeltisi

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

2.1.10. Western Blot

Prestained protein marker

Elektroforez işleminde stained protein marker (Precision Plus Protein Dual Color, 1610374, Biorad) kullanıldı.

Nitroselüloz membran

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

Transfer tampon

Tris (25 mM)	3 gr
Glisin (150 mM)	11.3 gr
Metanol (%20)	200 ml
Distile su	1000 ml'e tamamlanarak pH: 8,3'e ayarlandı ve +4°C saklandı.

Yıkama solüsyonu (10X TBST)

Tris-base (1.0 M)	121.1 gr
NaCl (1.5 M)	87.7 gr
Tween 20 (%1.0)	10 ml
Distile su ile	1000 ml'e tamamlarak pH:7,5'e ayarlandı ve +4°C saklandı.

Bloklama solüsyonu (10×TBSTM)

TBST	100 ml
Yağsız Süt Tozu	3 gr

Negatif Serum

Enfeksiyon geçirmemiş annelerden doğan infantil tayların kan serumu kullanıldı.

Pozitif serum

ELISA ile en yüksek titre verdiği belirlenen *R. equi* aşılılarıyla aşılı gruplarına ait serumlar 1/8000 oranında sulandırılarak kullanıldı.

Konjugat

Eşekte hazırlanan horseradishperoksidaz ile işaretli anti-at IgG (**Sigma-H9015**, USA) konjugat 1/250 oranında kullanıldı.

Substrat

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

2.1.11. Protein Konsantrasyonu

dvapA ve rVapA proteinlerinin konsantrasyonu amacıyla ultra filtrasyon yöntemine dayalı sistem (Sartorius Stedim, Slice 200) kullanıldı ve besiyeri üst kısmında bulunan VapA proteinlerinin konsantrasyonunda sırasıyla 100 kd (Hydrosart, 00637123, Sartorius Stedim Slice200) ve 10 kDa (Polyethersulfone,10022213,Sartorius Stedim Slice200) çapında polietersülfon membran filtrasyon sistem kullanıldı.

2.1.12. Adjuvant

IMS 3012 (Seppic, Fransa) ve PetGel A (Seppic, Fransa) adjuvantları kullanıldı (Çizelge 2.1.2).

Etik kurul onayı

Sunulan bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü (Proje No: 18202003) tarafından desteklenmiştir. Araştırma projesi Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi 28.12.2018 tarihli 2018-44 karar sayılı karar ile Etik Kurul onayı alındı.

2.1.13. Kullanılan Serolojik Testler

Enzyme Linked Immun Assay (ELISA)

Farelerden Alınan Kan ile Yapılan ELISA

ELISA testinde kullanılacak pleytlerin kaplanmasında dVapA, rVapA antijenleri kullanıldı.

Antijen kaplama tamponu

Karbonat-bikarbonat tamponu,	pH: 9,6
0,2 M NaCO ₃	16 ml
0,2 M NaHCO ₃	34 ml

PBS (Fosfat Buffer Saline)

NaCl	8,5 gr
K ₂ HPO ₄	1,121 gr
KH ₂ PO ₄	0,34 gr
Distile su	1000 ml

Yıkama solüsyonu (%0,05 PBS-T w/v)

Tween 20	0,5 ml
PBS	1000 ml

Serum Örnekleri

Negatif Serum

Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezinden elde edilen enfeksiyon geçirmemiş annelerden doğan infantil farelerden alınan kan serumu kullanıldı.

Pozitif serum

ELISA ile en yüksek titre verdiği belirlenen *R. equi* aşılılarıyla aşılı gruplarına farelere ait serumlar kullanıldı.

Konjugat

Tavşanda hazırlanan anti fare Ig G (Sigma-A9044, USA) konjugat 1/40.000 oranında kullanıldı.

Substrat

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

Enzim stop solüsyonu (0.5 M H₂SO₄)

H ₂ SO ₄	4,9 ml
Distile su ile	50 ml

Bloklama solüsyonu (%1 BSA w/v)

BSA (Sigma A21153)	1 gr
PBS	100 ml

Kısraklardan Alınan Kan ile Yapılan ELISA

Kaplama antijeni

ELISA testinde kullanılacak pleytlerin kaplanmasında dVapA, rVapA antijenleri kullanıldı.

Antijen kaplama tamponu

Karbonat-bikarbonat tamponu,	pH: 9,6
0,2 M NaCO ₃	16 ml
0,2 M NaHCO ₃	34 ml

PBS (Fosfat Buffer Saline)

NaCl	8,5 gr
K ₂ HPO ₄	1,121 gr
KH ₂ PO ₄	0,34 gr
Distile su	1000 ml

Yıkama solüsyonu (%0,05 PBS-T w/v)

Tween 20	0,5 ml
PBS	1000 ml

Serum Örnekleri

TUBİTAK–KAMAG-108G030 nolu “Taylardaki *Rhodococcus equi* Enfeksiyonu için Aşı, Hiperimmün Plazma ve Bağışıklık Ölçüm Kiti Geliştirilmesi” isimli proje kapsamında; Bakteri+VapA+Montanid IMS 3012 aşılanan kısıraklardan alınan serum örnekleri kullanılmıştır. Gebeliklerinin 7., 8. ve 9. ayında Bakterin+VapA+IMS 3012 aşısı ile aşılanan kısırakların 1., 2. ve 3. aşılama sonrası ve doğumda serum örnekleri kullanıldı.

Pozitif serum

ELISA ile en yüksek titre verdiği belirlenen *R. equi* aşılarıyla aşıli gruplarına ait serumlar kullanıldı.

Negatif Serum

Enfeksiyon geçirmemiş annelerden doğan infantil taylorların kan serumu kullanıldı.

Konjugat

Eştekte hazırlanan horseradishperoksidaz ile işaretili anti-at IgG (**Sigma-H9015**, USA) konjugat 1/2000 oranında kullanıldı.

Enzim stop solüsyonu (0.5 M H₂SO₄)

H ₂ SO ₄	4,9 ml
Distile su ile	50 ml

Bloklama solüsyonu (%1 BSA w/v)

BSA (Sigma A21153)	1 gr
PBS	100 ml

2.2. Yöntem

2.2.1. *R. equi* Suş Seçimi

SÜVF Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bakteri koleksiyonundan enfeksiyona neden olan ve sahadan izole edilen 18 izolat arasından en etkili VapA sentezleyen suş seçildi. İzolatlar %5 koyun kanı içeren kanlı agara (Merck, 113414) ekilerek %10 CO₂'li etüvde 37°C'de 48 saat inkübe edildi (Prescott 1991). Çalışmadan güvenilir sonuç alabilmek için izolatların 16S rRNA'sının PZR ile doğrulaması yapıldıktan sonra VapA sentezleme gücünü gözlemleyebilmek amacıyla CAMP testi yapıldı.

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

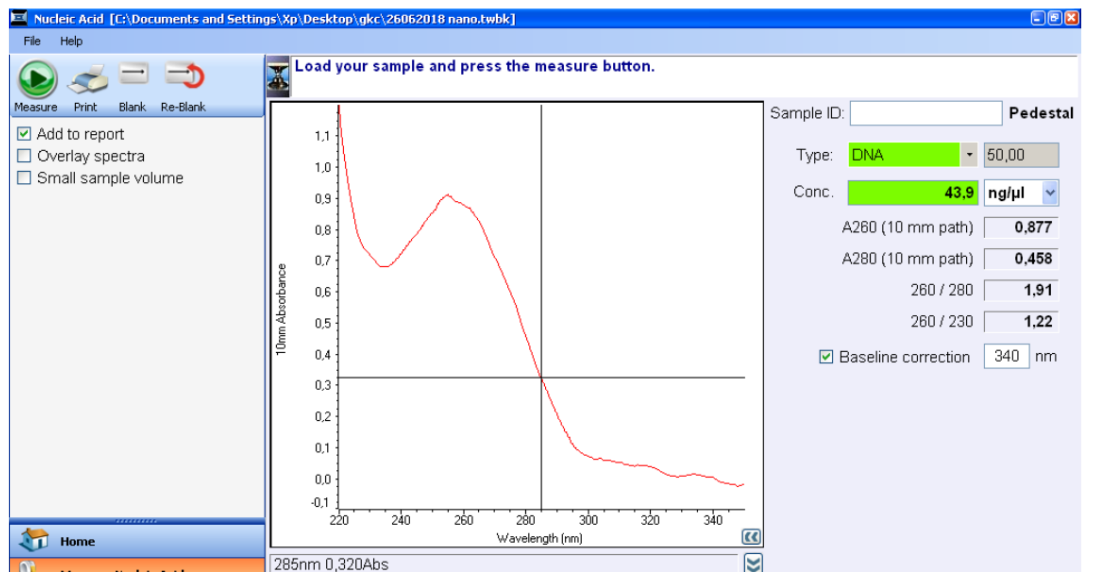
***R. equi*'nin genomik DNA izolasyonu**

R. equi'nin DNA'nın saflaştırılması amacıyla ticari kit (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega) kullanıldı. Steril mikrosantrifüj tüpüne eklenen Brain Heart sıvı besiyerine (BHI) tek koloni ekimi yapıldı. Besiyerinin 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası 13.000 g×2 dk santrifüj edilerek üstte kalan sıvı faz uzaklaştırıldı. Gram pozitif bakteri lizisi amacıyla pelete, 500 µl 50 mM EDTA, 50

μ l lizozim (10 mg/ml, TE tamponu içinde) eklenerek, 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi ve 13.000 g $\times$ 2 dk santrifüj edilerek üstte kalan sıvı faz uzaklaştırıldı. Nüklei lizis solüsyonundan 600 μ l eklendikten sonra 80°C’de 5 dk bekletildi. Daha sonra 200 μ l protein presipitasyon solüsyonu eklenerek buzda 5 dk tutulduktan sonra 13.000 g $\times$ 3 dk santrifüj edildi. Üstteki sıvı faz temiz bir eppendorfa aktarıldı. Üzerine 600 μ l isopropanol ilave eklenip yavaş şekilde alt üst edildi ve DNA’nın görünür hale gelmesi beklenip 13.000 g $\times$ 2 dk santrifüj edilerek sıvı faz uzaklaştırıldı. Pelete 600 μ l %70 etanol ilave edilerek alt üst edildi ve 16.000 g $\times$ 2 dk santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. Tüp, kurutma kağıdı üzerinde oda ısında bekletildi. Son olarak 100 μ l DNA rehidratasyon solüsyonu DNA üzerine eklendikten sonra +4 °C’de 1 gece bekletildi. DNA, PZR analizinde kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

DNA’ların absorbans tayini

DNA ekstraktlarının saflık ve miktar tayinlerini belirlemek amacıyla 260 nm ve 280 nm dalga boylarında optik dansiteleri (OD) spektrofotometre (Nanodrop2000, Thermo Scientific) kullanılarak saptandı. DNA rehidratasyon solüsyonu boş olarak kullanılarak, 260 nm (OD260) ve 280 nm (OD280) dalga boylarında 1 μ l örneğin ölçümleri yapıldı. Konsantrasyonları ng/ml cinsinden elde edildi. OD260 ve OD280 değerlerine göre birbiri ile oranlanarak 1,8-2,0 ye yakın değerler arasında bulunan kaliteli örnekler PZR’da kullanıldı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Elde edilen DNA ekstraktlarının spektrofotometre ile ölçümü (Nanodrop2000, Thermo Scientific)

***R. equi* 16S rRNA doğrulanması**

R. equi 16S rRNA doğrulanması amacıyla REQUİ-F ve REQUİ-R primerleri kullanıldı (Javed ve ark 2017).

Amplifikasyon 25 µl PZR tamponu içerisinde gerçekleştirildi. PZR tamponu; 2,5 µl PZR tampon (KCl'li), 3.50 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP set, her bir primer 1.0 µM, 1.0 U DNA polimeraz (5U/ µl), 14,9 µl steril ultra saf su ve 2,5 µl DNA (100 ng/ µl) içerdi. Hedef DNA, PZR-*termal cycler* cihazında (Ependorf, Matercyler *gradient* 5331 000.010, Germany) 94°C'de 5 dk ön denatürasyon, 35 siklus (94°C'de 30 saniye denatürasyon, 52°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama) ve 72°C'de 10 dk son zincir uzamasıyla çoğaltıldı. Görüntülemek amacıyla 5 µg/ml etidyum bromid içeren %1,5 agaroz jel hazırlandı ve örnekler 6x yükleme boyası ile yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutuldu. DNA bant büyüklüklerinin belirlenmesinde 100 bp DNA ladder kullanıldı (Javed ve ark 2017).

CAMP Testi

CAMP testi için *S. aureus* ve *C. pseudotuberculosis* suşları kanlı agarın orta hattına çekildi ve *R. equi* suşlarının ekimi yapılarak 37°C'de 48 saat %10 CO₂'li etüvde inkübe edildi. İzolatların hemoliz gücü gözlemlenerek en etkili VapA sentezleyen suş seçildi.

2.2.2. *R. equi* VapA geninin PZR ile amplifikasyonu

Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid DNA izolasyonu için Thermo Scientific GeneJET Plazmid Miniprep Kit (USA) kullanılarak 5 ml bakteri kültürü 1,5 ml'lik steril tüplere aktarıldıktan sonra 12000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Pelet üzerine 250 µl sulandırma solüsyonu eklenip pipete edildikten sonra 250 µl lizis solüsyonu eklenerek tüpler alt üst edildi. Karışıma 350 µl nötralizasyon solüsyon eklenerek çökelti oluşumu gözlemlenince 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı faz kolona alınarak 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolona 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon temiz bir tüpe aktararak 50 µl sulandırma solüsyonu eklendi. 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve tüpün dip kısmında bulunan plazmid DNA -20°C'de saklandı.

***R. equi* VapA primer dizaynı**

R. equi ORF kısmının amplifiye edilmesi amacıyla kullanılacak VAPA-R ve VAPA-F primerleri NCBI Gen Bankası'ndaki *R. equi* ve *R. equi* VapA geninin tüm genom dizileri kullanılarak Primer 3 Plus ve NCBI Primer BLAST programları aracılığı ile tasarlandı.

Bu primer çifti toplam 18 adet *R. equi* suşunda VapA geninin doğrulanmasında ve CAMP testi sonucuna göre en kuvvetli VapA sentezleyen 185 nolu suşunun ORF bölgesinin çoğaltılmasında kullanıldı. Amplifikasyon 25 µl PZR tamponu içerisinde gerçekleştirildi. PZR tamponu; 2,5 µl PZR tampon (KCl'li), 3.50 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP set, her bir primer 1.0 µM, 1.0 U DNA polimeraz (5U/µl), 14,9 µl steril ultra saf su ve 2,5 µl DNA (100 ng/ µl) içerdi. Hedef DNA, PZR-*thermal cycler* cihazında (Biorad, T100™ Thermal Cycler, Germany) 94°C'de 2 dk ön denatürasyon, 40 siklus (94°C'de 90 saniye denatürasyon, 57°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 2 dakika) ve 72°C'de 10 dk son zincir uzamasıyla çoğaltıldı. Görüntülemek amacıyla 5 µg/ml etidyum bromid içeren %1,5 agaroz jel hazırlandı, örnekler 6X yükleme boyası ile yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutuldu. DNA bant büyüklüklerinin belirlenmesinde 100 bp DNA ladder kullanıldı.

2.2.3. PZR Ürününün Agaroz Jelden Arındırılması

VapA genininin ORF bölgesine ait 543 bp büyüklüğündeki DNA bandı, Ultra Viole yardımıyla görüntülerek temiz bistüri ile kesildi ve kesilen agarozun ağırlığı tartıldı. GenElute™ Jel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, NA1111) kitin protokolüne uygun şekilde 1:3 oranında 200 mg jel bulunan tüpe jel eritici tampondan 600 µl eklenerek 60°C'de termal blokta jel çözünene dek (VWR, DH, USA) bekletilerek vortekslendi. Pürifikasyon kolonu içerisine aktarıldıktan sonra üzerine 100 µl %100'lük isopropanol alkol ilave edilerek 14.000 g×1 dk santrifüj edildi ve üzerine 700 µl yıkama solüsyonu kolona ilave edilerek 14.000 g×1 dk santrifüj yapıldı. Kolon yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra 50 µl DNA çözündürme solüsyonu ilave edilerek 16.000 g×1 dk santrifüj edildi. Elde edilen DNA -20°C'de saklandı.

2.2.4. Vektöre Ligasyon Protokolü

PetSUMO vektöre (Invitrogen, ABD) PZR ürünlerinin klonlanması için; 1 µl 10X Ligasyon solüsyonundan, 2 µl vektörden, 2 µl saflaştırılan PZR ürününden ve 1 µl T4 DNA ligazdan, 4 µl steril ultra saf sudan alınarak +15°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon için DNase-RNase free 0.5 ml’lik tüpler kullanıldı. Ligasyonun doğru gerçekleştiğini belirlemek amacıyla kontrol klonlama DNA’sı kullanıldı.

2.2.5. Transformasyon Protokolü

One Shot®Mach1™-T1R (Invitrogen) kompetan bakteri, aktarım öncesinde buz üzerinde 15 dakika çözünmesi için bekletildi. Kırık buzda 5 dakika bekletilen 90 ng DNA içeren 5 µl ligasyon ürünü kompetan bakterinin içerisinde bulunduğu mikrosantrifüj tüpe eklendi ve 25 dakika buzda inkübasyona bırakıldı. Hücreler önceden ayarlanmış su banyosunda 42°C’de 90 saniye ısı şokuna maruz bırakıldıktan sonra hızlı şekilde tekrar buz üzerine alınarak 5 dakika bekletildi ve 37°C’de bekletilmiş olan 250 µl S.O.C. besiyerinden eklenerek 37°C’de 200 rpm’de 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Karışım 2 adet 50 µg/ml kanamisin içeren ve kontrol amacıyla antibiyotik içermeyen LB katı besiyerine 100 µl eklenerek 37°C’de bir gece inkübe edildi (Ek 2.4).

2.2.6. Rekombinant Plazmid Taşıyan Koloni Seçimi

Kanamisin içeren LB agar üzerinde gözlenen koloniler numaralandırılarak 50 µg/ml kanamisin içeren LB sıvı besiyerine ekimi yapıldı ve koloniler 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

2.2.7. Rekombinant Kolonilerden Plazmid İzolasyonu

Plazmid DNA izolasyonu için Thermo Scientific GeneJET Plazmid Miniprep Kit (USA) kullanılarak 5 ml bakteri kültürü 1,5 ml’lik steril tüplere aktarıldıktan sonra 12000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. Pelet üzerine 250 µl sulandırma solüsyonu eklenip pipete edildikten sonra 250 µl lizis solüsyonu eklenerek tüpler alt üst edildi. Karışıma 350 µl nötralizasyon solüsyon eklenerek çökelti oluşumu gözlemlenince 12000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı faz kolona alınarak 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Kolona 500 µl yıkama solüsyonu

eklenerek 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon temiz bir tüpe aktararak 50 µl sulandırma solüsyonu eklendi. 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi ve tüpün dip kısmında bulunan plazmid DNA -20°C’de saklandı.

2.2.8. İzole Edilen Plazmidin Doğrulanması

PZR ile Doğrulama

Vektör Primeri ile Doğrulama

VapA genine ait ORF kısmının plazmide klonlamasının doğrulanması için ticari kit (PetSUMO- Invitrogen) içerisinde bulunan SUMO forward ve T7 reverse primerleri kontrol primeri olarak kullanıldı. Kit protokolüne uygun şekilde 5 µl PZR tampon (KCl’lü), 0,5 mM dNTP set 0,5 µl, her bir primer 1,0 µM, 1 µl Taq polimeraz, 35 µl steril ultra saf su ve 5 µl DNA (100 ng/ µl) içerdi.

Amplifikasyon kit protokolüne uygun şekilde PZR-*termal cycler* cihazında (Biorad, T100TM Thermal Cycler, Germany) 94°C’de 2 dk ön denatürasyon, 25 siklus (94°C’de 1 dakika denatürasyon, 55°C’de 1 dakika saniye bağlanma, 72°C’de 1 dakika) ve 72°C’de 7 dk son zincir uzamasıyla çoğaltıldı. Görüntülemek amacıyla 5 µg/ml etidyum bromid içeren %1,5 agaroz jel hazırlandı, örnekler 6x yükleme boyası ile yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutularak DNA bandının büyüklüğünün belirlenmesinde 100 bp DNA ladder (GeneRuler, Thermo, USA) kullanıldı.

ORF amplifikasyonu primeri ile doğrulama

Klonlamanın doğrulanması amacıyla VAPA-R ve VAPA-F primerleri kullanıldı. Amplifikasyon 25 µl PZR tamponu içerisinde gerçekleştirildi. PZR tamponu; 2,5 µl PZR tampon (KCl’lü), 3,50 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP set, her bir primer 1,0 µM, 1,0 U of DNA polimeraz (5U/ µl), 14,9 µl steril ultra saf su ve 2,5 µl DNA (100 ng/ µl) içerdi. Hedef DNA, PZR-*termal cycler* cihazında (Ependorf, Matercycler gradient 5331 000.010, Germany) 94°C’de 2 dk ön denatürasyon, 40 siklus (94°C’de 90 saniye denatürasyon, 64°C’de 1 dakika saniye bağlanma, 72°C’de 1 dakika) ve 72°C’de 5 dk son zincir uzamasıyla çoğaltıldı. Görüntülemek amacıyla 5 µg/ml etidyum bromid içeren %1,5 agaroz jel hazırlandı, örnekler 6x yükleme boyası ile yüklenerek 55 dakika ve 100V’de elektroforez işlemine tabi tutuldu ve UV

lambası altında görüntülendi. Elde edilen PZR ürününün büyüklüğünün belirlenmesinde 100 bp DNA ladder (GeneRuler, Thermo, USA) kullanıldı.

Dizi analizi ile doğrulanması ve verilerin bioinformatik yöntemler ile analizi

Elde edilen plazmidte klonlamanın doğrulanması amacıyla dizi analizi hizmet alımı ile İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne yaptırıldı.

Dizileme işlemi sonucu çıkan sonuçlar Tracy 0.9 Beta programı ile baz dizilimi şekline dönüştürüldü. NCBI gen bankası KT443895 erişim nolu *R. equi* VapA verileri ile karşılaştırıldı.

Baz dizilimi karşılaştırması EMBL-EBI Clustal W2 Çoklu Sekans hizalama ve LALIGN EMBL EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) ile kullanılarak yapıldı. . Dizi analizi ile çıkan baz diziliminin aminoasit şekline dönüştürülmesi işlemi sonucu erişim numarası olan KT443895 *R. equi*'nin sentezlediği VapA protein dizilimi ile karşılaştırmak için, VapA protein dizilimi ExPasy Translate Tool programı (<http://web.expasy.org/translate/>) kullanılarak belirlendi. Protein dizilimi karşılaştırması LALIGN (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) ile yapıldı.

2.2.9. Rekombinant Protein Ekspresyonu İçin Besiyeri Denemesi

rVapA proteinin sentezlenmesi amacıyla -80°C'de bekletilen One Shot®BL21(DE3) (Invitrogen) hücrelerinin buz üzerinde 15 dakika çözünmesi için beklendi. Kompetan hücre içerisine kırık buzda 5 dakika bekletilen 90 ng DNA içeren 5 µl ligasyon ürünü eklendi. Ürün karışımı 25 dakika buzda inkubasyona bırakıldı. Hücreler önceden ayarlanmış su banyosunda 42°C'de 90 saniye ısı şokuna maruz bırakıldıktan sonra hızlı şekilde tekrar buz üzerine alınarak 5 dakika bekletildi. Kompetan bakterinin üzerine 37°C'de bekletilerek ısıtılan 250 µl S.O.C. besiyerinden eklenerek 37°C'de 200 rpm'de 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Karışım 2 adet 50 µg/ml kanamisin içeren ve kontrol amacıyla antibiyotik içermeyen LB agar besiyerlerine 100 µl eklenerek 37°C'de bir gece inkübe edildi.

Kanamisin içeren LB agar besiyerinde üreyen kültürden tek bir koloni alınarak 50 µg/ml kanamisin antibiyotik içeren 2 ml LB sıvı besiyeri içine inokule

edildi ve 37° C'de bir gece inkübe edildi. İnoküle edilen kültürün 0.1 ml' si LB, TY, TB 2YT, SB besiyerlerinin her birinin 2 ml'sini inoküle etmek için kullanıldı. Kültürler, 37° C'de 250 rpm'de çalkalanarak OD 0.6'ya (yaklaşık 2 saat) ulaşana kadar inkübe edildi. Rekombinant proteinin ekspresyonu, final konsantrasyonu 0,1 mM olacak şekilde Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ile indüklendi (Galloway ve ark 2003) IPTG ilavesi sonrası benmaride 37° C'de 250 rpm'de çalkalanarak 60dk, 90dk, 180 dk, 240 dk olmak üzere 4 farklı zamanla inkubasyona devam edildi (Sakmanoglu ve Erganis 2014). Yüksek miktarda çözünür rVapA proteinin elde edildiği besiyeri bileşeni ve uygun indükleme süresi belirlendi. Çalışmanın sonraki safhalarında hedef besiyeri ve uyarım süresi ile devam edildi.

2.2.10. rVapA Proteinin Ekspresyonu

Yüksek miktarda çözünür rVapA proteinin TY sıvı besiyerinde elde edilmesi nedeniyle aşı içeriğinde kullanılmak üzere protein üretiminde TY besiyeri kullanıldı. Bu sebeple, kanamisin içeren LB agar besiyerinde üreyen kolonilerden tek koloni seçilerek LB sıvı besiyerine ekilerek 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Alınan 10 ml kültür 50 μ l/ml kanamisin içeren 100 ml TY besiyerine eklenerek OD 0,6 ulaşınca kadar 37°C' de ve 250 rpm de inkube edildi. Son konsantrasyonu 0,1 mM olacak şekilde IPTG eklendi ve 37° C ve 250 rpm de 3 saat daha inkube edildi (Broedel ve ark 2001).

2.2.11. Çözünmeyen/Çözünebilir Protein Düzeyinin Belirlenmesi

Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Protein ekstraktlarını ayırmak amacıyla Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) jelleri hazırlandı. İlk olarak %12 ayırma jeli sonrasında %5 yürütme jeli hazırlandı. Ayırma jeli cam plakalar arasına dökülerek 0,3 ml n-butanol yüzeyi pürüzsüzleştirmek için eklendi. Yürütme jeli plakalar arasına döküldükten sonra tarak takılarak polimerizasyonun tamamlanması beklendi. Jel elektrofrez tankına (Thermo Scientific, EC120 Mini Vertikal Jel Sistem) yerleştirilerek 1X Tris- Glisin yürütme tamponu eklendi (Ek 2.3). Örnekler 4xSDS yükleme boyası ile 1:4 oranında toplam 25 μ g/ml olacak şekilde 25 μ l olmak üzere jele yüklendi. Yürütme jeli için 80 volt 30 dakika, ayırma jeli için 100 voltta yaklaşık 90 dakika akım uygulandı (Laemmli 1970).

Coomassie Brilliant Mavisi ile Boyanması

Elektroforez (SDS-PAGE) bitiminde cam plakalar açılarak jel alındı. Oda sıcaklığında 250 ml Coomassie Brilliant Mavisi ile 2 saat boyamaya bırakıldı. Jel daha sonra 2 saat boya giderme çözeltisi içerisinde boyadan arındırıldıktan sonra 2 saat fiksatif solüsyonda bekletilerek bantlar görünür hale getirildi. Görüntüleme cihazı ile bantlar görüntülendi (Temizkan ve Arda 2004).

Western Blot

SDS-PAGE işlemi için hazırlanan jellerden birisi elektroforez işlemi sonrasında Coomassie Brilliant Mavisi ile boyandı diğeri ile blotlama işlemine geçildi. Jel ile aynı boyutta 3MM Whatman®kağıtları, 0,2 µm nitroselüloz membran (Bio-Rad, Hercules, CA), 1X transfer tamponu ile ıslatılarak kaset üzerine yerleştirilerek 25 mA'de 30 dakika aktarım işlemi uygulandı (Bio-Rad Mini Trans-Blot® Cell). Membran bloklama amacıyla çalkalayıcı üzerinde 100 ml 1x TBS ile hazırlanmış %5 BSA çözeltisinde 37°C'de 2 saat bekletildi. Bloklama sonrasında %0,5 Tween 20 içeren 1X TBS ile 5 dakika süreyle 3 kez yıkandı. Daha sonra membran VapA ile aşılınmış atlardan alından proteine özgü serumun bulunduğu primer antikor içerisinde oda ısısında 1 saat bekletildi ve daha sonra %0,5 Tween 20 içeren 1X TBS ile 5 dakika süreyle 3 kez yıkandı. Membran yıkama solüsyonu ile 1/5000 oranında seyreltilen horseradish peroksidaz ile işaretli anti-at Ig G (Sigma-H9015, USA) ile oda sıcaklığında 1 saat bekletilerek yıkama solüsyonu ile 3 kez 5 dakika yıkandı. δ- fenildiamin dihidroklorid (Sigma P8287, USA) fosfat sitrat tamponu (Sigma P4922, USA) ile sulandırılarak nitroselüloz membrana aktarıldı. Membran 15 dk oda ısısında bekletildikten sonra beliren bantlar görüntüleme sistemi Carestream (Gel Logic 212 PRO, Bruker, USA) ile görüntülendi.

Ni-NTA Kolon ile Saflaştırılma

Protein saflaştırılması için Ni-NTA Purification System (Qiagen) purifikasyon kiti kullanıldı. rVapA proteini barındıran süpernatant üzerine sulandırma solüsyonu eklendi ve tamamen çözünene kadar vortekslendi. Daha sonra 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Rekombinant proteini içeren sıvı faz kolon hazırlama tamponu ile bekletilen purifikasyon kolonları (Ni-NTA Superflow Columns, Qiagen) kullanılarak saflaştırma işlemi yapıldı. Yıkama solüsyonu

eklenerek 12000 rpm de 1 dk santrifüj edilerek. Kolondan çözündürme tamponu geçirilerek saf olarak elde edildi.

SUMO proteaz enzim ile kesim

pET SUMO vektör sisteminde bulunan nükleer transportta yer alan SUMO (Small Ubiquitin-like modifier) SUMO Proteaz enzimi ile çizelge 2.1.' de belirtilen miktarlar ve solüsyonlara göre hazırlanarak 30°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı.

Çizelge 2.1. SUMO proteaz ile kesim işlemi

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

rVapA ve dVapA protein konsantrasyonu

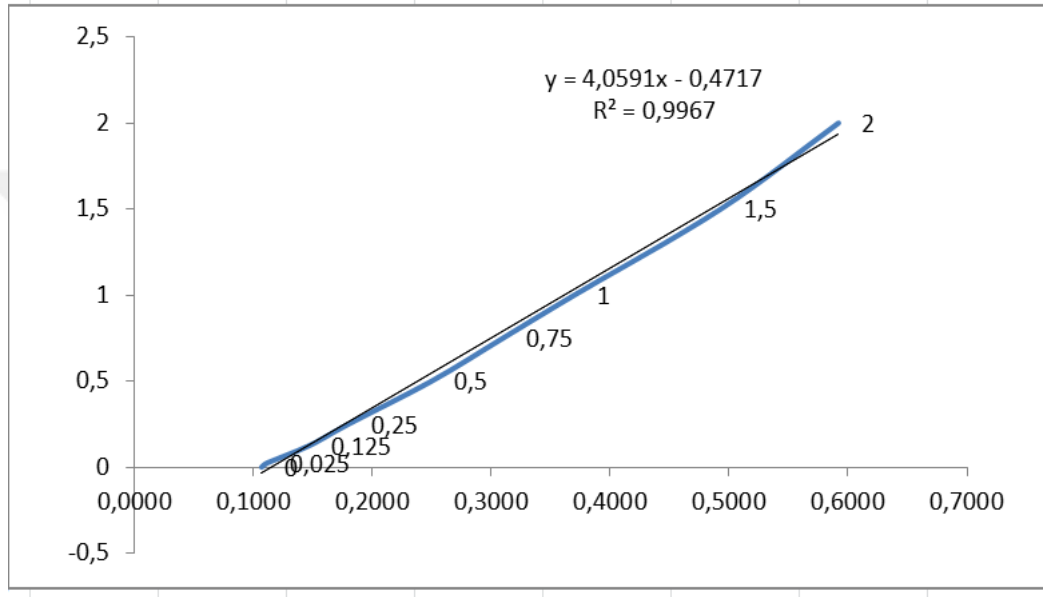
Rekombinant BL21(DE3) *E. coli*'nin TY sıvı besiyerinde ve 185 nolu *R. equi* suşunun %5 at serumu eklenen BHI sıvı besiyerinde inkubasyonu sonrasında besiyerlerinin süpernatantını elde etmek amacıyla kültürler 9000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Sırasıyla 100 kDa (Hydrosart, 00637123, Sartorius Stedim Slice200) ve 10 kDa (Polyethersulfone, 10022213, Sartorius Stedim Slice200) çapında membran kaset sistemleri kullanılarak konsantre edildi (Sakmanoglu ve Erganis 2015) (Ek 2.5).

Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Aşı formülasyonunda, 5 farklı besiyeri denemelerinde elde edilen proteinlerin ve ELISA yönteminde kullanılacak konsantre dVapA ve rVapA protein miktarlarının belirlenmesinde Bradford yöntemi (1976) ile kullanıldı. İlk olarak, 47 ml %96 etanol içinde 100 mg Coomassie Mavisi eritilerek 100 ml %85 fosforik asit ile karıştırılarak

toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Standart eğriyi oluşturmak amacıyla 2, 4, 6, 8 ve 10 µl hacimde 1 mg/ml BSA tüplere eklenerek distile su ile 100 µl'ye tamamlandı. Kontrol için 100 µl saf su ilave edildi. Her tüpe 500 µl bradford çözeltisi ve 10 µl örnekleri eklenerek spektrofotometre (Shimadzu UV-1601) ile 595 nm'de ölçüldü. Standartlar kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturularak eğri denklemleri kullanılarak protein miktarı hesaplandı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Protein ölçümü sonrası Microsoft Office Excel ile hazırlanan standartların OD'in değerlendirilmesi



2.2.12. Aşıların Hazırlanması ve Uygulaması

Ultra filtrasyon sistemi ile konsantre edilen proteinlerin ölçümü yapıldıktan sonra son konsantrasyonu 0.1 mg/ml olacak oranda (Lawrence ve ark 1997, Lopez ve ark 2003) 1:1 oranında likit nanopartikül IMS 3012 ve %10 PetGel A ile adjuvant ile antijen homojen olarak karıştırılarak, rVapA+IMS 3012, dVapA+IMS 3012; rVapA+PetGelA ve dVapA+PetGelA 4 farklı aşı formülasyonu hazırlandı (Lopez ve ark 2003, Cauchard ve ark 2014, Erganiş ve ark 2012). Aşı kombinasyonunun uygun besiyerine ekimi gerçekleştirilerek, anaerobik ve aerobik bakteriler ile mantar yönünden 37°C' de ve 22°C'de 14 gün inkübe edilerek sterilit kontrolleri yapıldı (OIE 2019).

Bu çalışmada aday aşıların etkinliğini belirlemek için her aşı grubunun potens+çelinc denemelerini yapmak için swiss albino ırk ağırlıkları 15-18 gr arasında değişen fareler kullanıldı (Çizelge 2.3). Aşıların seropotens (bağışıklık oluşturma

gücü) ve çelinç (koruma gücü) güçlerini belirlemek için 5 adet aşılama grubu için 6'şarlı gruplardan oluşan 2 alt grup oluşturuldu. Seropotens grupları 0,2 ml (0,1 mg/ml) ile deri altı yolla 21 gün arayla iki kez aşılandı (Ek 2.6). İkinci aşılama sonrası 21. gün antikor seviyesini belirlemek amacıyla anestezi altında kardiyak punksiyon ile 0,1 ml kan alındı. Serumlar kullanılabildiği kadar -20°C'de saklandı.

Çizelge 2.3. Çelinç ve seropotens denemelerinde kullanılan fare sayısı

Aşı Grupları	Fare Adedi	
	Çelinç	Potens
rVapA+IMS 3012	6	6
dVapA+IMS 3012	6	6
rVapA+PetjelA	6	6
dVapA+PetjelA	6	6
Kontrol	6	6

Kullanılan antijenler; dVapA (doğal VapA) ve rVapA (rekombinant VapA), adjuvantlar;IMS3012, PetGel A

Çelinç grupları 0,2 ml, (0,1mg/ml) ile deri altı aşılanarak (Lopez ve ark 2003), 2. aşılama sonrası 10. gün standart aktif çelinç dozunda periton içi (2×10^7 CFU bakteri/ ml) verildi (Kanalı ve ark 1995, Vanniasinkam ve ark 2005, Erganiş ve ark 2012). Çelinç sonrası; 1. hafta, 2. hafta ve 3. haftalarda her gruptan ikişer fare anestezi altında dekapitasyon uygulanarak enjeksiyon yapılan yerde bulunan nekroz ve değişiklikler gözlemlendi. Etkenin geri izolasyonu amacıyla iç organların (akciğer, karaciğer, kalp, dalak, böbrek) alınarak ekimi yapıldı. (Ek 2.7)

2.2.13. Enzim Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Seropotens grubu farelerin ve aşılanan kısırakların serumunda antikor titresinin ölçülmesi için ELISA testi yapıldı (Engvall ve Perlmann 1971). dVapA ve rVapA antijenleri karbonat-bikarbonat tamponu ile sulandırılarak mikropleytin kuyucuklarında, 1 µg, 10 µg, 50 µg, 100 µg, 250 µg, 500 µg, 1000 µg olacak şekilde 100'er µl antijen dağıtıldı ve 37°C'de 1 saat bekletildikten sonra +4 °C'de 1 gece inkübe edildi. Mikropleyt PBS-Tween 20 (PBS-T) yıkama çözeltisi ile üç kez yıkandı (Ek 2.8). Kuyucuklara özgül olmayan bağlanmaları önlemek için PBS

içerisinde %1 bovine serum albumin (BSA) olacak şekilde bloklama solüsyonundan 100'er µl kuyucuklara eklenerek, 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile üç kez yıkandı. Antijen ile kaplanan mikroplyetler kullanılıncaya kadar +4 °C'de bekletildi (Erganiş ve 2014).

Serum örnekleri 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 ve 1:3200 oranlarında PBS-T ile sulandırılarak 100'er µl kuyucuklara eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi ve yıkama çözeltisi ile üç kez yıkandı (Erganiş ve 2014). Anti fare konjugat (Sigma-A9044, USA) 1/ 5000 oranında sulandırılarak kuyucuklara 100'er µl ilave edilerek 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra yıkama çözeltisi ile üç kez yıkandı. Fosfat-sitrat çözeltisi (phosphate-citrate buffer with sodium perborate capsules, Sigma P4922, USA) ile hazırlanan kolorimetrik bir substrat olan δ-fenildiamin dihidroklorid (δ- phenylenediamine dihydrochloride tablet Sigma p8287, USA) tüm çukurda 0,4 mg/ml olacak şekilde ayarlandı ve kuyucuklara hazırlanan substrattan 100 'er µl eklendi. Pleytler karanlık ortamda oda ısısında 30 dk bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için 0.5 M H₂SO₄'den 50'şer µl eklenerek reaksiyon durduruldu ve serumların OD'leri ELISA okuyucuda (BIOTEK EL×800, USA) 450 nm'de analiz edildi (Ek 2.9) (Erganiş ve 2014).

Negatif eşik değerin (cut off) hesaplanması

Negatif eşik değeri; kontrol serumun OD değerlerinin aritmetik ortalaması+ 3 kat standart sapma değeri (NKORT +3 SD) şeklinde hesaplandı.

İstatistik Analiz

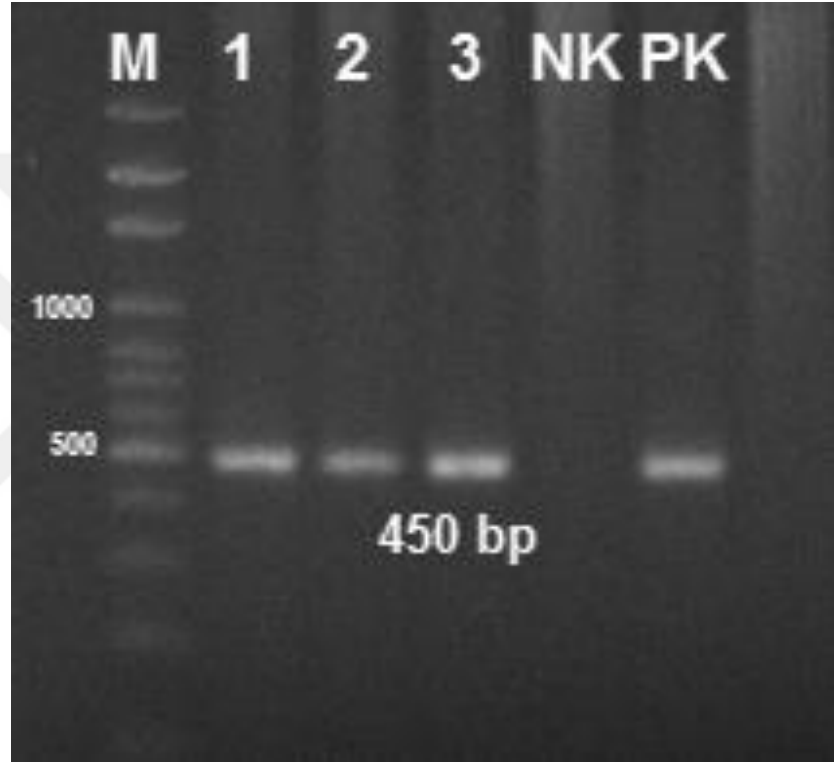
Elde edilen verilerin hesaplanması ve değerlendirilmesinde SPSS IBM20 Paket Program kullanılmıştır. Veriler ortalama ve standart sapma verilerek özetlenmiştir. Kontrol grubu ile aday aşı gruplarının karşılaştırılmasında bağımsız gruplarda T-Testi kullanılmıştır. Aday aşı grupları ve kontrol grubu arasında analizlerde istatistiksel anlamlılığı değerlendirmek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Grupların birbiri ile karşılaştırılmasında Tukey testi kullanıldı. Bu çalışmada hata düzeyi 0,01 olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. *R. equi* ile İlgili Çalışma Sonuçları

3.1.1 *R. equi* İzolatlarının PZR ile Doğrulanması

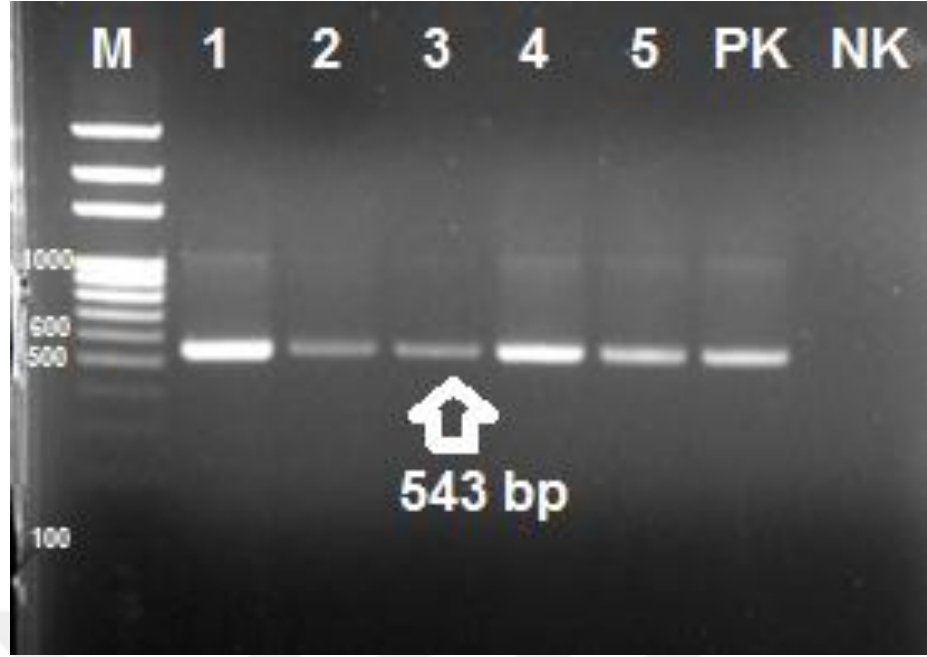
Toplamda 18 adet *R. equi* izolatının 16S rRNA'sına göre tür düzeyinde yapılan PZR sonucunda, tüm izolatlarda agaroz jelde 450 bp büyüklüğünde DNA bandı gözlemlendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. **M:** Marker, **PK:** Pozitif Kontrol, **NK:** Negatif kontrol, **1,- 3:** *R. equi* izolatları

3.1.2. *R. equi*'de VapA Geninin PZR ile Çoğaltılması

CAMP testi sonrasında en kuvvetli VapA sentezleyen suşun SUVF 185 nolu suş olduğu belirlendi. Bu suşun VapA geninin ORF bölgesinin PZR ile amplifiye edilmesi sonrasında agaroz jelde 543 bp büyüklüğünde DNA bandı görüntülendi (Şekil 3.2).

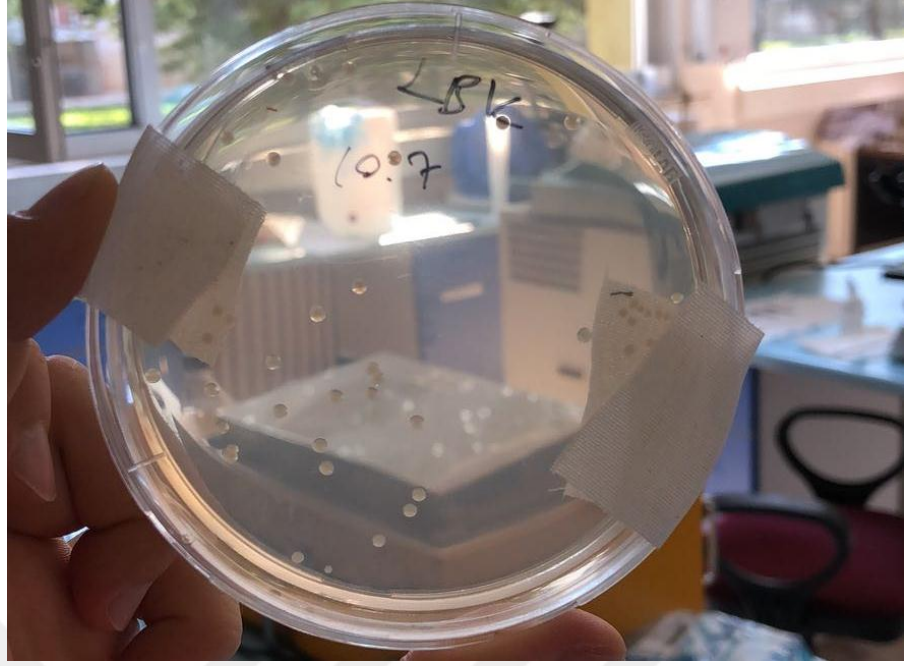


Şekil 3.2. PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. **M:** Marker, **PK:** Pozitif Kontrol, **NK:** Negatif kontrol, **1-5:** *R. equi*'de VapA geninin doğrulanması

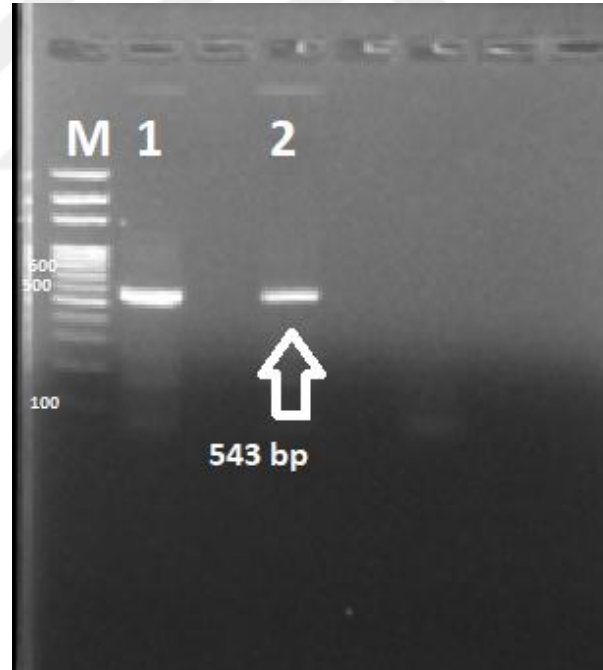
3.2. Klonlama Yapılan Vektörün Doğrulanması

3.2.1. PZR ile Doğrulanması

Transformasyondan sonra LB besiyerinde üreyen toplam 42 adet koloniye doğrulama işlemi yapıldı (Şekil 3.3) ve VAPA-R ve VAPA-F primerlerinin kullanıldığı PZR ile 42 adet koloniden 2'sinde 543 bp büyüklüğünde bant tespit edilerek VapA geninin varlığı doğrulandı (Şekil 3.4).



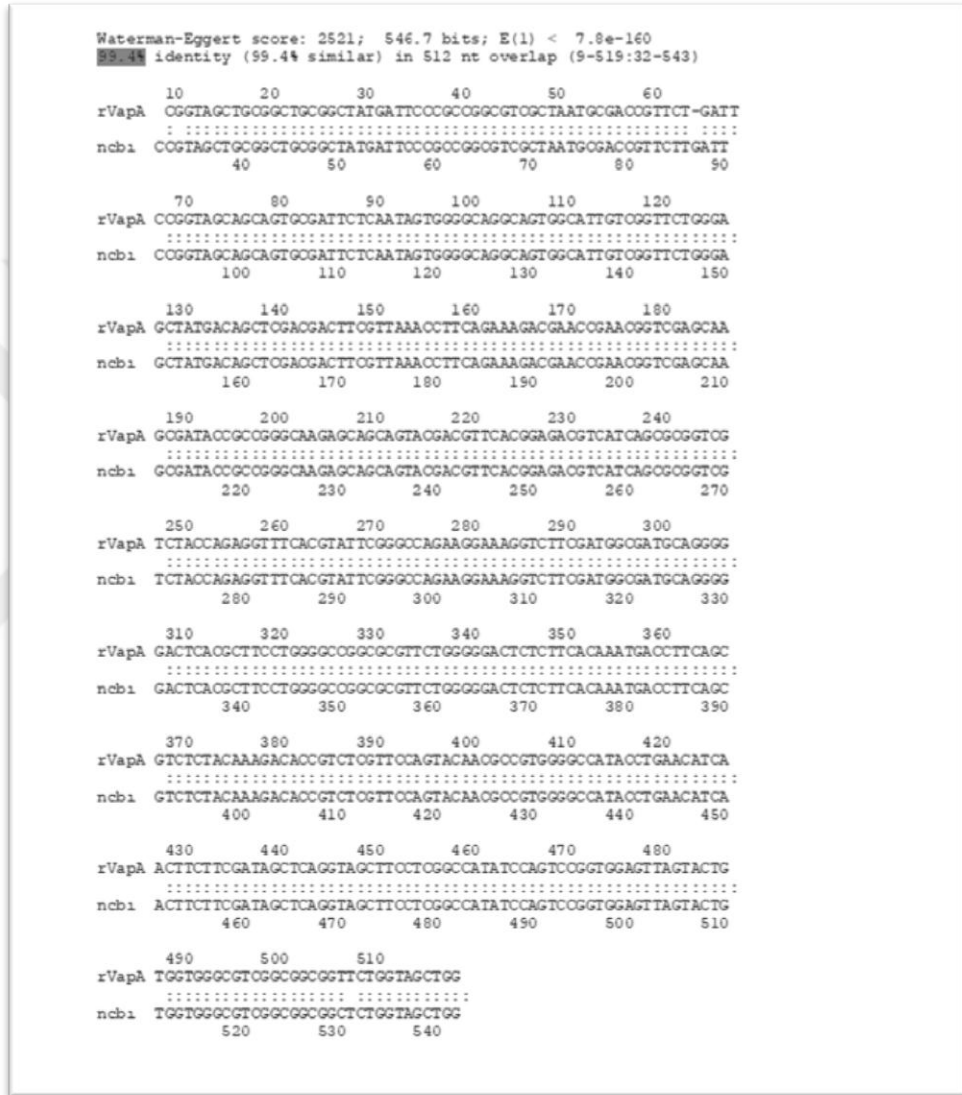
Şekil 3.3. LB besiyerinde üreyen transformasyon yapılan *E.coli* One Shot®BL21(DE3) (Invitrogen) koloni görünümü



Şekil 3.4. pET SUMO vektöre VapA geni ligasyonunun PZR ile doğrulanması. **M:**Marker, **1-2:** VapA Geni (543 bp).

3.2.2. Dizi Analizi ile Doğrulama ve Bioinformatik Yöntemler ile Analizi

NCBI gen bankasındaki *R. equi*'ye ait KT443895 erişim nolu VapA geni ile rVapA geninin klonlamasının sonrasında elde edilen VapA geninin (rVapA) dizi analizi sonuçlarının karşılaştırılması sonucunda iki gen arasında %99.4 benzerlik bulundu. Farklılığın 90. ve 530. bazlarda olduğu belirlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Dizi analiz karşılaştırması, rVapA: Tezde kullanılan rVapA' ya ait dizi, NCBI: Erişim No: KT443895 *R. equi*' ye ait dizi.

NCBI gen bankasındaki erişim no: KT443895 olan *R. equi*'ye ait VapA geni ve pET SUMO vektöre VapA geninin klonlamasının sonrasında elde edilen VapA genine (rVapA) ait amino asit dizilimleri %100 uyumlu bulundu (Şekil 3.6).

```

>>ncb1 (207 aa)
Waterman-Eggert score: 1016; 119.2 bits; E(1) < 4.7e-32
100.0% identity (100.0% similar) in 152 aa overlap (25-176:30-181)

      30      40      50      60      70      80
vapA DSGSSSAILNSGAGSGIVGSGSYDSSTTSLNLQKDEPNGRASDTAGQEQQYDVHGDVISA
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
ncb1 DSGSSSAILNSGAGSGIVGSGSYDSSTTSLNLQKDEPNGRASDTAGQEQQYDVHGDVISA
      30      40      50      60      70      80

      90     100     110     120     130     140
vapA VVYQRFHVFGPEGKVFVDGAGGLTLPAGAGFWGTLFTNDLQRLYKDTVSFQYNAVGPYLN
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
ncb1 VVYQRFHVFGPEGKVFVDGAGGLTLPAGAGFWGTLFTNDLQRLYKDTVSFQYNAVGPYLN
      90     100     110     120     130     140

      150     160     170
vapA INFFDSSGSFLGHIQSGGVSTVVGVGGSWS
      ::::::::::::::::::::::::::::::
ncb1 INFFDSSGSFLGHIQSGGVSTVVGVGGSWS
      150     160     170     180

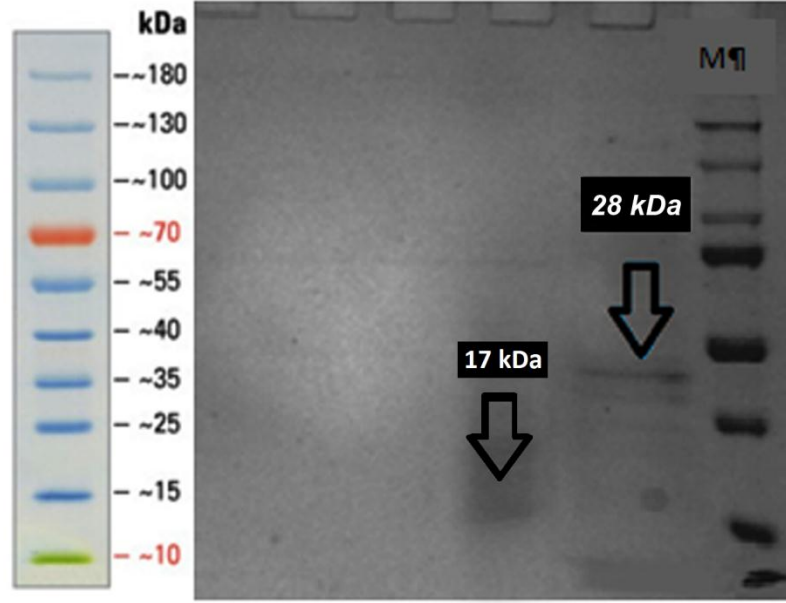
```

Şekil 3.6. Amino asit dizilimlerinin karşılaştırması. vapA: Rekombinant VapA, NCBI: KT443895 *R. equi*' ye ait dizi analizi.

3.3. Çözünmeyen ve Çözünebilir Protein Varlığının Belirlenmesi

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

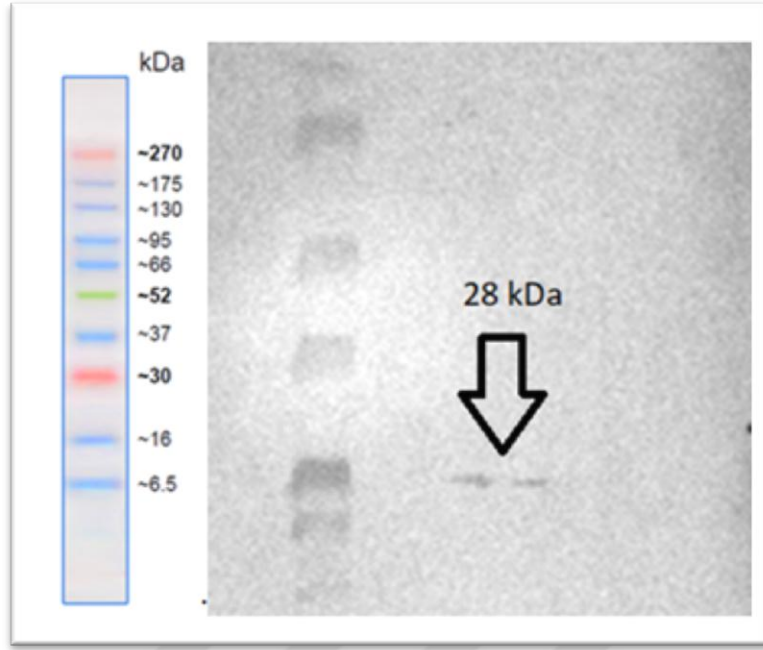
SDS-PAGE ile *E. coli* BL21(DE3) içeren besiyeri süpernatantında çözünebilir rVapA bulunduğu ve yaklaşık 28 kDa ağırlığında olduğu gözlemlendi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. 17 kDa ağırlığında dVapA proteinin SDS-PAGE ile görüntülenmesi, 11 kDa ağırlığında PetSUMO ile 28 kDa ağırlığına ulaşan rVapA'nın SDS-PAGE ile görüntülenmesi **M:** Marker

3.3.2. Western Blot

Western blot analizi sonucunda nitroselüloz membran üzerinde 28 kDa ağırlığında rVapA' ya ait bant gözlendi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. 28 kDa ağırlığında olan rVapA proteinin Western Blot uygulaması ile gösterilmesi, **M:** Marker.

3.4.rVapA Proteinin Elde Edilmesi ve Konsantrasyonu Sonuçları

3.4.1. rVapA Ekspresyonu Amacıyla Besiyeri Denemesi

Farklı besiyerleri ile sürelerin rVapA proteinin miktarı üzerindeki etkileri Çizelge 3.1’de gösterilmektedir. Denemeler sonucunda en verimli besiyerinin TY ve indüksiyon süresinin 4 saat olduğu belirlendi.

Çizelge 3.1. rVapA proteininin miktarı üzerinde farklı besiyeri ve sürelerin etkileri

Süre	90 dk	120dk	180 dk	240 dk
Besiyeri ↓				
LB	0,5 mg/l	0,6 mg/l	2,1 mg/l	4,1 mg/l
TB	0,8 mg/l	1 mg/l	2,7 mg/l	5,2 mg/l
2YT	0,8mg/l	1,4 mg/l	3 mg/l	6,2 mg/l
SB	1 mg/l	2,5 mg/l	4,2 mg/l	8,8 mg/l
TY	0,9 mg/l	2,8 mg/l	5,4 mg/l	9,6 mg/l
BLANK	0,3 mg/l	0,3 mg/l	0,3 mg/l	0,3 mg/l

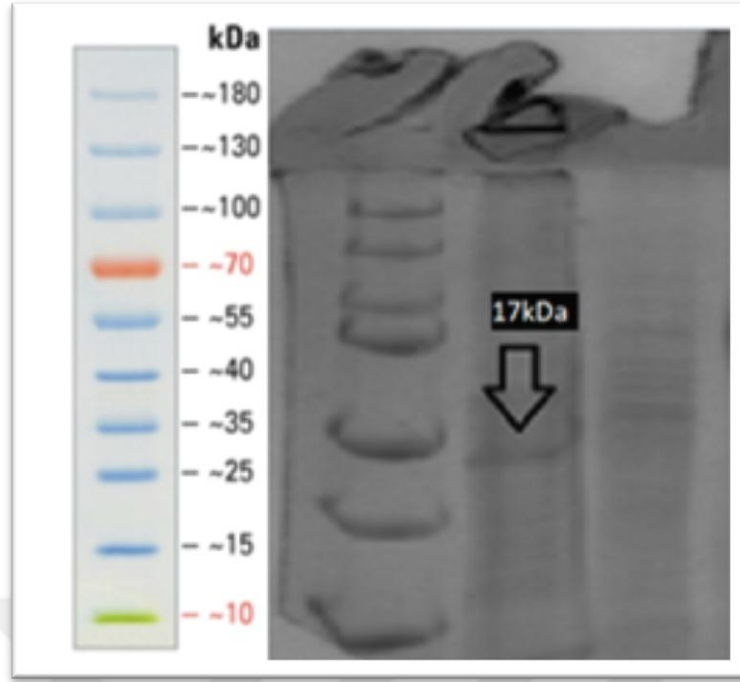
LB; Luria bertani, TB; Terrific Broth, 2YT; 2 Yeast tripton, SB; Super Broth, TB;Trypton yeast

3.4.2. Ni-NTA Kolon ile Protein Saflaştırılması

Saflaştırma sonrası ölçülen rVapA proteinin 40 µg/ml miktarında olduğu belirlendi.

3.4.3. SUMO Proteaz Enzim ile Kesim

Yaklaşık 28 kDa rekombinant VapA proteini SUMO proteaz enzimiyle kesilerek 11 kDa ağırlığında olan SUMO proteininden ayrıldı. Kesim işlemi sonrası doğrulama amacıyla SDS-PAGE yapılarak 17 kDa ağırlığında VapA proteini gözlendi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Saflaştırılan VapA proteinine ait SDS-PAGE görüntüsü

3.5. Protein Konsantrasyonu Ölçümü ve Sterilite Kontrolü

dVapA ve rVapA proteinlerinin konsantrasyonu yapıldıktan sonra protein miktarlarının sırasıyla 52 mg/ml ve 66 mg/ml olduğu belirlendi. Proteinlerin sterilite kontrolleri yapıldıktan sonra antijenlerin miktarları bir doz aşında 0.1 mg/ml olarak ayarlandı (Lopez ve ark 2003). Aday aşılarda kontrolleri sonucunda steril oldukları gözlemlendi.

3.6. Rekombinant VapA Proteininin İmmun Yanıtı

3.6.1. Seropotens Grupları

Seropotens grubu farelerin serum örneklerindeki antikor miktarlarının ölçülmesi için çalışmada standardize edilerek geliştirilen ELISA'nın kaplamada kullanılan antijen miktarının 10 µg/ml, serum sulandırmasının ise 1/ 200 olduğu belirlendi. rVapA antijeni ile kaplanan ELISA için OD 0,18; dVapA jeni ile kaplanan ELISA için OD 0,199 negatif eşik değerleri olarak hesaplandı ve sonuçlar çizelgede verildi (Çizelge 3.2) (Çizelge 3.3).

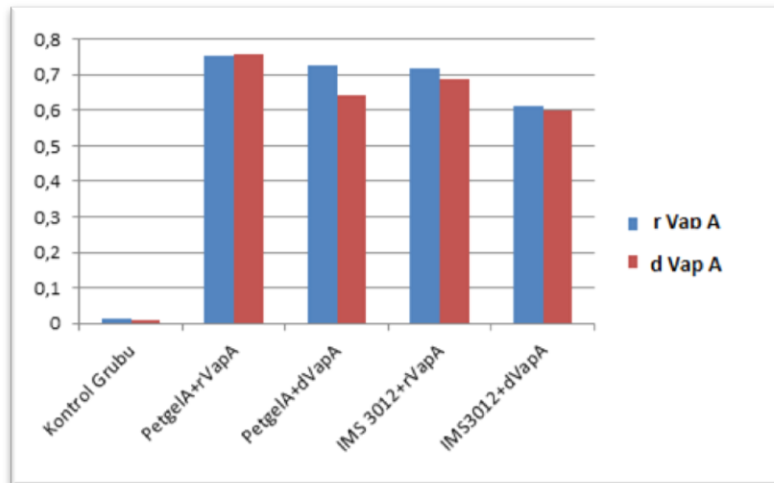
Çizelge 3.2. ELISA sonuçlarına göre fare serumlarındaki antikor varlığının belirlenmesi

Kaplanan Antijen ↓	Grup →	PGA		IMS 3012	
	Kontrol	rVapA	dVapA	rVapA	dVapA
dVapA	0,012	0,756±0,00163	0,727±0,00122	0,719±0,00163	0,612±0,001
rVapA	0,015	0,759±0,00156	0,643±0,00118	0,688±0,00166	0,598±0,001

dvapA, rVapA antijenleri ile çapraz ELISA; Kontrol Grubu (n=6), PetGel A+ rVapA (n=6), PetGel A+ dVapA (n=6), IMS 3012+ rVapA, IMS 3012 + rVapA, ±standart sapma değerleri

T testi analiz sonuçlarına göre, ELISA sonuçlarına göre fare serumlarındaki antikor varlığının belirlenmesinde PetGel A+rVapA, PetGel A+dVapA, IMS 3012+rVapA, IMS3012+dVapA aşı gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p<0,01$). Bu karşılaştırmalarda aşı gruplarının kontrol grubundan anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür. Aşı grupları içerisinde PetGel A+rVapA ortalamaları diğer gruplara göre en yüksek; dVapA+r IMS 3012 ortalamalarının en düşük ortalama olduğu belirlendi (0,756; 0,759; 0,612, 0,598). rVapA ve dVapA ile yapılan çapraz ELISA testleri sonucunda her iki antijen arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı görülmüştür ($P>0,01$).

Çizelge 3.3. ELISA testi sonuçları sütun grafiği



Kontrol Grubu (n=6), PetGel A+ rVapA (n=6), PetGel A+ dVapA (n=6), IMS 3012+ rVapA, IMS 3012 + rVapA

3.6.2. Kısıraklardan Alınan Serum Örnekleri ELISA Sonuçları

Gebeliklerinin 7. 8. ve 9. ayında Bakterin+Vap A+IMS 3012 aşısıyla aşılama ve doğum sonrası alınan serum örnekleriyle yapılan ELISA OD sonuç ortalamaları Çizelge 3.4' te verilmiştir.

Çizelge 3.4. ELISA sonuçlarına göre kısırak serumlarındaki antikor varlığı

Gruplar	1. Aşılama		2.Aşılama		3.Aşılama		Doğum	
Kaplanan Antijen→	dVapA	rVapA	dVapA	rVapA	dVapA	rVapA	dVapA	rVapA
1	0,695	0,785	0,855	0,901	0,966	1,112	1,024	1,112
2	0,772	0,785	1,287	1,223	1,456	1,523	1,298	1,296
3	0,715	0,733	0,898	0,912	0,986	1,202	2,122	2,136
4	1,054	1,075	1,785	1,814	1,896	1,922	2,096	2,123
5	0,896	0,898	0,996	1,112	1,156	1,256	1,454	1,456
6	0,913	0,916	1,236	1,238	1,544	1,656	1,926	1,955
7	0,968	0,966	0,968	0,978	1,757	1,823	1,988	2,021
8	0,668	0,668	0,872	0,886	1,298	1,312	1,723	1,726
9	0,622	0,674	0,894	0,896	1,126	1,155	1,612	1,744
10	1,114	1,282	1,244	1,258	1,912	1,978	1,966	2,23
11	0,856	0,897	0,976	0,998	1,756	1,75	1,987	1,981
12	0,892	0,843	0,988	1,012	1,124	1,156	1,256	1,312
13	0,866	0,872	0,974	1,006	1,578	1,586	1,896	1,902
14	0,756	0,755	1,273	1,324	1,713	1,726	1,856	1,869
15	0,622	0,623	0,933	0,946	1,89	1,902	1,912	1,926
16	0,956	0,923	1,342	1,354	1,356	1,369	1,389	1,512
Ort	0,835	0,856	1,08325	1,10233	1,47	1,527	1,719	1,769

dvapA, rVapA antijenleri ile çapraz ELISA; 1. Aşılama (n=16); IMS 3012+ dVapA gebeliğin 7. Ayı, 2. Aşılama (n=16); IMS 3012+ dVapA gebeliğin 8. Ayı, 3. Aşılama (n=16); IMS 3012+ dVapA gebeliğin 8. Ayı, Doğum (n=16); Kısıraklardan doğum sonrası alınan serum örnekleri, Ort; Ortalama OD değerleri, negatif kontrol ort; dVapA 0,21; rVapA 0,18

T testi analiz sonucuna göre; 1. Aşılama, 2. Aşılama, 3. Aşılama ve doğum sonrası grubu serum örneklerinde ELISA sonuçlarına göre dVapA ve rVapA antijenleri ile kaplanması arasında istatistiksel bir farklılık belirlenmemiştir ($p>0,01$). Negatif kontrol ortalamasına göre tüm aşı grublarında fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$).

3.6.3. Çelınç Grupları

Çelınç grubu farelerinin iç organlarının mikrobiyolojik ekimlerinde; IMS 3012 ile kombine edilen dVapA aşısı grubunda 3 adet farenin enjeksiyon yerinde nekroz ve 2 adet farenin karaciğerinden, 1 adet farenin akciğerinden, rVapA aşısı grubunda 1 adet farenin enjeksiyon yerinde nekroz ve 1 adet farenin böbreğinden, 1 adet farenin dalağından; PetGel A ile kombine edilen dVapA aşısı grubundan, 1 adet farenin akciğerinden, 2 adet farenin karaciğerinden ve rVapA aşısı grubundan 1 adet farenin karaciğerinden geri izolasyon yapılırken aşılama sonrası gruplarıdaki diğer farelerde organlarda değişim ve nekroz gözlenmedi (Şekil 3.9). Her iki adjuvant ile aşılama sonrası hiçbir grupta enjeksiyon yerinde yara ve iltihap gözlenmedi. Aşısı kontrol grubunda ise 5 adet farede hastalık ve ölüm belirlendi (Çizelge 3.4) (Çizelge 3.5) (Şekil 3.10).

Çizelge 3.5. Çelınç Yapılan Aşılı Farelerde İç Organların Mikrobiyolojik Sonuçları

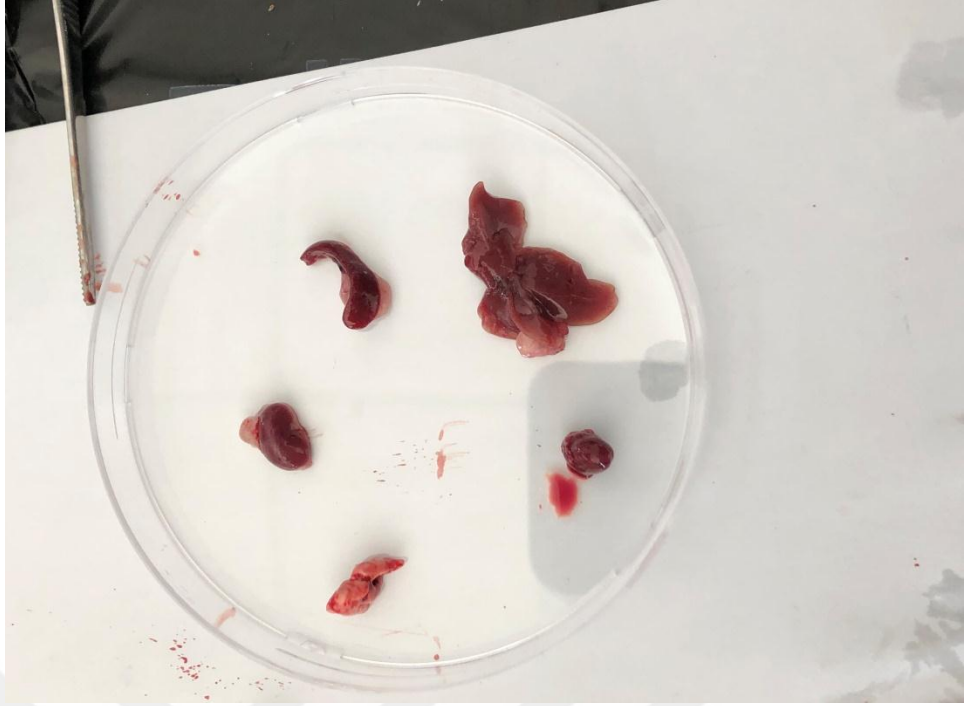
		IMS 3012		PetGelA	
İç Organlar	Kontrol	dVapA+IMS	rVapA+IMS	rVapA+PGA	dVapA+PGA
Kalp	2/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Akciğer	5/6	1/6	0/6	0/6	0/6
Dalak	4/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Böbrek	4/6	0/6	1/6	0/6	1/6
Karaciğer	5/6	2/6	1/6	1/6	2/6
Toplam	20/30	3/30	2/30	1/30	3/30

Kontrol Grubu (n=6), PetGel A+ rVapA (n=6), PetGel A+ dVapA (n=6), IMS 3012+ rVapA, IMS 3012 + rVapA aşısı ile aşılama sonrası çelınç yapılan farelerin iç organlarından *R.equi* geri izolasyon sayıları

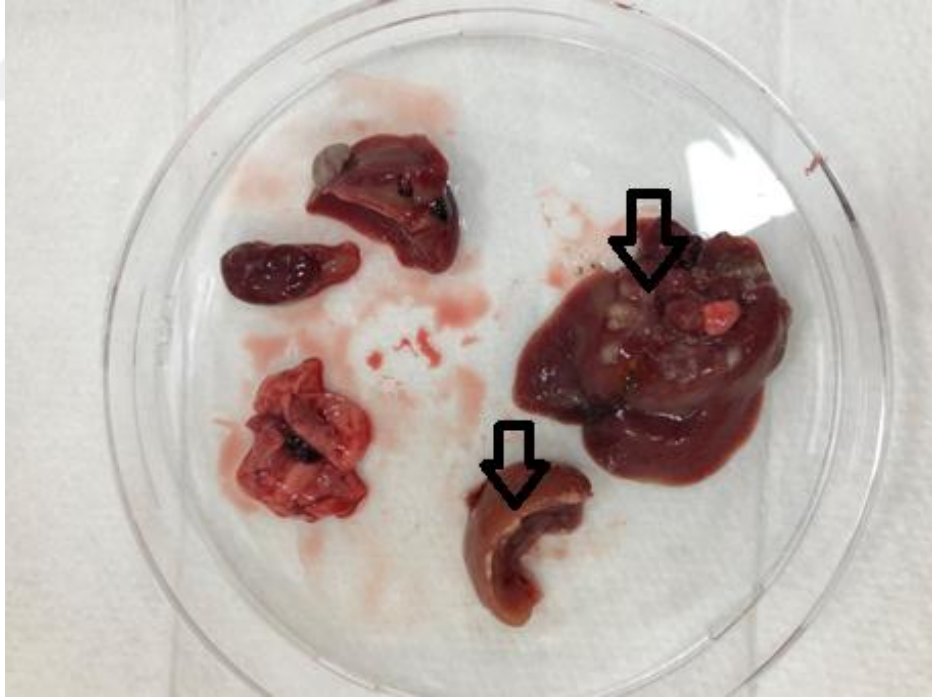
Çizelge 3.6. Aşılı farelerde *R. equi* ile Çelinç Sonrası Hastalık ve Ölüm Oranları

		IMS 3012		PetGelA	
Aşı tipleri	Kontrol	dVapA+IMS	rVapA+IMS	rVapA+PGA	dVapA+PGA
Morbitide	5/6	2/6	2/6	1/6	2/6
Mortalite	5/6	0/6	0/6	0/6	0/6

Kontrol Grubu (n=6), PetGel A+ rVapA (n=6), PetGel A+ dVapA (n=6), IMS 3012+ rVapA, IMS 3012 + rVapA aşılıları ile aşılama sonrası çelinç yapılan farelerin ölüm sayıları (Ölen sayısı/Toplam sayı)



Şekil 3.9. rVapA+ PetGel A ile aşıllı farenin iç organları, aşıllı gruptaki bir farenin iç organlarının normal görünümü.



Şekil 3.10. Kontrol grubu farenin iç organlarının görünümü; enfeksiyondan dolayı iç organlarda büyüme ve ok ile gösterilen kısımlarda apse oluşumu.

4. TARTIŞMA

R. equi özellikle neonatal dönemdeki taylara fekal-oral-solunum yolları ile bulaşarak ciddi pnömoni vakalarına neden olmaktadır (Prescott 1987, Giguère ve ark 2011). Enfeksiyon taylarda genellikle sporadik ya da endemik olarak seyretmektedir (Prescott 1987, Knottenbelt 1993, Takai ve ark 1997). *R. equi*'nin enfekte taylarda yaklaşık % 3 ile % 17 arasında mortalite (Prescott 1987) ve % 80 oranında morbidite ile seyrettiği bildirilmektedir (Ishino ve ark 1992, Takai ve ark 1995). Ayrıca, enfeksiyonun enzootik olarak seyretmediği haralarda etkenin teşhisi zor yapılmaktadır (Giguère ve Prescott 1997).

Taylarda *R. equi* enfeksiyonundan korumak amacıyla birçok kontrol stratejisi uygulanmasına rağmen tam olarak başarı sağlanamamaktadır. Tedavi amacıyla rifampin ve eritromisin gibi antibiyotikler kullanılmasına rağmen etkenin hücre içi üremesi nedeniyle terapötik etkileri tutarsızdır. Uzun süreli antibiyotik tedavisi gerekmesi nedeniyle hem yüksek maliyetlere neden olmakta hem de dirençli *R. equi*'lerin gelişmesi gibi potansiyel riskler oluşturmaktadır (Erganiş ve ark 2017).

R. equi enfeksiyonunun safkan damızlıklarında görülmesi durumunda ağır ekonomik kayıplara ve iyileşen yarış atlarında ise kalıcı akciğer hasarının ortaya çıkmasından dolayı atların yarış performanslarında da düşüşe neden olmaktadır (Gay ve ark 1981, Ainsworth ve ark 1993, Christley ve Hodgson 1994). Ülkemizde son yıllarda atlarda görülen enfeksiyonlar ile ilgili çalışmalar yapılmaya devam edilmekle (Ozgur ve ark 2000) birlikte yaygın ve bulaşıcı olan hastalığın kontrolünde aşılama önemli hale gelmektedir (Erganiş ve ark 2014, Erganiş ve ark 2015).

4.1. rVapA Proteinin Sentezlenmesi ve Değerlendirilmesi

Bu çalışmada NCBI gen bankasındaki referans suşun VapA genine ait dizi analizi ve rVapA nin diziliminin %99.4 oranında benzer olduğu belirlenmesine karşın 90. ve 530. bazlardaki farklılığın; çalışmada kullanılan *R. equi*'nin sahadan izole edilmesi, kullanılan taq polimeraz enzimine bağlı mutasyondan veya sekans açılımına yönelik kullanılan programlardan olabileceği düşünüldü. DNA dizin analizinde farklılık olmasına rağmen amino asit diziliminin %100 uyumlu olması, bu durumun aminoasit sentezinde bir değişikliğe yol açmadığı ve protein yapısını etkilemediği kanaatine varıldı.

Tripathi ve ark (2009), *E.coli* tarafından sentezlenen rDME (rekombinant dengue multiepitop protein) üretmek amacıyla LB, TB, SB, M9 minimal salt (M9), 5 kat Luria Bertani besiyeri (5X LB), TY ve GE (glucose-enriched) besiyerleri kullanmış olup kültürler OD600 değerine ayarlandıktan sonra final konsantrasyon olacak şekilde 0.5 mM IPTG eklenip 4 saat 37 °C’ de inkube etmişlerdir. TY besiyerinde yaklaşık 21.65 mg/l oranında yüksek protein miktarı elde edilmesine karşın SB ve TB sırasıyla 17.32 mg/L ve 16.53 mg/L LB besiyerinde ise 10.37 mg/L ile en az miktarda protein üretmiştir. Ren ve ark (2009), rHcr (kemokin reseptör) proteini LB, TB ve 2YT besiyerleri arasında TB ile en yüksek protein elde edildiğini bildirmişlerdir. Berrow ve ark (2006), farklı rekombinant proteinler için SB, TB ve 2YT besiyerleri ile BL21 (DE3) -pLysS, Rosetta (DE3) -pLysS, Origami (DE3) -pLysS, C41 (DE3) -pLysSRARE bakterileri kompetan olarak kullanılmış olup final IPTG konsantrasyonu 0.5 mM ve 1.0 mM olacak şekilde denemeler çeşitli sürelerde yapılmıştır. Yapılan dot blot testi değerlendirmelerine göre farklı hücrelerde farklı miktarlarda protein sentezi elde edilmesine rağmen TB ve 2YT besiyerlerinde en yüksek protein sentezinin olduğu bildirilmektedir. Oliveira ve ark (2007), *Salmonella* tarafından sentezlenen VapA proteininin sentezlenmesi için yalnızca LB besiyeri kullanılmıştır. Lopez ve ark (2003) pTrcHisA vektörü kullanılarak *E. coli* tarafından sentezlenen VapA proteininin sentezlenmesinde yalnızca BHI besiyeri kullanmışlardır. Sakmanoglu ve Erganiş (2014) tarafından çözünür rekombinant PLD enziminin üretimi ile ilgili yapılan çalışmada; LB, TY, TB, 2TB, 2TY, 2YT, BHI, SB, Triptic Soy Broth, Nutrient Broth ve Todd Hewit Broth sıvı besiyerlerinde IPTG final konsantrasyonu oranı 0.1 M olacak şekilde ayarlandıktan sonra farklı indüklemeye süreleri denenmiş olup üretim için en verimli besiyerinin TY ve en uygun uyartım süresinin ise 180 dakika olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada LB besiyerinin diğer besiyerlerine göre; rekombinant protein sentezinde yetersiz kalması diğer çalışmalarla uyumlu bulundu. Tripathi ve ark (2009) çalışmalarına uygun olarak TY besiyerinde en yüksek miktarda ve aynı sürelerde maksimum protein miktarına ulaşılabileceği gözlemlendi. Besiyeri denemeleri ile ilgili yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında farklı rekombinant proteinlerin üretiminde farklı besiyeri kompozisyonlarının, IPTG oranlarının, indüksiyon sürelerinin etkili olduğu ve süpernatantta bulunan proteinlerin ultra filtrasyon yöntemi ile konsantre edilerek yoğunluğunun artırılmasının uygun olacağı belirlendi

Lopez ve ark (2003) ile Oliveira ve ark (2007) tarafından yapılan çalışmalardan farklı olarak rVapA proteini için ilk kez farklı besiyeri kullanıldı ve TY besiyeri ile en yüksek protein elde edildi.

4.2. Humoral Bağışıklığın Değerlendirilmesi

Teşhis metodlarının hem sensitivitesinin (minimum yanlış negatif sonuç) hem de spesifitesinin (minimum yanlış pozitif sonuç) yüksek olması idealdir. Fakat aynı anda hem spesifitesi hem de sensitivitesi yüksek testler çok fazla bulunmamaktadır. Virulent yada avirulent *R. equi*'nin toprakta ve çevrede bulunması olan maruziyet serolojik testlerin teşhis amacıyla kullanımını sınırlandırmaktadır. Endemik olarak bakterinin bulunduğu çiftliklerde maruziyet fazla olmasına rağmen immunolojik yanıt farklılıklar göstermektedir. Humoral yanıtın düzeyiyle klinik hastalığın gelişmesi arasında tam olarak ilişkisi tespit edilememiştir. *R. equi* enfeksiyonunun serolojik teşhisinde agar gel immunodiffusion (AGID) (Hietala ve ark 1985, Selon ve ark 2001, Martens ve ark 2002) Sinerjistik hemoliz inhibisyon (SHI) (Martens ve ark 2002) ve ELISA testleri kullanılmıştır. ELISA diğerlerinden daha duyarlı ve en çok kullanılan yöntemdir.

Bakterin antijenlerle kaplı ELISA ile serolojik olarak hayvan tanısına yönelik çalışmalarda (Hietala ve ark 1985, Takai 1985, Prescott ve ark. 1996, Higuchi ve ark 1997, Martens ve ark. 2002, Giguere ve ark. 2003, Hooper-McGrevy ve ark. 2005) klinik durum ile serolojik sonuçların uyumlu olmadığı başka bir ifadeyle sonuçların güvenilir olmadığı bildirilmektedir. VapA'ya özgü antikorları tespit edebilen testlerin, hastalığın daha iyi göstergesi olabildiğini destekleyen sonuçlar bulunmaktadır (Kanaly ve ark 1995, Hooper-McGrevy ve ark 2003). Martens ve ark (2002) tarafından, spesifitesi yüksek olan bir testin uygulanmasının, pnömonili taylarda *R. equi* teşhisinde, enfeksiyon olmayan taylarda yanlış tedavi uygulanmasını önlemek amacıyla oldukça önem arz ettiği bildirilmektedir. Giguere ve ark (1999) ise VapA proteinine sahip suşların makrofajlarda uzun süre canlı kalabildiği ve bu proteinin taylarda hastalık tablosuna neden olduğunu belirterek, sensitivitesiyüksek bir testin enfekte hayvanların gözden kaçırılmasını engelleneceğini bildirmiştir. Witkowski ve ark (2012), tüm hücre antijeni ile kaplanan pleytler ile etkenin varlığı teşhis edilmesine rağmen *R. equi*'nin enfeksiyona neden olup olmadığının belirlenmesinde yetersiz kaldığı belirtilmektedir. Attili ve ark (2006) ile Tel ve ark

(2011) tarafından, *R. equi* tüm hücreleri ile kaplanan ELISA testi ile doğal *R. equi* enfeksiyonlarının farklı oranlarda seropozitif olarak belirlendiklerini ifade edilmektedir. Yapılan çalışmalarda uygulanan *R. equi* ELISA yöntemlerinde virulent ve avirulent *R. equi* suşlarının tüm hücre ve Vap A ekstraksiyonları antijen olarak kullanılmıştır (Hietala ve ark 1985, Takai 1985, Prescott ve ark 1996, Higuchi ve ark 1997, Martens ve ark 2002, Giguere ve ark 2003, Hooper-McGrevy ve ark 2005).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda (Martens ve ark 2002, Giguere ve ark 2003) testlerin sensitivite ve spesifiteleri konusunda önem verilmiş fakat tam olarak standart bir yöntem bulunamamıştır. Özgür ve ark. (2002) *R. equi* ATCC 6939 suşunun antijen olarak kullanıldığı ELISA ile 454 tay serumunun 209' unda seropozitiflik gözlemlenmiştir. Seropozitif tayların %60'ında klinik belirti tespit ederken, %40 'ında klinik belirti görülmediğini bildirmişlerdir. Aynı antijenle hazırlanan daha geniş kapsamlı bir seroepidemiolojik çalışmada ise 696 atın 103 (%14.33)'ü pozitif bulunmuştur. Sönmez ve ark (2011) ile Özgür ve ark (2002) ELISA yöntemi ile klinik belirti gösteren ve göstermeyen taylarda oluşan serolojik cevap oranı arasında önemli bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Bu bulgular Higuchi ve ark. (1997)'nin bulgularıyla uyumlu olup pnömonili tayların sadece %40'ında seropozitiflik tespit etmişlerdir. Prescott ve ark. (1996) da VapA antijenini kullanarak yapılan ELISA testiyle; yine VapA ile immunize edilen bazı tayların hastalıktan ölen taylardan daha düşük titrelere sahip olabildiğine dikkat çekmişlerdir. Bu bulgular bireysel olarak oldukça değişken immun cevabı doğrulamaktadır.

R. equi aşısı ile aşılardan alınan serum örneklerindeki antikor varlığının teşhisinde antijen olarak VapA' nın kullanılmasının uygunluğu ve ELISA testinin spesifitesi ile sensitivitesini etkileyen en önemli faktörün VapA' nın pürifiye edilmesinin önemli olduğu bildirilmektedir (Temimhan ve Hadimli 2018). Bu nedenlerle, teşhiste hedeflenen spesifite ve sensitivitesi için rekombinant protein ve saflaştırılmış doğal proteinlerin serolojik testlerde kullanılması önemlidir. Protein temelli ELISA'da, subunit protein kullanımının daha güvenilir sonuçlar verdiği ve bu protein ile kaplı pleytlerin raf ömrünün daha uzun olduğu rapor edilmiştir (Vannuffel ve ark 1994, Norton ve ark 1996).

Bu çalışmada immunize edilen kısıraklarda oluşan antikorların ölçülmesi için ELISA testi uygulandı. rVapA ve dVapA antijenlerinin kullanılmasıyla kısırakların

aşılama yüksek titrelerde cevap oluşturmaları ve aşılama öncesi titrelerle göre artışların tespit edilmesi kullanılan ELISA yönteminin kısırlardaki serolojik cevabın ölçülmesinde güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. Bunun yanısıra dVapA ile rVapA arasındaki OD değerlerinin benzer sonuçlarda olması, istatistiki olarak fark belirlenememesi ($p>0,01$) rVapA'nın ekstrakte edilmiş dVapA yerine antijen olarak kullanılabileceğini gözlenmiştir. Bir enfeksiyonun teşhisinde mikroorganizmaya karşı oluşan antikorları tespit etmede uygun antijen seçimi oldukça önemlidir. Takai ve ark (1985), *R. equi* için ELISA testini geliştirirken purifikasyon, ısı ile muamele ve çeşitli ekstraksiyon metotlarını karşılaştırarak en uygun antijenin Tween 20 ile parçalanmış VapA negatif ATCC 6939 suşu olduğunu belirlemişlerdir. Takai ve ark (1991). Daha sonraki yıllarda virülens proteini olan VapA tanımlanarak VapA pozitif ATCC 33701 suşu ile hazırlanan tüm hücre ve VapA antijenleri; VapA negatif ATCC 6939 hazırlanan tüm hücre antijenleri karşılaştırılmış; VapA antijeni ile daha yüksek titreler oluşurken, bunu tüm hücre antijeni takip etmiş; ATCC 6939 antijeni ile elde edilen titreler ise daha düşük bulunmuştur. Marten ve ark (2002) ise bu iki antijenin de sensitivite ve spesifitelerinin benzer olduğunu ve her ikisinin de taylarda hastalığın teşhisi için uygun olmadığını bildirmişlerdir. Giguere ve ark. (2003) bu 2 antijen temelli serolojik testlerin sonuçları arasında fark bulamamışlardır. Hastalığın endemik olduğu çiftliklerde izole edilen *R. equi* suşlarının genellikle VapA' yı kodlayan plazmide sahip olan virulent suşlar olduğu bildirilmiştir (Takai ve ark. 1994). Vap proteinleri immunojenik olmasına rağmen VapA ve salgısal VapC'nin ergin at ve taylarda en yüksek antikor cevabına neden oldukları gösterilmiştir (Hooper-McGrevy ve ark 2003, Jacks ve ark 2007). *R. equi* enfeksiyonu için hasta ve klinik olarak sağlıklı taylar ile yetişkin atlarda oluşan immün yanıtın farklılıklarını belirleyebilmek amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. Farklı antijenlerle hazırlanan birçok ELISA testi kullanılmasına rağmen tam olarak standart bir metod bulunmamaktadır.

Bu çalışmada daha önce yapılan çalışmalar ışığında bir ELISA testi geliştirildi ve farelerde ve kısırlarda aşılama sonrası antikorların ölçülmesinde kullanıldı. Yapılan ELISA sonuçlarına göre ise; rVapA ve dVapA proteinlerinin ELISA test sonuçlarına göre, her iki antijenin de test antijeni olarak kullanılmasının güvenilir olduğu düşünüldü. dVapA ve rVapA'nın antijenik benzerliğini ve aşılama rolünü saptayabilmek için yapılan çapraz antijen uygulamasına göre aşı antijeninin

test antijeni olarak kullanımında daha güvenilir sonuçlar alınacağı belirlendi. DVapA'nın saf olarak bakteri süpernatantından elde edilmesinin zor olmasından dolayı konsantre rVapA'nın test antijeni olarak kullanımının enfeksiyonun varlığının tespitinde üstünlük sağlayabileceği düşünüldü. Bu nedenle *R. equi* enfeksiyonunun teşhisi için rVapA ile yapılan ELISA'nın; nispeten ucuz, kolay, hassas ve spesifik rutin bir test olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu belirlendi.

4.3. Aşı Çalışmaları

R. equi enfeksiyonundan korunmak için geliştirilen aşılarda etkinliği değişkenlik göstermektedir. Taylarda canlı aşı uygulaması ile ümit verici sonuçlar elde edilmiştir (Chirino-Trejo ve ark 1987, Hooper-McGrevy ve ark 2005, Erganiş ve ark 2012). Ancak kuvvetli bir immun yanıt oluşturmaya rağmen enfeksiyona ve çevresel kontaminasyona neden olmasından dolayı virulent *R. equi*'nin canlı aşı olarak kullanılması sakıncalı olarak görülmektedir (Hooper-McGrevy ve ark 2001, Van der Geize ve ark 2011).

İnaktif bakterin aşısı ve Al(OH)₃ adjuvantı ile kombinlenen aşının kasiçi yolla uygulanmasının taylarda çelince karşı koruyucu olmadığı bildirilmektedir (Chirino-Trejo ve ark 1987, Prescott ve ark 1979) fakat yapılan bu çalışmalar Al(OH)₃ kasiçi yolla uygulanmadığından dolayı hatalı sonuçlara neden olmaktadır (Erganiş ve ark 2012). Her iki çalışmada da aşılamanın derialtı yolla uygulaması gereken dozlarda kas içi yolla kullanmalarının dezavantaj olduğu ayrıca Al(OH)₃ adjuvantının kas içi yolla uygulamasının uygun olmadığı, lokal reaksiyonlardan dolayı aşı antijeninin emiliminin önlendiği ve bu çalışmaların olumsuz kanaate neden olduğu düşünülmektedir (Erganiş ve ark 2012).

Etkili bir aşı geliştirmek amacıyla tayın kazanılmış bağışıklık sistemini sınırlayan faktörleri aşabilen aşı antijenleri ve adjuvantları hedeflenmelidir. Antijenlerin Th (CD4+) ve Ts (CD8+) lere sunulmasını ve sitokin ekspresyonlarını arttırması gerekmektedir (Erganiş ve ark 2012). Taylarda neonatal dönemde bağışıklığı gelişmemiş olması nedeniyle immunizasyon başarısız olarak görülmesine (Giguere ve ark) rağmen bazı araştırmacılar (Ashour ve Hondalus, 2003, Hooper-McGrevy ve ark 2005, Pei ve ark 2007, Oliveira ve ark 2007, Lopez ve ark, 2008) *R. equi* aşılarını taylarda ve farelerde araştırmıştır. Hooper-McGrevy ve ark (2005),

oral yolla virulent *R. equi* 1×10^8 cfu/ ml birer hafta arayla 3 kez aşılansak doğal engellerin aşarak bağışıklık sisteminin uyarıldığını fakat *R. equi*'nin oral verilmesinin çevresel kontaminasyon nedeniyle uygulanabilir olmadığını belirtmektedirler. Pei ve ark (2007), 1 haftalık 5 taya rekombinant choE-marked icl mutant *R. equi* 103+ suşunu 5×10^7 cfu/ml intratrakeal yolla vererek immunize ettikten 2 hafta sonra virulent *R. equi* 103+ suşu ile aynı yolla çelinç yapmışlardır. Çalışmada kontrol olarak 1 tay kullanılmış ve çelinç sonrası ötenazi ile akciğerden geri izolasyon yapılmıştır. Sonuçlara göre 3 taya koruma sağlanırken 2 taya koruma sağlamadığı gözlenmiş ve bu durumun genetik predipozisyonndan kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Lopez ve ark (2008), tam attenüe riboflavin (-) *R. equi* aşısı adayı bir suşu, immunkompetent BALB/c farelerde, zararsızlık ve immunojenite yönünden çalışmalarında patojen *R. equi* çelinçine karşı farelerde koruma sağladığını ve immunkompromize fareler için bile zararsız olduğunu göstermişlerdir. Ancak 7- 14 günlük intrabronşial yolla 5×10^7 riboflavin (-) *R. equi* ile aşılandıktan 21 gün sonra antikor tespit edilmesine rağmen patojen *R. equi* ile çelinca karşı korumadığını bildirmişlerdir.

R. equi'nin konakçı makrofajlarında replikasyonunda önemli bir virülens faktörü VapA olup son yıllarda *R. equi*'nin önlenmesi amacıyla VapA temelli aşılar geliştirilmektedir (Jain ve ark 2003). VapA proteininin tatlarda *R. equi* enfeksiyonlarına karşı koruyucu bağışıklıkta rol oynayan önemli bir antijen olabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Bu nedenle bazı araştırmacılar *R. equi*'ye karşı Vap A protein aşılarının geliştirilmesine katkı sağlamışlardır. Vanniasinkam ve ark (2005), Vap A genini pIMVS-Re3 vektöre aktardıkları antijen ile hazırlanan aşısı ile intramuskular yolla aşıladıkları BALB/ c ve C57BL/6 farelerinde *R. equi* VapA aşısı ile aşılanan BALB/C farelerinde yüksek antikor yanıtı; C57BL/6 farelerinde ise düşük antikor yanıtı oluştuğunu belirlemiştir. Fakat bununla birlikte çelinç grubundaki farelerde 1×10^7 bakteri / ml virulent *R. equi* enjekte edildiğinde koruma gözlenmemiştir. VapA aşısı yanısıra (Haghighi ve Prescott 2005; Vanniasinkam ve ark 2005), VapA dan başka ısı şok protein GroEL2 (Vanniasinkam ve ark 2003) üzerinde fare etkinlik çalışmaları yapılmıştır. VapA, VapD, VapF ve VapG peptidleri gibi potansiyel aşısı adayları üzerinde de çalışmalar yapılmış (Taouji ve ark 2004, Cauchard ve ark 2006), farelerde yetişkin kısırak ve tatlarda Th1, Th2 yanıtını

arttırdığı gösterilmiştir. Ancak, saha etkinlik, doğal ve deneysel tay çelinç denemeleri yapılmamıştır.

Avirulent *R. equi* suşlarının yeterli bağışıklık oluşturmadığı bildirilmesine rağmen Fernandez ve ark (1997) VapA antijeni ve Triton X-114 adjuvantı ile aşılanmış atlardan elde edilen serumlar ile BALB/ c farelerinin *R. equi* ile intraperitoneal enfeksiyondan tamamen koruduğu bildirilmiştir. CD1 fare modelinde ise VapA antijeninin adjuvant olmadan kullanılması durumunda, immun sistemin etkili şekilde uyarıldığı ve koruyuculuğunun olduğu belirtilmiştir (Prescott ve ark 1997). Erganiş ve ark (2015), bakterin, VapA, IMS 3012 adjuvantı ile formüle edilen aşının sadece bakterin ve IMS adjuvantı bulunan aşı ile aşılanmış farelere göre antikor titrelerinin daha erken yükselmeye başladığı bildirilmiştir.

Oliveira ve ark (2007), VapA gen bölgesinin aktarıldığı *Salmonella* Typhimurium bakterisi ile hazırlanan 14 gün arayla 1×10^7 bakteri / ml intragastrik yolla iki kez aşılanan farelere, son aşılamadan 2 hafta sonra *R. equi* çelinç denemesi yapılmıştır ve farelerin lenfoid doku homojenatlarında IL-12 seviyesi yükselmiştir. Ayrıca aşılanan farelerde ölüm olmazken aşılanmamış farelerde ciddi yangı ve nekroz ile birlikte tümünde ölüm gözlemlendiği bildirilmiştir.

R. equi süpernatantın yetişkin atlara verilmesiyle, bu proteinlerin virulent *R. equi*'ye karşı koruyuculuğunun Th1 salınımının artışıyla olduğu gözlenmiştir (Kohler ve ark 2003). Güler ve ark (2004) Vap A pozitif *R. equi* Al(OH)₃ adjuvantı ile kombine edilen aşıyla gebe kısırakları doğumdan önce 45. ve 15. günlerde deri altı yolla 2 kez aşılayarak sonrasında elde edilen plazma ile hiperimmunizasyon uygulamışlardır. Aşılanan ve hiperimmunize edilen atlarda yüksek düzeyde antikor oluştuğunu bildirmişlerdir.

Cauchard ve ark (2004) bakterin aşı ile VapA+ IMS3012 formülasyonu ile hazırladıkları aşırı karşılaştırarak, aşılanan gebe kısırak serumlarında ve taylarında yüksek titrelerde IgG sentezlettirdiğini, aşılı kısırakların taylarında *R. equi* enfeksiyonu görülmediği ve aşısız 15 kısırak tayından 4'ünde (% 26 sında) (P = 0.02) *R. equi* pnömonisi geliştiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada farelerin dört farklı aday aşı ile aşılanması sonrasında ortaya çıkan sonuçlara göre, çalışmada kullanılan tüm aday aşılarda hem antikor cevabı hem

de geri izolasyon ve ölüm oranlarına göre koruyucu olduğu gözlemlendi. ELISA sonuçlarına göre yüksek antikor sonuçlarına sahip grupların çelinç denemelerinde de orantılı olarak sonuç verdiği belirlendi. rVapA+PGA grubunda 1 organda geri izolasyon, rVapA+IMS grubunda 2 organda geri izolasyon; dVapA gruplarında ise 3'er organda geri izolasyon gözlemlendi ve ölüm gerçekleşmedi. Kontrol grubunda ise 20 organda geri izolasyon elde edildi ve 5 farede ölüm gözlemlendi. Bu bulgularla birlikte değerlendirildiğinde ELISA sonuçlarında da 0.759 ile en yüksek antikor ortalamasına sahip aşı grubu olan rVapA+PGA grubunda organlardan *R. equi* geri izolasyonunun oranının düşük olduğu; antikorun oluşmadığı kontrol grubunda ise yüksek oranda geri izolasyon ve ölüm olduğu gözlemlendi. rVapA ve dVapA antijenleri ile hazırlanan aşılarda aşı seropotens grubu farelerinden alınan serum örneklerine uygulanan ELISA sonucunda belirlenen negatif eşik değerlerine göre aşılanan tüm gruplarda antikor yanıtın geliştiği gözlemlendi. Tüm aşı gruplarında kontrol grubuna kıyasla fark $p<0,01$ istatistiki açıdan anlamlı olarak gözlemlendi, rVapA ile dVapA'nın aşı kombinasyonu etkinlikleri karşılaştırıldığında; rVapA aşı gruplarının immun sistemi benzer şekilde uyardığı kanaatine varıldı. Buna rağmen diğer aşılardan elde edilen sonuçlar kıyaslandığında (Tablo 3.5, Tablo 3.6) *R. equi* enfeksiyonunun oluşumunun engellenmesinde rVapA+ PetGel A aşının nispeten daha etkili olduğu düşünüldü.

Aşı formülasyonları için antijene karşı adoptif immun yanıtı artırma amacıyla uygun adjuvant kullanımı önemlidir. Bu nedenle izole edilmiş antijenlerden oluşan yeni alt ünite aşılarının geliştirilmesinde adjuvant seçimi oldukça önemlidir (Pashine ve ark 2005). Bununla birlikte adjuvantın etkisi, genellikle adjuvant ve antijenin etkileşimlerine bağlıdır. Adjuvantın güvenliği ve verimliliği kullanılan aşıya göre değişebilmektedir (Cauchard ve ark 2004, Taouji ve ark 2004). Adjuvantın etkili olmasının yanı sıra adjuvantın yan etkileri de oldukça önemlidir. Bu nedenle aday aşı denemelerinde aşının verimliliği kadar güvenilirliği de desteklenmelidir (Taouji ve ark 2004, Cauchard ve ark 2014) atlar üzerinde denediği *R. equi* aşı çalışmalarında, IMS 3012 ve PetGel A adjuvantlarının güvenilirlik testlerinde deri kalınlığında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Erganiş ve ark (2017) *R. equi* (K2002 suşu) kullanılarak Montanide IMS 3012 (IMS) ve Montanide Pet Gel A (PGA) adjuvantları ile (bakteri + VapA + IMS ve bakteri VapA + PGA) iki inaktif aday aşı hazırlanmıştır. Gebe kısıraklar 8. 9. ve 10. aylarda, aşılanarak,

VapA proteini veya *R. equi* tüm hücre ile kaplanan ELISA ile antikor titrelerini belirlemişler ve sonuç olarak, PGA adjuvantlanmış *R.equi* aşısının antikor yanıtını arttırmada IMS'den daha etkili olduğu tespit edildiği bildirilmiştir. Çalışmanın immunolojik bulgularında ise her iki adjuvantın da *R. equi* enfeksiyonuna karşı oluşan bağışıklığı indükleyebileceği fakat PetGel A'nın en iyi immunogüçlendirme kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada ise aşılanan tüm gruplarda antikor yanıtın geliştiği ve PetGel A ile IMS 3012' nin immun sistemi etkili şekilde uyardığı gözlemlendi. Tüm fare gruplarında aşılama alanında yara veya iltihap gözlenmemesi nedenleriyle her iki adjuvantında güvenilir olduğu düşünüldü. Buna ilaveten PetGel A ile formüle edilmiş aşı gruplarında enjeksiyon yerinde nekroz oluşmadığı; IMS 3012 ile benzer seviyelerde immunizasyon oluşturduğu yakın antikor seviyelerine sahip oldukları fakat bu nedenlerle PetGel A'nın IMS 3012' den nispeten daha üstün olduğu sonucuna varıldı. Dört farklı aday aşı içerisinde en etkili aşı formülasyonunun rVapA+ PetGel A kombinasyonu olduğu belirlendi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Saha izolatının VapA geni ile referans suşun VapA geni baz diziliminin %99.4 benzer olduğu, farklılığa bağlı olarak protein yapısının değişmediği ve etkinliğini devam ettirebilmesine engel olmadığı,
2. rVapA ile dVapA antijenik yapısının benzer olduğu, dVapA proteinin yüksek etkinliğe sahip olması ve fazla miktarda üretilebilmesi için besiyeri ortamının zenginleştirilmesinin gerekliliği bulunurken, rVapA sentezinde ekonomik ve uygun besiyeri ortamına gerek olduğu,
3. Çözünebilir rekombinant protein üretiminde kullanılan kompetanın etkisinin, besiyeri bileşiminin, IPTG miktarının, O₂ oranının, ortam ısısının, indüklemeye süresinin önemli rol oynadığı ve fazla miktarda üretilmesi hedeflendiğinde bu durumların kritik rol oynadığı, bundan dolayı rVapA proteini için yaygın olarak kullanılan LB besiyerinden ziyade TY besiyerinin uygun olduğu,
4. rVapA ile hazırlanan aşılar ile aşılanan farelerde oluşan antikor miktarının dVapA ile aşılanan farelerden benzer seviyede olduğu,
5. Saf olarak elde edilen rVapA antijeni ile kaplanan ELISA sonucuna göre, aşının immun sistemi uyarım gücü hakkında daha güvenilir sonuçlar elde edildiği,
7. Aşı etkinliğinin ölçülmesini temel alan testlerde aşı antijeninin, test antijeni olarak kullanılmasının uygun olacağı,
8. Fare üzerinde çelmeç denemesi verilerine göre; 4 farklı etkili aday aşı formülasyonunun geliştirildiği,
9. PetGel A ile aşılanan farelerde IMS3012' ye göre oluşan antikor miktarının nispeten daha yüksek olduğu,
10. Rekombinant protein ve uygun adjuvant ile hazırlanan aşı ile *R. equi* enfeksiyonundan korunabileceği kanaatine varıldı.

6. KAYNAKLAR

- Aguilar J, Rodriguez E, 2007. Vaccine adjuvants revisited. *Vac*, 25, 19, 3752-62.
- Ainsworth DM, Beck K, Boatwright C, Snedden K, Rebhun W, 1993. Lack of residual lung damage in horses in which *Rhodococcus equi*-induced pneumonia had been diagnosed. *American Jour of Vet Res*, 54, 12, 2115-20.
- Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Akay Ö, 1992. Özel Mikrobiyoloji Epidemiyoloji. Atatürk Üniversitesi Basımevi, Kars.
- Armstrong J, Hart PA, 1971. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J of Exp Med*, 134, 3, 713-40.
- Asano M, Nakane A, Minagawa T, 1993. Endogenous gamma interferon is essential in granuloma formation induced by glycolipid-containing mycolic acid in mice. *Infect and Immun*, 61, 7, 2872-8.
- Ashour J, Hondalus MK, 2003. Phenotypic mutants of the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi* created by in vivo Himar1 transposon mutagenesis. *J of Bacterio*, 185, 8, 2644-52.
- Attili A, Kennerman E, Takai S, Or M, Marenzoni M, Torun S, Pieramati C, Kaya A, Golcu E, Parkan Ç, 2006. Seroepidemiological survey of *Rhodococcus equi* infection in asymptomatic horses from Bursa, Izmir and Istanbul provinces, Turkey. *Comparative Immun, Microbio and Inf Dis*, 29, 5-6, 323-33.
- Aydın N, İzgür M, Diker K, Yardımcı H, Esenal Ö, Paracıkoğlu J, Akan M, 2006. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ankara: İlke-Emek Matbaacılık ve Yayıncılık, 145-63.
- Barton M, 1992. The ecology and epidemiology of *Rhodococcus equi*, Presented at the Equine Infectious Diseases VI: 6th International Conference. Newmarket, UK.
- Barton M, Hughes K, 1984. Ecology of *Rhodococcus equi*. *Vet microbio*, 9, 1, 65-76.
- Barton MD, 1981. A Study of *Rhodococcus (Corynebacterium) Equi*, University of Melbourne.
- Barton MD, Hughes MS, 1980. *Corynebacterium equi*: a review. *Vet Bull*, 50, 65- 80.
- BD F, Berg R. Bacterins for immunization against bovine vibriosis. *J of the Am Vet Med Assoc*, 1640
- Becker JM, Caldwell GA, Zachgo EA, 1996. *Biotechnology: a laboratory course*, Aca Press, p.
- Becu T, Polledo G, Gaskin J, 1997. Immunoprophylaxis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Vet Microbio*, 56, 3-4, 193-204.
- Bell KS, Philp JC, Aw DW, Christofi N, 1998. The genus *Rhodococcus*. *J Appl Microbiol*, 85, 2, 195-210.
- Bellinger-Kawahara C, Horwitz MA, 1990. Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J of Exp Med*, 172, 4, 1201-10.
- Benoit S, Benachour A, Taouji S, Auffray Y, Hartke A, 2001. Induction of vap genes encoded by the virulence plasmid of *Rhodococcus equi* during acid tolerance response. *Res in Microbio* 152, 5, 439-49.
- Benoit S, Benachour A, Taouji S, Auffray Y, Hartke A, 2002. H₂O₂, which causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. *Infect and Immun*, 70, 7, 3768-76.
- Berrow NS, Büsow K, Coutard B, Diprose J, Ekberg M, Folkers G, Lévy N, Lieu V, Owens R, Peleg Y, 2006. Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study. *Acta Crystallographica Section D: Bio Crystal*, 62, 10, 1218-26.
- Bomford R, 1989. Aluminium salts: perspectives in their use as adjuvants. In: *Immunological adjuvants and vaccines*. Eds: Springer, p. 35-41.
- Bowles PM, Woolcock J, Mutimer M, 1989. Early events associated with experimental infection of the murine lung with *Rhodococcus equi*. *J of Comp Path*, 101, 4, 411-20.

- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem*, 72, 1-2, 248-54.
- Broedel S, Papciak SM, Jones WR, 2001. The selection of optimum media formulations for improved expression of recombinant proteins in *E. coli*. *Athena Enz Syst Tech Bullet*, 2, 1.
- Brumbaugh G, Davis L, Thurmon J, Savage D, 1990. Influence of *Rhodococcus equi* on the respiratory burst of resident alveolar macrophages from adult horses. *Amer J of Vet Res*, 51, 5, 766-71.
- Burnette WN, 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analyt Biochem*, 112, 2, 195-203.
- Burton AJ, Giguère S, Sturgill TL, Berghaus LJ, Slovis NM, Whitman JL, Levering C, Kuskie KR, Cohen ND, 2013. Macrolide- and rifampin-resistant *Rhodococcus equi* on a horse breeding farm, Kentucky, USA. *Emerg Inf Dis*, 19, 2, 282.
- Butt TR, Jonnalagadda S, Monia BP, Sternberg EJ, Marsh JA, Stadel JM, Ecker DJ, Crooke ST, 1989. Ubiquitin fusion augments the yield of cloned gene products in *Escherichia coli*. *Proceed of the Nat Aca of Sci*, 86, 8, 2540-4.
- Byrne B, Prescott J, Palmer G, Hines S, 1999. Characterisation of a virulence-associated gene family in *Rhodococcus equi*. *Equine Infec Dis VIII*. New Market: R & W Publications, 532-3.
- Byrne BA, Prescott JF, Palmer GH, Takai S, Nicholson VM, Alperin DC, Hines SA, 2001. Virulence Plasmid of *Rhodococcus equi* Contains Inducible Gene Family Encoding Secreted Proteins. *Infec and Immun*, 69, 2, 650-6.
- Carrigan MJ, Links IJ, Morton AG, 1988. *Rhodococcus equi* infection in goats. *Aust Vet J*, 65, 10, 331-2.
- Castor B, Ursing J, Åberg M, Pålsson N, 1990. Infected wounds and repeated septicemia in a case of factitious illness. *Scandin J of Infect Dis*, 22, 2, 227-32.
- Cauchard J, Sevin C, Ballet J-J, Taouji S, 2004. Foal IgG and opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a protective VapA candidate vaccine. *Vet microbio*, 104, 1-2, 73-81.
- Cauchard S, Bermudez-Humaran L, Blugeon S, Laugier C, Langella P, Cauchard J, 2011. Mucosal co-immunization of mice with recombinant lactococci secreting VapA antigen and leptin elicits a protective immune response against *Rhodococcus equi* infection. *Vac*, 30, 1, 95-102.
- Cauchard S, Bertrand F, Barrier-Battut I, Jacquet S, Laurentie M, Barbey C, Laugier C, Deville S, Cauchard J, 2014. Assessment of the safety and immunogenicity of *Rhodococcus equi*-secreted proteins combined with either a liquid nanoparticle (IMS 3012) or a polymeric (PET GEL A) water-based adjuvant in adult horses and foals—identification of promising new candidate antigens. *Vet Immun and Immunopatho*, 157, 3-4, 164-74.
- Chirino-Trejo J, Prescott J, Yager J, 1987. Protection of foals against experimental *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization. *Can J of Vet Res*, 51, 4, 444.
- Christley R, Hodgson D, 1994. *Rhodococcus equi* pneumonia in foals and the effect on subsequent race performance. *Aust. Equi Vet*, 12, 76-9.
- Clemens DL, Horwitz MA, 1995. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *Jof Exp Med*, 181, 1, 257-70.
- Clotet B, Sirera G, Erice A, 1993. *Rhodococcus equi* infection in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 6, 4, 429-30.
- Coffman RL, Sher A, Seder RA, 2010. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immun*, 33, 4, 492-503.
- Cox JC, Coulter AR, 1992. Advances in adjuvant technology and application. *Anim Parasite Control Util Biotech*, 49-112.
- Cox JC, Coulter AR, 1997. Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vac*, 15, 3, 248-56.

- Cuteri V, Takai S, Marenzoni ML, Morgante M, Valente C, 2001. Detection of antibodies against *Rhodococcus equi* in Alpaca (*Lama pacos*) in Italy. *Eur J Epidemiol*, 17, 11, 1043-5.
- Davis-Scibienski C, Beaman BL, 1980. Interaction of *Nocardia asteroides* with rabbit alveolar macrophages: association of virulence, viability, ultrastructural damage, and phagosome-lysosome fusion. *InfeC and Immun*, 28, 2, 610-9.
- Davis WP, Steficek BA, Watson GL, Yamini B, Madaram H, Takai S, Render JA, 1999. Disseminated *Rhodococcus equi* infection in two goats. *Vet Pathol*, 36, 4, 336-9.
- Dawson TR, Horohov DW, Meijer WG, Muscatello G, 2010. Current understanding of the equine immune response to *Rhodococcus equi*. An immunological review of *R. equi* pneumonia. *Vet Immun and Immunopatho*, 135, 1-2, 1-11.
- Drancourt M, Bonnet E, Gallais H, Peloux Y, Raoult D, 1992. *Rhodococcus equi* infection in patients with AIDS. *J of Infect*, 24, 2, 123-31.
- Ebersole LL, Paturzo JL, 1988. Endophthalmitis caused by *Rhodococcus equi* Prescott serotype 4. *J of Clin Microbio*, 26, 6, 1221.
- Eldridge JH, Staas JK, Meulbroek JA, McGhee JR, Tice TR, Gilley RM, 1991. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Mol Immun*, 28, 3, 287-94.
- Elliott G, Lawson GH, Mackenzie CP, 1986. *Rhodococcus equi* infection in cats. *Vet Rec*, 118, 25, 693-4.
- Emmons W, Reichwein B, Winslow DL, 1990. *Rhodococcus equi* infection in the patient with AIDS: literature review and report of an unusual case. *Rev of Infec Dis*, 13, 1, 91-6.
- Engvall E, Perlmann P, 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem*, 8, 9, 871-4.
- Erganiş O, İstanbulluoğlu E, 1993. İmmünoloji. Mimoza Yayınevi, Konya.
- Erganis O, Sayin Z, Hadimli HH, Sakmanoglu A, Pinarkara Y, Ozdemir O, Maden M, 2014. The effectiveness of anti-*R. equi* hyperimmune plasma against *R. equi* challenge in thoroughbred Arabian foals of mares vaccinated with *R. equi* vaccine. *The Sci World J*.
- Erganiş O, Hadimli HH, Sayin Z, 2012. Taylardaki *Rhodococcus equi* enfeksiyonu için aşı hiperimmun plazma ve bağışıklık ölçüm kiti geliştirilmesi. KAMAG Projesi.
- Erganiş O, Hadimli HH, Sayin Z, Sakmanoğlu A, Pinarkara Y, Özdemir O, 2015. Efficacy of experimental inactivated and live *Rhodococcus equi* vaccines for thoroughbred Arabian mares in mice. *Tur J of Vet and Anim Sci*, 39, 3, 295-301.
- Erganiş O, Sakmanoğlu A, Sayin Z, Uslu A, Güler A, Karabulut E, 2017. Comparison of seropotency of *Rhodococcus equi* candidate vaccines with montanide ims 3012 and montanide pet gel a adjuvans in thoroughbred arabian mares. 4th International VETIstanbul Group Congress, Abstract Book: p.O-18, 11-13 May 2017, Almaty, Kazakhstan.
- Feinman R, Henriksen-DeStefano D, Tsujimoto M, Vilcek J, 1987. Tumor necrosis factor is an important mediator of tumor cell killing by human monocytes. *The Journal of Immunology*, 138, 2, 635-40.
- Fernandez-Garayzabal J, Suarez G, Blanco M, Gibello A, Dominguez L, 1996. Taxonomic note: a proposal for reviewing the interpretation of the CAMP reaction between *Listeria monocytogenes* and *Rhodococcus equi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46, 3, 832-4.
- Fernandez A, Prescott J, Nicholson V, 1997. Protective effect against *Rhodococcus equi* infection in mice of IgG purified from horses vaccinated with virulence associated protein (VapA)-enriched antigens. *Veterinary microbiology*, 56, 3-4, 187-92.
- Fidvi SA, Brudnicki AR, Chowdhury MI, Beneck D, 2003. Cavitary *Rhodococcus equi* pneumonia with endobronchial granulomas: report of an unusual case. *Pediatr Radiol*, 33, 2, 140-2.
- Fontanals AM, Becú T, Polledo G, Gaskin C, Braun M, 1997. Antigenic analysis of *Rhodococcus equi* preparations using different horse sera. *Vet micro*, 56, 3-4, 247-55.

- Garrity GM, 2014. Conservation of *Rhodococcus equi* (Magnusson 1923) Goodfellow and Alderson 1977 and rejection of *Corynebacterium hoagii* (Morse 1912) Ebersson 1918. *Inter J of System And Ev Microbiol*, 64, 1, 311-2.
- Garrity GM, 2014. Conservation of *Rhodococcus equi* (Magnusson 1923) Goodfellow and Alderson 1977 and rejection of *Corynebacterium hoagii* (Morse 1912) Ebersson 1918. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64, Pt 1, 311-2.
- Gay C, Sloss V, Wrigley R, Horsey R, 1981. The treatment of pneumonia in foals caused by *Rhodococcus* (*Corynebacterium*) *equi*. *Aus Vet J*, 57, 3, 150-1.
- Giguère S, Cohen N, Keith Chaffin M, Hines S, Hondalus M, Prescott J, Slovis N, 2011. *Rhodococcus equi*: Clinical Manifestations, Virulence, and Immunity. *J of Vet In Med*, 25, 6, 1221-30.
- Giguère S, Cohen N, Keith Chaffin M, Slovis N, Hondalus M, Hines S, Prescott J, 2011. Diagnosis, Treatment, Control, and Prevention of Infections Caused by *Rhodococcus equi* in Foals. *J of Vet In Med*, 25, 6, 1209-20.
- Giguère S, Gaskin JM, Miller C, Bowman JL, 2002. Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. *J of the Am Vet Med Ass*, 220, 1, 59-63.
- Giguère S, Hernandez J, Gaskin J, Prescott JF, Takai S, Miller C, 2003. Performance of five serological assays for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 10, 2, 241-5.
- Giguère S, Lee E, Williams E, Cohen ND, Chaffin MK, Halbert N, Martens RJ, Franklin RP, Clark CC, Slovis NM, 2010. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance to macrolide antimicrobials or rifampin in *Rhodococcus equi* isolates and treatment outcome in foals infected with antimicrobial-resistant isolates of *R. equi*. *J of the Am Vet Med Ass*, 237, 1, 74-81.
- Giguère S, Prescott JF, 1997. Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Vet Microbio*, 56, 3-4, 313-34.
- Giguère S, Wilkie BN, Prescott JF, 1999. Modulation of cytokine response of pneumonic foals by virulent *Rhodococcus equi*. *Infect and Immu*, 67, 10, 5041-7.
- Giles C, Vanniasinkam T, Ndi S, Barton M, 2015. *Rhodococcus equi* (*Prescottella equi*) vaccines; the future of vaccine development. *Equine Vet J*, 47, 5, 510-8.
- Glenny A, Pope C, Waddington H, Wallace U, 1926. Immunological notes. xvii–xxiv. *The J of Path and Bacterio*, 29, 1, 31-40.
- Golub B, Falk G, Spink WW, 1967. Lung abscess due to *Corynebacterium equi*. Report of first human infection. *Ann Intern Med*, 66, 6, 1174-7.
- Goodfellow M, 1987. The taxonomic status of *Rhodococcus equi*. *Vet Microbiol*, 14, 3, 205-9.
- Goodfellow M, Minnikin DE, 1977. Nocardioform bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 31, 159-80.
- Gotoh K, Mitsuyama M, Imaizumi S, Kawamura I, Yano I, 1991. Mycolic acid-containing glycolipid as a possible virulence factor of *Rhodococcus equi* for mice. *Microbiol and Immun*, 35, 3, 175-85.
- Gray KJ, French N, Lugada E, Watera C, Gilks CF, 2000. *Rhodococcus equi* and HIV-1 infection in Uganda. *J Infect*, 41, 3, 227-31.
- Gupta RK, 1998. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Advanc Drug Deli Rev*, 32, 3, 155-72.
- Güler L, Gündüz K., Erganiş O, Durmaz M, Ok, Ü, Gülcü Y. 2004. Tayların *Rhodococcus equi* pnömonisine karşı aşı ve hiperimmun plazma geliştirilmesi ve üretimi. VI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 25-27 Eylül, Elazığ.
- Hamaoka T, Katz DH, Benacerraf B, 1973. Hapten-specific ige antibody responses in mice: ii. cooperative interactions between adoptively transferred t and b lymphocytes in the development of ige response. *J of Exp Med*, 138, 3, 538-56.

- Hanington PC, Barreda DR, Belosevic M, 2006. A novel hematopoietic granulin induces proliferation of goldfish (*Carassius auratus* L.) macrophages. *Jl of Biologic Chem*, 281, 15, 9963-70.
- Harvey RL, Sunstrum JC, 1990. *Rhodococcus equi* Infection in Patients with and without Human Immunodeficiency Virus Infection. *Rev of Infect Dis*, 13, 1, 139-45.
- Hietala S, Ardans A, Sansome A, 1985. Detection of *Corynebacterium equi*-specific antibody in horses by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J of Vet Res*, 46, 1, 13-5.
- Hietala S, Ardans A, 1987. Interaction of *Rhodococcus equi* with phagocytic cells from R. equi-exposed and non-exposed foals. *Vet Microbiol*, 14, 3, 307-20.
- Hietala SK, Ardans AA, 1987. Neutrophil phagocytic and serum opsonic response of the foal to *Corynebacterium equi*. *Veterinary Immuno and Immunopatho*, 14, 3, 279-94.
- Higuchi T, Arakawa T, Hashikura S, Inui T, Senba H, Takai S, 1999. Effect of prophylactic administration of hyperimmune plasma to prevent *Rhodococcus equi* infection on foals from endemically affected farms. *J of Vet Med, Series B*, 46, 9, 641-8.
- Higuchi T, Hashikura S, Gojo C, Inui T, Satoh S, Yoshida M, Ishiyama T, Yamada H, Takai S, 1997. Clinical evaluation of the serodiagnostic value of enzyme-linked immunosorbent assay for *Rhodococcus equi* infection in foals. *Equi Vet J*, 29, 4, 274-8.
- Hillman D, Garretson B, Fiscella R, 1989. *Rhodococcus equi* endophthalmitis. *Arch of Ophth*, 107, 1, 20-.
- Hines MT, 2007. *Rhodococcus equi*. *Equi Inf Dis*, 281-95.
- Hines MT, Paasch KM, Alperin DC, Palmer GH, Westhoff NC, Hines SA, 2001. Immunity to *Rhodococcus equi*: antigen-specific recall responses in the lungs of adult horses. *Veterinary Immuno and Immunopatho*, 79, 1-2, 101-14.
- Hines S, Kanaly S, Byrne BA, Palmer G, 1997. Immunity to *Rhodococcus equi*. *Vet Microbiol*, 56, 3-4, 177-85.
- Hondalus MK, 1997. Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*. *Vet Microbiol*, 56, 3-4, 257-68.
- Hondalus MK, 1997. Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*. *Vet Microbiology*, 56, 3-4, 257-68.
- Hondalus MK, Diamond MS, Rosenthal LA, Springer TA, Mosser DM, 1993. The intracellular bacterium *Rhodococcus equi* requires Mac-1 to bind to mammalian cells. *Infect and Immun*, 61, 7, 2919-29.
- Hondalus MK, Mosser DM, 1994. Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. *Infect and Immun*, 62, 10, 4167-75.
- Hooper-McGrevy KE, Giguere S, Wilkie BN, Prescott JF, 2001. Evaluation of equine immunoglobulin specific for *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins A and C for use in protecting foals against *Rhodococcus equi*-induced pneumonia. *American journal of Vet Res*, 62, 8, 1307-13.
- Hooper-McGrevy KE, Wilkie BN, Prescott JF, 2003. Immunoglobulin G subisotype responses of pneumonic and healthy, exposed foals and adult horses to *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10, 3, 345-51.
- Hooper-McGrevy K, Wilkie B, Prescott J, 2005. Virulence-associated protein-specific serum immunoglobulin G-isotype expression in young foals protected against *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization with virulent R. equi. *Vac*, 23, 50, 5760-7.
- Horwitz MA, Silverstein SC, 1983. Intracellular multiplication of Legionnaires' disease bacteria (*Legionella pneumophila*) in human monocytes is reversibly inhibited by erythromycin and rifampin. *The J of Clin Invest*, 71, 1, 15-26.
- Huffnagle KE, Southern Jr PM, 1992. *Rhodococcus equi*: An opportunistic pathogen in a patient with AIDS. *Clinic Microbiol News*, 14, 18, 141-2.
- Hughes K, Sulaiman I, 1987. The ecology of *Rhodococcus equi* and physicochemical influences on growth. *Vet Microbiol*, 14, 3, 241-50.

- Hunter R, Strickland F, Kezdy F, 1981. The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. I. The role of hydrophile-lipophile balance. *The J of Immun*, 127, 3, 1244-50.
- Hurley J, Begg A, 1995. Failure of hyperimmune plasma to prevent pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. *Aust Vet J*, 72, 11, 418-20.
- Ishino S, Kumagai K, Kuniyoshi S, Nakazawa M, Matsuda I, Oka M, 1992. Immunohistochemical observations on pneumonic lesions caused by *Rhodococcus equi* in foals. *Journal of Vet Med Sci*, 54, 3, 509-15.
- Jain S, Bloom BR, Hondalus MK, 2003. Deletion of vapA encoding virulence associated protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. *Mol Microbiol*, 50, 1, 115-28.
- Javed R, Taku AK, Sharma RK, Badroo GA, 2017. Molecular characterization of *Rhodococcus equi* isolates in equines. *Vet World*, 10, 1, 6-10.
- Jentsch S, Pyrowolakis G, 2000. Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends in Cell Biology*, 10, 8, 335-42.
- Johnson J, Prescott J, Markham R, 1983. The pathology of experimental *Corynebacterium equi* infection in foals following intrabronchial challenge. *Vet Patho*, 20, 4, 440-9.
- Jones AL, Sutcliffe IC, Goodfellow M, 2013. Proposal to replace the illegitimate genus name *Prescottia* Jones et al. 2013 with the genus name *Prescottella* gen. nov. and to replace the illegitimate combination *Prescottia equi* Jones et al. 2013 with *Prescottella equi* comb. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103, 6, 1405-7.
- Kämpfer P, Dott W, Martin K, Glaeser SP, 2014. *Rhodococcus defluvii* sp. nov., isolated from wastewater of a bioreactor and formal proposal to reclassify [*Corynebacterium hoagii*] and *Rhodococcus equi* as *Rhodococcus hoagii* comb. nov. *Int J of Sys And Evolution Microbiol*, 64, 3, 755-61.
- Kanally ST, Hines SA, Palmer GH, 1995. Cytokine modulation alters pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* and development of granulomatous pneumonia. *Infect and Immun*, 63, 8, 3037-41.
- Karlson AG, Moses HE, Feldman WH, 1940. *Corynebacterium equi* (Magnusson, 1923) in the submaxillary lymph nodes of swine. *The J of Inf Dis*, 243-51.
- Kleman GL, Strohl WR, 1994. Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation. *Cur Opin in Biotech*, 5, 2, 180-6.
- Klinman DM, Yi A-K, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM, 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proceed of the Nation Aca of Sci*, 93, 7, 2879-83.
- Knottenbelt D, 1993. *Rhodococcus equi* infection in foals: a report of an outbreak on a thoroughbred stud in Zimbabwe. *The Vet Rec*, 132, 4, 79-85.
- Kohler AK, Stone DM, Hines MT, Byrne BA, Alperin DC, Norton LK, Hines SA, 2003. *Rhodococcus equi* secreted antigens are immunogenic and stimulate a type 1 recall response in the lungs of horses immune to *R. equi* infection. *Infect and Immun*, 71, 11, 6329-37.
- Kreuter J, 1988. Possibilities of using nanoparticles as carriers for drugs and vaccines. *J of Microencaps*, 5, 2, 115-27.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat*, 227, 5259, 680-5.
- Lawrence GW, Saul A, Giddy AJ, Kemp R, Pye D, 1997. Phase I trial in humans of an oil-based adjuvant SEPPIC MONTANIDE ISA 720. *Vac*, 15, 2, 176-8.
- LeBlanc M, Tran T, Baldwin J, Pritchard E, 1992. Factors that influence passive transfer of immunoglobulins in foals. *J of the Am Vet Med Assoc*, 200, 2, 179-83.
- Lee SY, 1996. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechn*, 14, 3, 98-105.
- Levine L, Stone JL, Wyman L, 1955. Factors affecting the efficiency of the aluminum adjuvant in diphtheria and tetanus toxoids. *The J of Immun*, 75, 4, 301-7.

- Levitz SM, Tabuni A, 1991. Binding of *Cryptococcus neoformans* by human cultured macrophages. Requirements for multiple complement receptors and actin. *The J of Clin Invest*, 87, 2, 528-35.
- Levy O, 2005. Innate immunity of the human newborn: distinct cytokine responses to LPS and other Toll-like receptor agonists. *J of Endotox Res*, 11, 2, 113-6.
- Lewis PA, Loomis D, 1924. Allergic irritability: the formation of anti-sheep hemolytic amboceptor in the normal and tuberculous guinea pig. *The J of Exp Med*, 40, 4, 503.
- Li S-J, Hochstrasser M, 2000. The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Mol and Cell Bio*, 20, 7, 2367-77.
- Linder R, Bernheimer AW, 1982. Enzymatic oxidation of membrane cholesterol in relation to lysis of sheep erythrocytes by corynebacterial enzymes. *Arch of Biochem and Biophys*, 213, 2, 395-404.
- Liu T, Nerren J, Liu M, Martens R, Cohen N, 2009. Basal and stimulus-induced cytokine expression is selectively impaired in peripheral blood mononuclear cells of newborn foals. *Vac*, 27, 5, 674-83.
- Lopez AM, Hines MT, Palmer GH, Knowles DP, Alperin DC, Hines SA, 2003. Analysis of anamnestic immune responses in adult horses and priming in neonates induced by a DNA vaccine expressing the vapA gene of *Rhodococcus equi*. *Vac*, 21, 25-26, 3815-25.
- Lopez A, Townsend H, Allen A, Hondalus M, 2008. Safety and immunogenicity of a live-attenuated auxotrophic candidate vaccine against the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *Vac*, 26, 7, 998-1009.
- Lunn DP, Townsend HG, 2000. Equine vaccination. *Vet Clin of Nor Am: Equi Pract*, 16, 1, 199-226.
- Madigan JE, Hietala S, Muller N, 1991. Protection against naturally acquired *Rhodococcus equi* pneumonia in foals by administration of hyperimmune plasma. *J of Repro and Fert. Supplement*, 44, 571-8.
- Mak TW, Saunders ME, 2005. *The immune response: basic and clinical principles*, Acad Press.
- Martens J, Martens R, Renshaw H, 1988. *Rhodococcus (Corynebacterium) equi*: bactericidal capacity of neutrophils from neonatal and adult horses. *Am J of Vet Res*, 49, 3, 295-9.
- Martens R, Fiske R, Renshaw H, 1982. Experimental subacute foal pneumonia induced by aerosol administration of *Corynebacterium equi*. *Equine Vet J*, 14, 2, 111-6.
- Martens R, Martens J, Renshaw H, Hietala S, 1987. *Rhodococcus equi*: equine neutrophil chemiluminescent and bactericidal responses to opsonizing antibody. *Vet Microbiol*, 14, 3, 277-86.
- Martens R, Martens JG, Fiske R, 1991. Failure of passive immunisation by colostrum from immunised mares to protect foals against *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Vet J*, 23, S12, 19-22.
- Martens R, Martens JG, Fiske R, Hietala SK, 1989. *Rhodococcus equi* foal pneumonia: protective effects of immune plasma in experimentally infected foals. *Equine Vet J*, 21, 4, 249-55.
- Martens RJ, Cohen ND, Chaffin MK, Takai S, Doherty CL, Angulo AB, Edwards RF, 2002. Evaluation of 5 serologic assays to detect *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *J of the Am Vet Med Assoc*, 221, 6, 825-33.
- Mastroianni CM, Lichtner M, Vullo V, Delia S, 1994. Humoral Immune Response to *Rhodococcus equi* in AIDS Patients with *R. equi* Pneumonia. *J of Inf Dis*, 169, 5, 1179-80.
- McGowan KL, Mangano MF, 1991. Infections with *Rhodococcus equi* in children. *Diag Microbiol and Inf Dis*, 14, 4, 347-52.
- McNeil MM, Brown JM, 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 7, 3, 357-417.
- Meijer WG, Prescott JF, 2004. *Rhodococcus equi*. *Vet Res*, 35, 4, 383-96.

- Morton AC, Baseggio N, Peters MA, Browning GF, 1998. Diversity of isolates of *Rhodococcus equi* from Australian thoroughbred horse farms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 74, 1-3, 21-5.
- Mosser DM, Springer TA, Diamond MS, 1992. *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *The J of Cell Bio*, 116, 2, 511-20.
- Munoz P, Burillo A, Palomo J, Rodriguez-Creixems M, Bouza E, 1998. *Rhodococcus equi* infection in transplant recipients: case report and review of the literature. *Transp*, 65, 3, 449-53.
- Muscattello G, 2012. *Rhodococcus equi* pneumonia in the foal–Part 1: Pathogenesis and epidemiology. *The Vet J*, 192, 1, 20-6.
- Nakazawa M, Haritani M, Sugimoto C, Isayama Y, 1983. Virulence of *Rhodococcus equi* for mice. *Nihon juigaku zasshi. The Japan J of Vet Sci*, 45, 5, 679.
- Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY, 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J of Exp Med*, 158, 3, 670-89.
- Nicholson VM, Prescott JF, 1997. Restriction enzyme analysis of the virulence plasmids of VapA-positive *Rhodococcus equi* strains isolated from humans and horses. *J of Clin Microbiol*, 35, 3, 738-40.
- Nordmann P, Ronco E, Guenounou M, 1993. Involvement of interferon- γ and tumor necrosis factor- α in host defense against *Rhodococcus equi*. *J of Infect Dis*, 167, 6, 1456-9.
- Norton RE, Heuzenroeder M, Manning PA, 1996. Antigenic epitope mapping of the M24 protein of *Streptococcus pyogenes*: implications for serodiagnosis of rheumatic fever. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 16, 3-4, 267-71.
- Ocampo-Sosa AA, Lewis DA, Navas J, Quigley F, Callejo R, Scotti M, Leadon DP, Fogarty U, Vázquez-Boland JA, 2007. Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* based on traA, vapA, and vapB virulence plasmid markers. *The J of Inf Dis*, 196, 5, 763-9.
- OIE (World Organisation for Animal Health). 2019. ‘‘Principles of Veterinary Vaccine Production’’. Chapter 1.6. ‘‘Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Erişim Tarihi: 28.10.2019. Erişim Adresi, <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- Oliveira AF, Ferraz LC, Brocchi M, Roque-Barreira M-C, 2007. Oral administration of a live attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing the VapA protein induces protection against infection by *Rhodococcus equi*. *Micro and Infect*, 9, 3, 382-90.
- Ott G, Van Nest G, 2007. Development of vaccine adjuvants: a historical perspective, John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, p.
- Ozgun Y, Ikiz S, Carioglu B, Ilgaz A, Takai S, 2000. Two cases of dead foals associated with *Rhodococcus equi* pneumonia in Turkey. *J of Equi Sci*, 11, 1, 1-5.
- Ozgun Y, Ikiz S, Carioglu B, Akay Ö., Ilgaz A., Takai, S, 2002. Marmara Bölgesi’nde yarı atı yetiştirilen haralardaki taylarda *Rhodococcus equi* enfeksiyonunun ELISA ile erken tanısı üzerine çalışmalar. *Türk J Vet Anim Sci*, 26:1427-1434
- Pashine A, Valiante NM, Ulmer JB, 2005. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med*, 11, 4s, S63.
- Patton KM, McGuire TC, Fraser DG, Hines SA, 2004. *Rhodococcus equi*-infected macrophages are recognized and killed by CD8⁺ T lymphocytes in a major histocompatibility complex class I-unrestricted fashion. *Infect and Immun*, 72, 12, 7073-83.
- Patton KM, McGuire TC, Hines MT, Mealey RH, Hines SA, 2005. *Rhodococcus equi*-specific cytotoxic T lymphocytes in immune horses and development in asymptomatic foals. *Infect and Immun*, 73, 4, 2083-93.
- Pei Y, Nicholson V, Woods K, Prescott JF, 2007. Immunization by intrabronchial administration to 1-week-old foals of an unmarked double gene disruption strain of *Rhodococcus equi* strain 103+. *Vet Microbiol*, 125, 1-2, 100-10.

- Perdrizet J, Scott D, 1987. Cellulitis and subcutaneous abscesses caused by *Rhodococcus equi* infection in a foal. *J of the Am Vet Med Assoc*, 190, 12, 1559-61.
- Phumoonna T, Barton MD, Vanniasinkam T, Heuzenroeder MW, 2008. Chimeric vapA/groEL2 DNA vaccines enhance clearance of *Rhodococcus equi* in aerosol challenged C3H/He mice. *Vac*, 26, 20, 2457-65.
- Phumoonna T, 2005. Further development of vaccines and diagnostic tests for *Rhodococcus equi* infection in foals, Ph.D Thesis, Charles Sturt University, Australia.
- Phumoonna T, Muscatello G, Chicken C, Gilkerson J, Browning G, Barton M, Heuzenroeder M, 2006. Clinical Evaluation of a Peptide- ELISA based upon N- terminal B- cell Epitope of the VapA Protein for Diagnosis of *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals. *J of Vet Med, Ser B*, 53, 3, 126-32.
- Playfair J, Souza JD, 1986. Vaccination of mice against malaria with soluble antigens. I. The effect of detergent, route of injection, and adjuvant. *Par Immuno*, 8, 5, 409-14.
- Prescott J, 1981. Capsular serotypes of *Corynebacterium equi*. *Can J of Comp Med*, 45, 2, 130.
- Prescott J, 1987. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infection in horses. *Vet Microbiol*, 14, 3, 211-4.
- Prescott J, Fernandez A, Nicholson V, Patterson M, Yager J, Viel L, Perkins G, 1996. Use of a virulence- associated protein based enzyme- linked immunosorbent assay for *Rhodococcus equi* serology in horses. *EquiVet J*, 28, 5, 344-9.
- Prescott J, Lastra M, Barksdale L, 1982. Equi factors in the identification of *Corynebacterium equi* Magnusson. *J of Clin Microbiol*, 16, 5, 988-90.
- Prescott J, Patterson M, Nicholson V, Morein B, Yager J, 1997. Assessment of the immunogenic potential of *Rhodococcus equi* virulence associated protein (VapA) in mice. *Vet Microbiol*, 56, 3-4, 213-25.
- Prescott JF, 1991. *Rhodococcus-Equi* - an Animal and Human Pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 4, 1, 20-34.
- Prescott JF, 1991. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 4, 1, 20-34.
- Prescott JF, Hoffman AM, 1993. *Rhodococcus equi*. *Vet Clin of Nor Am: Equi Prac*, 9, 2, 375-84.
- Raidal SL, 1996. The incidence and consequences of failure of passive transfer of immunity on a Thoroughbred breeding farm. *Aust Vet J*, 73, 6, 201-6.
- Rappuoli R, Bagnoli F, 2011. Vaccine design: innovative approaches and novel strategies, Horizon Scic Pre.
- Ren H, Yu D, Ge B, Cook B, Xu Z, Zhang S, 2009. High-level production, solubilization and purification of synthetic human GPCR chemokine receptors CCR5, CCR3, CXCR4 and CX3CR1. *PloS one*, 4, 2, 4509.
- Ren J, Prescott JF, 2003. Analysis of virulence plasmid gene expression of intra-macrophage and in vitro grown *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *Vet Microbiol*, 94, 2, 167-82.
- Ribeiro MG, Seki I, Yasuoka K, Kakuda T, Sasaki Y, Tsubaki S, Takai S, 2005. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85-kb type I, 87-kb type I, and a new variant, 87-kb type III. *Comp Immunol Microbiol and Inf Dis*, 28, 1, 53-61.
- Roberts M, Hodgson D, Kelly W, 1980. *Corynebacterium equi* infection in an adult horse. *Aust Vet J*, 56, 2, 96-7.
- Rogosa M, Cummins C, Lelliott R, Keddle R, (1974). *Coryneform group of bacteria*, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Edited by RE Buchanan, NE Gibbons, Baltimore, Williams & Wilkins.
- Salk JE, Laurent AM, Bailey ML, 1951. Direction of research on vaccination against influenza—new studies with immunologic adjuvants. *Am J of Pub Health and the Nat Health*, 41, 6, 669-77.

- Schlesinger L, Bellinger-Kawahara C, Payne N, Horwitz M, 1990. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *The J of Immunol*, 144, 7, 2771-80.
- Sekizaki T, Takai S, Egawa Y, Ikeda T, Ito H, Tsubaki S, 1995. Sequence of the *Rhodococcus equi* gene encoding the virulence-associated 15–17-kDa antigens. *Gene*, 155, 1, 135-6.
- Singh M, O'Hagan D, 1999. Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotechnol*, 17, 11, 1075.
- Singh A, Yadav D, Rai KM, Srivastava M, Verma PC, Singh PK, Tuli R, 2012. Enhanced expression of rabies virus surface G-protein in *Escherichia coli* using SUMO fusion. *The Prot J*, 31, 1, 68-74.
- Smith B, Jang S, 1980. Isolation of *Corynebacterium equi* from a foal with an ulcerated leg wound and a pectoral abscess. *J of the Am Vet Med Ass*, 177, 7, 623-4.
- Smola J, Katerov V, Schalen C, 1994. Haemolytic and phospholipase C (PLC) activities of *Rhodococcus equi*. *J of App Bacterio*, 77, 3, 325-33.
- Sørensen HP, Mortensen KK, 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J of Biotechnol*, 115, 2, 113-28.
- Sonmez K, Gurel A, Takai S, 2011. Immunocytochemical detection of *Rhodococcus equi* in tracheal washes of foals. *J of Comp Pathol*, 145, 1, 6-11.
- Stewart-Tull DE, 1995. The theory and practical application of adjuvants, Wiley.
- Takai S, 1997. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review. *Vet Microbiol*, 56, 3-4, 167-76.
- Takai S, Anzai T, Fujita Y, Akita O, Shoda M, Tsubaki S, Wada R, 2000. Pathogenicity of *Rhodococcus equi* expressing a virulence-associated 20 kDa protein (VapB) in foals. *Vet Microbiol*, 76, 1, 71-80.
- Takai S, Fukunaga N, Kamisawa K, Imai Y, Sasaki Y, Tsubaki S, 1996. Expression of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* is regulated by temperature and pH. *Microbiol and Immunol*, 40, 8, 591-4.
- Takai S, Fukunaga N, Ochiai S, Sakai T, Sasaki Y, Tsubaki S, 1996. Isolation of virulent and intermediately virulent *Rhodococcus equi* from soil and sand on parks and yards in Japan. *J of Vet Med Sci*, 58, 7, 669-72.
- Takai S, Hines SA, Sekizaki T, Nicholson VM, Alperin DA, Osaki M, Takamatsu D, Nakamura M, Suzuki K, Ogino N, 2000. DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. *Infect and Immun*, 68, 12, 6840-7.
- Takai S, Iie M, Watanabe Y, Tsubaki S, Sekizaki T, 1992. Virulence-associated 15-to 17-kilodalton antigens in *Rhodococcus equi*: temperature-dependent expression and location of the antigens. *Infect and Immun*, 60, 7, 2995-7.
- Takai S, Kawazu S, Tsubaki S, 1986. Immunoglobulin and specific antibody responses to *Rhodococcus* (*Corynebacterium*) *equi* infection in foals as measured by enzyme-linked immunosorbent assay. *J of Clin Microbiol*, 23, 5, 943-7.
- Takai S, Kobayashi C, Murakami K, Sasaki Y, Tsubaki S, 1999. Live virulent *Rhodococcus equi*, rather than killed or avirulent, elicits protective immunity to *R. equi* infection in mice. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 24, 1, 1-9.
- Takai S, Koike K, Ohbushi S, Izumi C, Tsubaki S, 1991. Identification of 15-to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. *J of Clin Microbiol*, 29, 3, 439-43.
- Takai S, Madarame H, Matsumoto C, Inoue M, Sasaki Y, Hasegawa Y, Tsubaki S, Nakane A, 1995. Pathogenesis of *Rhodococcus equi* infection in mice: roles of virulence plasmids and granulomagenic activity of bacteria. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 11, 3, 181-90.
- Takai S, Murata N, Kudo R, Narematu N, Kakuda T, Sasaki Y, Tsubaki S, 2001. Two new variants of the *Rhodococcus equi* virulence plasmid, 90 kb type III and type IV, recovered from a foal in Japan. *Vet Microbiol*, 82, 4, 373-81.

- Takai S, Ohbushi S, Koike K, Tsubaki S, Oishi H, Kamada M, 1991. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections. *J of Clin Microbiol*, 29, 12, 2887-9.
- Takai S, Sasaki Y, Ikeda T, Uchida Y, Tsubaki S, Sekizaki T, 1994. Virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. *J of Clin Microbiol*, 32, 2, 457-60.
- Takai S, Sasaki Y, Tsubaki S, 1995. *Rhodococcus equi* infection in foals-current concepts and implication for future research. *J of Equi Sci*, 6, 4, 105-19.
- Takai S, Sekizaki T, Ozawa T, Sugawara T, Watanabe Y, Tsubaki S, 1991. Association between a large plasmid and 15-to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. *Infect and Immun*, 59, 11, 4056-60.
- Takai S, Shoda M, Sasaki Y, Tsubaki S, Fortier G, Pronost S, Rahal K, Becu T, Begg A, Browning G, 1999. Restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in *Rhodococcus equi*. *J of Clin Microbiol*, 37, 10, 3417-20.
- Takai S, Son W-G, Lee DS, Madarame H, Seki I, Yamatoda N, Kimura A, Kakuda T, Sasaki Y, Tsubaki S, 2003. *Rhodococcus equi* virulence plasmids recovered from horses and their environment in Jeju, Korea: 90-kb type II and a new variant, 90-kb type V. *J of Vet Med Sci*, 65, 12, 1313-7.
- Takai S, Takeda K, Nakano Y, Karasawa T, Furugoori J, Sasaki Y, Tsubaki S, Higuchi T, Anzai T, Wada R, 1997. Emergence of rifampin-resistant *Rhodococcus equi* in an infected foal. *J of Clin Microbiol*, 35, 7, 1904-8.
- Takasugi JE, Godwin JD, 1991. Lung abscess caused by *Rhodococcus equi*. *J of Thorac Im*, 6, 2, 72-4.
- Tan C, Prescott J, Patterson M, Nicholson V, 1995. Molecular characterization of a lipid-modified virulence-associated protein of *Rhodococcus equi* and its potential in protective immunity. *Can J of Vet Res*, 59, 1, 51.
- Taouji S, Nomura I, Giguère S, Tomomitsu S, Kakuda T, Ganne V, Takai S, 2004. Immunogenicity of synthetic peptides representing linear B-cell epitopes of VapA of *Rhodococcus equi*. *Vac*, 22, 9-10, 1114-23.
- Tel O, Arserim N, Keskin O, 2011. Seroepidemiological survey of *Rhodococcus equi* infection in asymptomatic horses and donkeys from southeast Turkey. *Journal of the South African Vet Ass*, 82, 4, 224-6.
- Temimhan MS, 2018. Atlarda *Rhodococcus equi*'nin serolojik teşhisi için R. equi Vapa proteininden ELISA kiti geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Temizkan G, Arda N, 2004. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Protein İzolasyonu, Analizi ve Saflaştırılması, 224-5.
- Tindall BJ, 2014. The correct name of the taxon that contains the type strain of *Rhodococcus equi*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64, Pt 1, 302-8.
- Tkachuk-Saad O, Lusi P, Welsh RD, Prescott JF, 1998. *Rhodococcus equi* infections in goats. *Vet Rec*, 143, 11, 311-2.
- Tripathi NK, Shrivastva A, Biswal KC, Rao PL, 2009. METHODS: Optimization of culture medium for production of recombinant dengue protein in *Escherichia coli*. *Ind Biotechn*, 5, 3, 179-83.
- Van der Geize R, Grommen A, Hessels G, Jacobs A, Dijkhuizen L, 2011. The steroid catabolic pathway of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* is important for pathogenesis and a target for vaccine development. *PLoS Pathogens*, 7, 8, e1002181.
- Vanniasinkam T, 2001. The diagnosis and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals.
- Vanniasinkam T, Barton MD, Heuzenroeder MW, 2005. Immune response to vaccines based upon the VapA protein of the horse pathogen, *Rhodococcus equi*, in a murine model. *Int J of Medl Microbiol*, 294, 7, 437-45.

- Vannuffel P, Gilot P, Limbourg B, Naerhuyzen B, Dieterich C, Coene M, Machtelinckx L, Cocito C, 1994. Development of species-specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in cattle. *J of Clin Microbiol*, 32, 5, 1211-6.
- Vázquez-Boland JA, Giguère S, Hapeshi A, MacArthur I, Anastasi E, Valero-Rello A, 2013. *Rhodococcus equi*: the many facets of a pathogenic actinomycete. *Vet Microbiol*, 167, 1-2, 9-33.
- Vázquez-Boland JA, Meijer WG, 2019. The pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*: What's in a name? *Mol Microbiol*.
- von Barga K, Scraba M, Krämer I, Ketterer M, Nehls C, Krokowski S, Repnik U, Wittlich M, Maaser A, Zapka P, 2019. Virulence-associated protein A from *Rhodococcus equi* is an intercompartmental pH-neutralising virulence factor. *Cell Microbiol*, 21, 1, e12958.
- Waghmare A, Deopurkar R, Salvi N, Khadilkar M, Kalolikar M, Gade S, 2009. Comparison of Montanide adjuvants, IMS 3012 (Nanoparticle), ISA 206 and ISA 35 (Emulsion based) alongwith incomplete Freund's adjuvant for hyperimmunization of equines used for production of polyvalent snake antivenom. *Vac*, 27, 7, 1067-72.
- Walsh RD, Cunha BA, 1994. *Rhodococcus equi*: fatal pneumonia in a patient without AIDS. *Heart & lung: The J of Critical Care*, 23, 6, 519-20.
- Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Coonan KM, Charoenvit Y, Jones TR, Hobart P, Margalith M, Ng J, 1998. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Sci*, 282, 5388, 476-80.
- Weinstock DM, Brown AE, 2002. *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. *Clinic Inf Dis*, 34, 10, 1379-85.
- Witkowski L, Kaba J, Rzewuska M, Nowicki M, Szaluś-Jordanow O, Kita J, 2012. Development of ELISA test for determination of the level of antibodies against *Rhodococcus equi* in equine serum and colostrum. *Vet Immunol and Immunopathol*, 149, 3-4, 280-5.
- Woolcock J, Mutimer M, Farmer AT, 1980. Epidemiology of *Corynebacterium equi* in horses. *Res in Vet Sci*, 28, 1, 87-90.
- Yager J, Duder C, Prescott J, Zink MC, 1987. The interaction of *Rhodococcus equi* and foal neutrophils in vitro. *Vet Microbiol*, 14, 3, 287-94.
- Yager J, Foster S, Zink MC, Prescott J, Lumsden J, 1986. In vitro bactericidal efficacy of equine polymorphonuclear leukocytes against *Corynebacterium equi*. *Am J of Vet Res*, 47, 2, 438-40.
- Yager J, Prescott C, Kramar D, Hannah H, Balson G, Croy B, 1991. The effect of experimental infection with *Rhodococcus equi* on immunodeficient mice. *Vet microbiol*, 28, 4, 363-76.
- Yamshchikov AV, Schuetz A, Lyon GM, 2010. *Rhodococcus equi* infection. *The Lancet Inf diseases*, 10, 5, 350-9.
- Zakrzewska-Czerwinska J, Mordarski M, Goodfellow M, 1988. DNA base composition and homology values in the classification of some *Rhodococcus* species. *J Gen Microbiol*, 134, 10, 2807-13.
- Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao C-X, Mitter N, Yu C, Middelberg AP, 2014. Nanoparticle vaccines. *Vac*, 32, 3, 327-37.
- Zink MC, Johnson J, Prescott J, Pascoe P, 1982. The interaction of *Corynebacterium equi* and equine alveolar macrophages in vitro. *J of Reproduct and Fert. Supplement*, 32, 491-6.
- Zink MC, Yager J, Prescott J, Fernando M, 1987. Electron microscopic investigation of intracellular events after ingestion of *Rhodococcus equi* by foal alveolar macrophages. *Vet Microbiol*, 14, 3, 295-305.
- Zink MC, Yager J, Prescott J, Wilkie B, 1985. In vitro phagocytosis and killing of *Corynebacterium equi* by alveolar macrophages of foals. *Am J of Vet Res*, 46, 10, 2171-4.
- Zink MC, Yager JA, Smart NL, 1986. *Corynebacterium equi* infections in horses, 1958-1984: a review of 131 cases. *The Can Vet J*, 27, 5, 213.

7. EKLER

EK-A: Etik Kurul Kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ DENEYSEL TIP UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

Karar Sayısı: 2018- 44	Toplantı Tarihi: 28.12.2018
Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Osman ERGANIŞ ve Araş. Gör. Gökçenur Sanioglu Göl en tarafından sunulan "Rhodoccus Equi Vap A Geninin Aktarımı ve Vap A Proteinin Safılaştırılması" başlıklı doktora tezi projesi kurul tarafından değerlendirildi. Projede belirtilen anestezi k maddenin (Ketasol 20 mg/kg, Xylazine 10 mg/kg) kullanılması uygun görülmüştür. Projede belirtilen ve istatistiksel olarak en güvenilir sonuç elde edilebilecek asgari sayıda kullanılacak olan (60 adet fare) hayvan sayısı uygun görülmüştür. Projenin hayvan deneylerine ilişkin yönlerinin Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesinde belirtilen "Etik Kurallar" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir. Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesinde yer alan kurallar ve belirtilen "Hayvan Deneyleri ile İlgili Etik İlkeler" saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında "Etik Kurul Yönergesi İlkelerine uyulduğuna", çalışmanın deneysel kısmını yapacak çalışmacının "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikasına" sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "uygun" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.	

Doç. Dr. İlhan ÇİFTÇİ
Başkan (Katıldı)

Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK
Başkan v. (Katıldı)

Prof. Dr. Banu BOZKURT
Üye (Katıldı)

Prof. Dr. Sibel YILDIRIM
Üye (Katıldı)

Prof. Dr. Kamil ÜNEY
Üye (Katıldı)

Doç. Dr. Güler YAVAŞ
Üye (Katıldı)

Doç. Dr. Zafer SAYIN
Üye (Katıldı)

Doç. Dr. İlhan ECE
Üye (Katıldı)

Dr. Öğr. Üyesi Fatih KARA
Üye (Katılmadı)

Dr. Öğr. Üyesi Nejat ÜNLÜKAL
Üye (Katıldı)

Vet. Hekim S. Melin GÖKYAPRAK
Üye (Katıldı)

Burhan YILMAZ
Üye (Katıldı)

İlhan ALDORA
Üye (Katıldı)

EK-B: Tezden üretilmiş yayın

2nd INTERNATIONAL
CONGRESS OF VETERINARY MICROBIOLOGY

16-19 OCTOBER 2018
KONYA, TURKEY

11:20 - 11:30 Tea - Coffee Break

IV. SESSION
Chairs: Prof. Dr. Hakan Yardımcı

11:30 - 12:30 VACCINE R & D AND PRODUCTION IN TURKEY
Özgen Ergüder

12:30 - 12:30

12:30 - 12:30

12:30 - 13:50 Lunch

V. SESSION
Chairs: Prof. Dr. Hülya Türoğlu - Prof. Dr. Şükri Kırkan

13:50 - 14:10 ANTHRAX IN DOMESTIC ANIMALS AND STRUGGLE STUDIES ON ANTHRAX IN KARS REGION
Mehmet Sahin

14:10 - 14:20 INVESTIGATION OF BACTERIAL ZOONOTIC AGENTS IN TICKS COLLECTED FROM STRAY DOGS IN ANKARA BY MOLECULAR METHODS
Bekir Celbis | Mesut Sezer

14:20 - 14:30 INVESTIGATION AND SEQUENCE ANALYSIS OF AVIAN POLYOMAVIRUS AND BEAK AND FEATHER DISEASE VIRUS FROM PSITTACINE BIRDS IN ERZURUM, TURKEY
Mehmet Cemal Adigüzel | Mehmet Ökan Timurkan | Seyda Cengiz

14:30 - 14:40 CHARACTERIZATION OF FECAL ENTEROCOCCI FROM WILD BIRDS
Bekir Dören Süzer | Baran Çelik | Barış Halaç | Beren Başaran Kahraman | A. Funda Bağcıgil | Seray Ak

14:40 - 14:50 MOLECULAR CHARACTERIZATION OF COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM MASTITIS COW MILKS AND DETECTION OF VIRULENCE GENE
Beyza Uzun | Hasan Hüseyin Haldun

14:50 - 15:00 INVESTIGATION OF UDDER HEALTH AND MILK QUALITY PARAMETERS DURING POSTPARTUM PERIOD OF DAMASCUS GOATS IN NORTHERN CYPRUS
Huban Gökmen | İshendiyar Darbaz | Osman Ergene | Selim Aslan

15:00 - 15:10 Tea - Coffee Break

VI. SESSION
Chairs: Prof. Dr. Seyyal Ak - Prof. Dr. Aylin Şen

15:10 - 15:40 PRODUCTION AND APPLICATION OF THE DRY COAGULATING SERUM FOR COAGULATION COMPLEX FIXATION TEST
Ertan Kasıymov

15:40 - 15:50 EFFECTS OF DIFFERENT MEDIA FORMULATIONS OF PRODUCTION OF RECOMBINANT VAP A PROTEIN IN ESCHERICHIA COLI
Gökçenur Sanioglu Gökten | Osman Ergüder | Ahi Sakmanoglu

15:50 - 16:00 PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF LISTONELLA ANGUILLARUM ISOLATES FROM RAINBOW TROUT
Ertan Emek Otuş | Soner Altun | Muhammed Duman | İzzet Burçin Satoğlu | Hamit Kaan Müşak

16:00 - 16:10 ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF ENTEROCOCCUS FAECIUM ISOLATED FROM URINARY SYSTEM OF DOGS
Sakir Arkan | Uğur Pinar | Melike Juha Yılmaz | Gamze GÜLTEKİN

16:10 - 16:20 DETERMINATION OF VIRULENCE CHARACTERISTICS AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF E. COLI STRAIN ISOLATED FROM CALF DIARRHEA
Seyda Cengiz | Mehmet Cemal Adigüzel

16:20 - 16:30 A NEW QUANTITATIVE METHOD DEVELOPED FOR BACTERIAL ANTIBIOTYPING
Aliye Çelbi

16:30 - 16:40 Tea - Coffee Break

VII. SESSION
Chairs: Prof. Dr. Ahmet Kırpalı Akar - Prof. Dr. Nuri Turan

16:40 - 17:50 THE APPLICATION OF NHEJ-CRISPR/CAS9 AND CRE-LOX SYSTEM IN THE GENERATION OF BIVALENT DUCK ENTERITIS VIRUS VACCINE AGAINST AVIAN INFLUENZA VIRUS
Mune Işık

17:50 - 18:10 Tea - Coffee Break

2nd INTERNATIONAL CONGRESS OF VETERINARY MICROBIOLOGY		16-19 OCTOBER 2018 KONYA, TURKEY
42		
Abstract ID: 121 Topic: GENETICS ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY		
EFFECTS OF DIFFERENT MEDIA FORMULATIONS OF PRODUCTION OF RECOMBINANT VAP A PROTEIN IN ESCHERICHIA COLI.		
GÖKÇENUR SANIOĞLU GÖKTEN, ÖSMAN ERGÜDER, AHI SAKMANOĞLU		
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY, FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, UNIVERSITY OF ANKARA ANKARA 06100, TURKEY DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY, FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, UNIVERSITY OF SİĞIRCI, KONYA 46100, TURKEY		
Abstract: Aim: <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) is one of the most widely used competent cell for the production of recombinant proteins both for research and commercial purposes. The reason for this is that many different vector systems are readily available, the organism is mesophilic and it grows easily, rapidly. The goal for optimizing production of recombinant proteins is to produce the highest amount of product. Despite of all these advantages, little is known about the effect of media composition on the expression of recombinant proteins. The aim of this study was to examine the effectiveness of recombinant protein expression by <i>E. coli</i> in different media composition. Method: After <i>E. coli</i> Vap A gene was cloned into pET-20b vector (Novagen), the vector was transformed into <i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Novagen). The Vap A gene was detected by PCR technique and DNA sequencing analysis results showed similarity to 99.4% of the genes in the databases. The recombinant <i>E. coli</i> strain was inoculated with a single colony into 2 ml of Luria-Bertani (LB) broth. The overnight culture was used to inoculate 2 ml of each of the five media: Luria-Bertani (LB) medium, Tryptic Broth (TB) medium, 2YT medium, Super Broth (SB), and TY medium. Results: TY medium was the best effective producer media among the tested media. Quantity of the Vap A protein was 5.2 mg/L of culture. TY medium found in this study could be recommended to yield higher recombinant protein.		
Keywords: Vap A, protein expression, <i>Escherichia coli</i> , recombinant protein		

EK-C:



Ek 1.1. LB, TB, 2YT, SB ve TY besiyerleri



Ek 2.1: Aşılama çalışmasında kullanılan aşılar



Ek 2.2. Elektroforez tankı



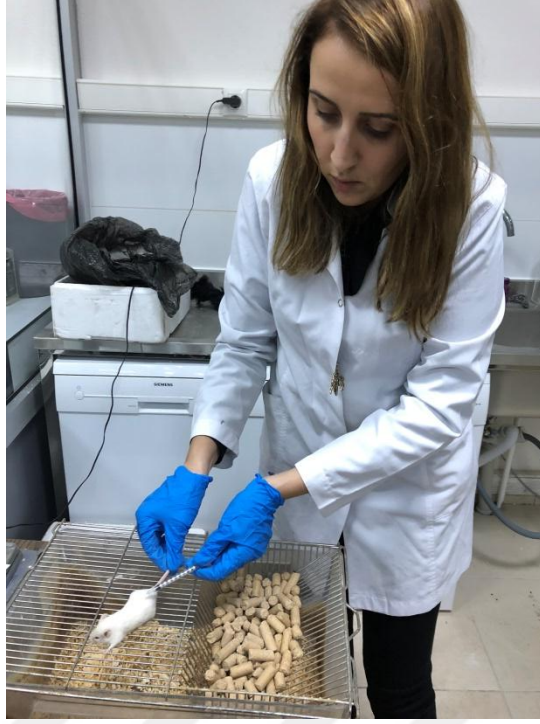
Ek 2.3. SDS- Page sistemi görünümü



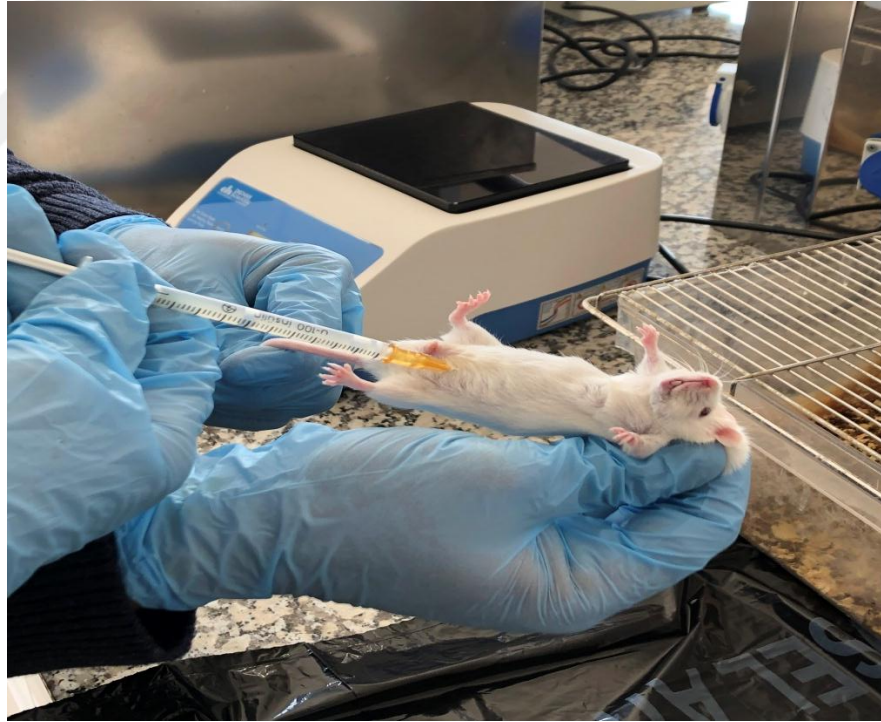
Ek 2.4. BL21(DE3) hücrelerinin buz üzerinde çözülmesi



Ek 2.5. Ultra filtrasyon sistemi



Ek 2.6. Farelere aşı uygulaması



Ek 2.7. Farelere itraperitonal *R. equi* uygulaması



Ek 2.8. ELISA testi uygulaması



Ek 2.9. ELISA okuyucu

8. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Ankara’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Konya’da tamamladı. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 2013 yılında mezun oldu. 2014 yılında S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalında doktora öğrenimine başladı. 2014 yılında Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak atandı. Halen görevine devam etmektedir.

