



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***CLOSTRIDIUM TETANI* TOKSOİDİNE KARŞI TAVUK
YUMURTASINDAN İMMUNOGLOBULİN-Y (IgY)
ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE SEROLOJİK
OLARAK SPESİFİKLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Kürşat TETİK

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU

ANKARA

2023

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***CLOSTRIDIUM TETANI* TOKSOİDİNE KARŞI TAVUK
YUMURTASINDAN İMMUNOGLOBULİN-Y (IgY)
ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE SEROLOJİK
OLARAK SPESİFİKLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Kürşat TETİK

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU

**Bu araştırma T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI, Tarımsal Araştırmalar ve
Politikalar Genel Müdürlüğü'nün TAGEM/HAYSÜD/Ü/22/A4/P46175 proje numarası
ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Clostridium tetani* Toksoidine Karşı Tavuk Yumurtasından İmmunoglobulin-Y (IgY) Üretimi, Saflaştırılması ve Serolojik Olarak Spesifikliğinin Belirlenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Kürşat TETİK

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalında

Kürşat TETİK tarafından hazırlanan

“*Clostridium tetani* Toksoidine Karşı Tavuk Yumurtasından İmmunoglobulin-Y (IgY)
Üretimi, Saflaştırılması ve Serolojik Olarak Spesifikliğin Belirlenmesi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY
ÇOKLUĞU ile kabul/reddedilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Raportör

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

***Clostridium tetani* Toksoidine Karşı Tavuk Yumurtasından Immunoglobulin-Y (IgY) Üretimi, Saflaştırılması ve Serolojik Olarak Spesifikliğin Belirlenmesi**

Tetanoz, *Clostridium tetani* tarafından üretilen tetanospazmin (TeNT) nörotoksininin neden olduğu, insanlar ve birçok hayvan türü için yaşamı tehdit eden bakteriyel bir hastalıktır. Hastalığın teşhisi ve tedavisinde farede üretilen, kullanımının homojenlik ve özgüllük gibi çeşitli avantajları olan monoklonal antikorlar kullanılır. Buna karşılık, poliklonal antikorların, özellikle kümes hayvanlarından ekstrakte edilen IgY'nin dikkate değer bir özelliği, memeli (IgG) antikorlarından daha fazla miktarda elde edilmesidir. Bu tez çalışmasında, Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü bünyesinde 2015 yılından beri ıslah çalışmaları yürütülen ve 2020 yılında T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından ırk tescili yapılan 'Anadolu-T' ırkı etçi tavukların saf hatları kullanılmıştır. Tesadüfi olarak seçilen 22 haftalık yaştaki tavuklar, *C. tetani* toksoidi + adjuvant (FCA/FIA) ile göğüs kasından enjeksiyon yolu ile immunize edildi ve 4 hafta aralıklarla iki hatırlatma enjeksiyonu yapılarak immunizasyon işlemi tamamlandı. Aşılama öncesinde ve 14 gün sonrasında aşılanan hayvanların kanat venlerinden kan alındı ve total antikor titreleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. Son bağışıklamadan 14 gün sonra alınan kan örneklerinin serumlarında total antikor titreleri en yüksek seviyeye ulaştığı görüldü. İmmunize edilen ve edilmeyen tavukların yumurtalarından non-invaziv şekilde PEG (6000) ekstraksiyon protokolü kullanılarak IgY antikorları izole edildi. Saflaştırılmış anti-*C. tetani* IgY antikorlarının moleküler ağırlığı SDS-PAGE analizi ile belirlenerek jel üzerinde uygun ve beklenen konumda görüntüldü. Ardından western blot analizi sonucunda elde edilen görüntüler, izole edilen IgY antikorlarının varlığını doğruladı. Varlığı doğrulanan IgY antikorların anti-*C. tetani* IgY olduklarını ispatlayabilmek için agar jel immunodifüzyon (AGID) ve çabuk lam aglütinasyon testi yapıldı. AGID test sonucunda izole edilen *C. tetani* spesifik IgY'ler ile tetanoz toksoidi arasında oluşan presipitat görüntüsü ve çabuk lam aglütinasyon testinde tipik kümeleşmelerin oluşumu, elde edilen yumurta sarısı antikorlarının *C. tetani* toksoidine spesifik olarak üretildiğini serolojik olarak belirlemiş oldu.

Anahtar Sözcükler: AGID, *Clostridium tetani*, IgY, Polietilen Glikol Çökeltme, Yumurta Sarısı Antikorları

SUMMARY

Production, Purification and Serological Determination of Immunoglobulin-Y (Igy) from Chicken Eggs Against *Clostridium tetani* Toxoid

Tetanus is a bacterial disease caused by the tetanospasmin (TeNT) neurotoxin produced by *Clostridium tetani*, which is life-threatening for humans and many animal species. It uses monoclonal antibodies produced in the mouse for the diagnosis and treatment of the disease, the use of which has several advantages, such as homogeneity and specificity. In contrast, a remarkable feature of polyclonal antibodies, especially IgY extracted from poultry, is that they are obtained in greater quantities than mammalian (IgG) antibodies. In this thesis study, breeding studies have been carried out within the Transitional Zone Agricultural Research Institute since 2015 and in 2020, pure lines of 'Anatolian-T' breed broiler chickens, breed registered by the Republic of Türkiye Ministry of Agriculture and Forestry, were used. Randomly selected chickens at the age of 22 weeks, *C. tetani* toxoid + adjuvant (FCA/FIA) was immunized by injection from the chest muscle and two reminder injections were given at intervals of 4 weeks and the immunization process was completed. Blood was taken from the wing veins of vaccinated animals before and 14 days after vaccination, and total antibody titers were measured by the ELISA method. It was observed that total antibody titers in the serum of blood samples taken 14 days after the last vaccination reached the highest level. IgY antibodies were isolated from the eggs of immunized and nonimmunized chickens non-invasively using the PEG (6000) extraction protocol. Purified anti-*C. tetani* molecular weight was determined by SDS-PAGE analysis and displayed in the appropriate and expected position on the gel. Then, the images obtained as a result of western blot analysis confirmed the presence of IgY antibodies. Agar gel immunodiffusion (AGID) and rapid slide agglutination test were performed to prove that the confirmed IgY antibodies were anti-*C. tetani* IgY. The precipitation lines were formed between isolated *C. tetani*-specific IgYs and tetanus toxoid as a result of the AGID test, and the formation of typical aggregation in the quick slide agglutination test, serologically determined that the egg yolk antibodies obtained were produced specifically for *C. tetani* toxoid.

Keywords: AGID, *Clostridium tetani*, Egg Yolk Antibodies, IgY, Polyethylene Glycol Precipitation

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xivi
Çizelgeler	xvi
1.GİRİŞ	1
1.1. <i>Clostridium</i>	3
1.2. <i>Clostridium tetani</i>	5
1.2.1. Tarihçesi	5
1.2.2. Etiyolojik Özellikleri	5
1.2.3. Epidemiyolojisi	7
1.2.4. <i>C. tetani</i> toksinleri	10
1.2.5. Patogenezi	11
1.2.6. Klinik Bulgular	13
1.2.7. Teşhis	15
1.2.8. Profilaksi, Tedavi ve Kontrol	16
1.2.9. Pasif Bağışıklık	17
1.3. IgY Teknolojisi	20
1.3.1. Tarihi	20
1.3.2. IgY Antikorumun Avantajları	21
1.3.3. IgY Antikorumun Özellikleri	23
1.3.3.1. Yapısı	23
1.3.3.2. Stabilitesi	25
1.3.3.3. Etki Mekanizması	28
1.3.4. IgY Üretimi	28
1.3.5. IgY'nin Terapötik ve Profilaktik Uygulamaları	32
2.GEREÇ ve YÖNTEM	36
2.1. Gereç	36
2.1.1. Deney Hayvanı ve İlgili Materyal	36
2.1.2. İmmünizasyon	36
2.1.3. Kullanılan Cihazlar, Kimyasal Malzemeler ve Kitler	36
2.2. Yöntem	38
2.2.1. Deney Hayvanları	38
2.2.2. İmmünizasyon	40
2.2.3. ELISA ile Total Antikor Titrasyonu	42
2.2.4. İmmünoglobülin Y (IgY) İzolasyonu	44
2.2.5. Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması	47
2.2.6. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroferez (SDS-PAGE)	49
2.2.7. Western Blot	50
2.2.8. Agar Jel İmmunodifüzyon Testi (AGID)	52
2.2.9. Çabuk Lam Aglutinasyon Testi	64

3. BULGULAR	55
3.1. Kan Serumunda İmmunizasyon Bulguları	55
3.2. Toplanan Yumurta Miktarı	58
3.3. İzole Edilen Anti- <i>C.tetani</i> IgY'nin Protein Konsantrasyonu	59
3.4. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Bulguları	60
3.5. Western Blot Analizine İlişkin Bulgular	61
3.6. Agar Jel İmmunodifüzyon Testi (AGID) Bulguları	63
3.7. Çabuk Lam Aglütinasyon Testi Bulguları	78
4.TARTIŞMA	68
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR	74
EKLER	87
Ek-1. Yerel Etik Kurulu'nun 05.06.2021 Tarih ve 843 Sayılı Kararı	87
Ek-2. Yerel Etik Kurulu'nun 07.03.2023 Tarih ve 843-1 Sayılı Kararı	88
Ek-3. Toksoid Olarak Kullanılan 'Cloteid 4 inj' Ticari Tetanoz Aşısının Prospektüsü	89
ÖZGEÇMİŞ	91

ÖNSÖZ

Tetanoz, *Clostridium tetani* toksininin neden olduğu, merkezi sinir sisteminin **akut ve bazen ölümcül** bir hastalığıdır. Hastalığının tedavisinde çoğunlukla atlardan ve insanlardan elde edilen antitoksinler uygulanmaktadır. Fakat bu antitoksinlerin kullanılmasında birtakım klinik yan etkiler ve dezavantajların olduğu bildirilmektedir. Tetanoz hastalığının teşhisinde kullanılan mevcut teknikler, farede üretilen monoklonal antikorları kullanmaktadır. Bu antikorların kullanımının homojenlik ve özgüllük gibi çeşitli avantajları bulunmaktadır. Buna karşılık poliklonal antikorların, özellikle kümes hayvanlarından ekstrakte edilen yumurta sarısı antikorlarının (IgY) dikkate değer bir özelliği, memeli antikorlarından (IgG) daha fazla miktarda elde edilebilmesidir. Antikorlar, vücuda yayılabilen toksik veya antijenik moleküller gibi yabancı maddelere bağlanma ve inaktive etme konusunda benzersiz yapıdaki moleküllerdir. Yumurta sarısı, benzersiz olan bu moleküller için alternatif bir kaynak oluşturur ve üretkenlik, hayvan refahı ve özgüllük açısından memeli antikorlarına kıyasla birtakım avantajlar sunar. Tavuk kanında bulunan ana immünoglobulin, yavrularına aktarılmak üzere yumurta sarısında birikir. Bu da yüksek miktarda antikorun invaziv olmayan bir şekilde toplanmasını sağlar. Bu çalışmada, Anadolu-T Irkı saf hatlarından tesadüfi seçilen tavuklar, ticari olarak temin edilen tetanoz toksoidi ile immunize edildi. Tetanoz toksoidine karşı oluşan tavuk antikorları, yumurta sarısından izole edilerek spesifikliği serolojik olarak gösterildi. Bu tez çalışmasının neticesinde IgY teknolojisi kullanılarak yüksek titrelere sahip, hayvan dostu, maliyet etkin, **patojenlerle savaşmak için mevcut cephaneliği genişleten**, spesifik IgY antikorlarının kullanılabilmesi ortaya konmuştur. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçların gelecekte immünoterapi, teşhis ve IgY araştırmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

“*Clostridium tetani* Toksoidine Karşı Tavuk Yumurtasından İmmunoglobulin-Y (IgY) Üretimi, Saflaştırılması ve Serolojik Olarak Spesifikliğinin Belirlenmesi” konulu tez çalışmamın seçiminde, yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında, doktora eğitimim boyunca fikirlerini, emeğini ve desteğini her zaman üstümde hissettiren çok değerli danışmanım ve hocam sayın Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU’na, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hakan YARDIMCI’ya ve Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet AKAN’na, Doç. Dr. Kaan MÜŞTAK’a ve Doç. Dr. İnci Başak MÜŞTAK’a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan mesleki deneyimlerini ve çok değerli bilgilerini benimle paylaşan meslektaşım Veteriner Hekim İsmail ÖZKAN başta olmak üzere Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Etçi Tavuk Yetiştirme ve Islahı Bölümü ile

Biyoteknoloji ve Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında çalışan tüm mesai arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Son ama en önemlisi bu süreçte bana her zaman destek veren hayat arkadaşım sevgili eşim Hatice Şule ÇOBAN TETİK'e, varlığı ile hayatımıza anlam katan canım oğlum Atlas TETİK'e, hayatım boyunca maddi manevi desteklerini benden esirgemeyen beni yetiştirip bu günlere gelmemi sağlayan çok değerli babam İsa TETİK'e ve annem Nejla TETİK'e, bana her zaman inanan ve destekleyen ablam Dilara TETİK'e sonsuz teşekkürler. İyi ki varsınız.



SİMGELER ve KISALTMALAR

α	Alfa
A ₁	1. Ana hattı
A ₂	2. Ana hattı
A ₃	3. Ana hattı
Ab	Antikor
Abs	Spesifik antikor
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AGID	Agar Jel İmmunodifüzyon
β	Beta
B ₁	1. Baba hattı
B ₂	2. Baba hattı
BSA	Sığır Serum Albumini
°C	Santigrat derece
C ₁₂	Lavrik asit
C ₁₄	Miristik asit
C ₁₆	Palmitik asit
C ₁₈	Stearik asit
CDS	Centers for Disease Control and Prevention
CH	Ağır zincir sabit bölgesi
CL	Hafif zincir sabit bölgesi
CO ₂	Karbondioksit
d	Deney

dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECVAM	Avrupa Alternatif Yöntemleri Doğrulama Merkezi
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ETEC	Enterotoksik <i>Escherichia coli</i>
Fab	Antijen bağlanma bölgesi
Fc	Komplement bağlanma bölgesi
FC	Akış sitometrisi
FCA	Freund'un tam adjuvantı
FCI	Freund'un tamamlanmamış adjuvantı
γ	Gama
g	Gram
GABA	Gama aminobütirik asit
HAMA	İnsan anti fare antikoru
HC	Reseptör bağlanma alanı
HN	Translokasyon alanı
HRV	İnsan rota virüsü
H5N1	Kuş gribi A virüsü
IBDV	Enfeksiyöz bursal hastalık virüsü
IC	İmmünohistokimya
IFN- γ	İnterferon gama
Ig	İmmunoglobulin
IgA	İmmunoglobulin Alfa
IgD	İmmunoglobulin Delta
IgE	İmmunoglobulin Epsilon

IgM	İmmunoglobulin Mu
IgY	İmmunoglobulin Upsilon
IHC	İmmünohistokimya
IL-2	İnterlökin-2
IU	Uluslararası birim
İm	Kas içi
kDa	Kilodalton
LC	Hafif zincir
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
M.Ö.	Milattan önce
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
N	Azot
NaCl	Sodyum klorür
NaN ₃	Sodyum azid
NDV	Newcastle disease virtüsü
ng	Nanogram
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
pAb	Birincil antikor
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	Polietilen glikol
pH	Potansiyel hidrojen
pI	İzoelektirik noktası

qPCR	Kantitatif (Gerçek Zamanlı) Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R ²	Belirleme katsayısı
RT-PCR	Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sAb	İkincil antikor
SDS-PAGE	Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TeNT	Tetanospasmin
υ	Upsilon
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
V	Hacim
VH	Ağır zincir değişken bölge
VL	Hafif zincir değişken bölge
WHO	World Health Organisation
%	Yüzde
+	Artı
>	Büyüktür
≥	Büyük eşit
<	Küçüktür

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Tent Yapısı ve Etki Mekanizmasının Şematik Olarak Anlatımı	11
Şekil 1.2. Pasif Bağışıklamanın Temel Prensipleri	18
Şekil 1.3. IgY'nin Avantajları	22
Şekil 1.4. IgG ve IgY'nin Moleküler Yapıları	24
Şekil 1.5. Yumurta Sarısı Antikorunun Üretimi ve Pazar Durumunun Şematik Anlatımı	30
Şekil 1.6. PEG 6000 Çökeltme Yoluyla IgY Ekstraksiyonunun Şematik Diyagramı	31
Şekil 2.1. Deney Hayvanlarının Bireysel Kafesler İçerisinde Kümes Yerleşimi	39
Şekil 2.2. Deney Hayvanlarının Bireysel Kafesler İçerisinde Kümes Yerleşimi-2	40
Şekil 2.3. İmmünizasyon Öncesi Kan Alma ve İmmünizasyon İşlemi	42
Şekil 2.4. IgY İzolasyon İşlemine Kadar +4°C'de Depolanan Yumurtalar	42
Şekil 2.5. ELISA Çalışmaları	43
Şekil 2.6. ELISA Testinin Değerlendirilmesi	44
Şekil 2.7. PEG 6000 Lipidlerin Uzaklaştırılması	46
Şekil 2.8. PEG 6000 Birinci Adımın Süpernatantından Toplam IgY'nin Çökeltilmesi	47
Şekil 2.9. Bradford Sıvısı Solüsyon İçindeki Protein (BSA) Miktarına Göre Renk Değişimi ve Absorbans Okuması	48
Şekil 2.10. Bradford Protein Standart Eğrisi	48
Şekil 2.11. SDS-PAGE Analizinde Kullanılan Molekül Ağırlık Belirleyicisi	49
Şekil 2.12. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) Analizi	50
Şekil 2.13. Geleneksel Western Blot Protokolü	51
Şekil 2.14. Western Blot Çalışmaları	52
Şekil 2.15. AGID Çalışmaları	53
Şekil 3.1. ELISA Testi Regrasyon Denklemi ile Hesaplama Sonuçları	55
Şekil 3.2. İmmünizasyon Öncesi ve 1. Bağışıklama Sonrası Alınan Kan Serumlarının ELISA Sonuçları	55
Şekil 3.3. İkinci İmmünizasyon Öncesi ve 2. Bağışıklama Sonrası Alınan Kan Serumlarının ELISA Sonuçları	56
Şekil 3.4. Son İmmünizasyon Öncesi ve Son Bağışıklama Sonrası Alınan Kan Serumlarının ELISA Sonuçları	57
Şekil 3.5. İmmünizasyon Sonrası Total Antikor Titrelelerindeki Değişim	57
Şekil 3.6. İki Aylık Sürede Toplanan Bireysel Yumurta Sayısı	58
Şekil 3.7. SDS-PAGE Pozitif Jel Görüntüsü	60
Şekil 3.8. SDS-PAGE Negatif Jel Görüntüsü	61
Şekil 3.9. Western Blot Kemilüminesans Pozitif Görüntüsü	62
Şekil 3.10. Western Blot Kemilüminesans Negatif Görüntüsü	62

Şekil 3.11. Western Blot Analizi ImagER Eyes Programı ile Doğrulan IgY Antikorlarının Üç Boyutlu (3D) Görüntüsü	63
Şekil 3.12. AGID Testi 1. Petri Presipitasyon Görüntüsü	64
Şekil 3.13. AGID Testi 2. Petri Presipitasyon Görüntüsü	65
Şekil 3.14. AGID Testi 3. Petri Presipitasyon Görüntüsü	65
Şekil 3.15. AGID Testi 4. Petri Presipitasyon Görüntüsü	66
Şekil 3.16. Çabuk Lam Aglütinasyon Görüntüsü	67



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Canlı Türlerinin Tent Duyarlılığı	8
Çizelge 1.2. Tetanozun Klinik Bulguları	14
Çizelge 1.3. Tetanoz Tedavisinde Kullanılan Uygulamalar	17
Çizelge 1.4. ABD'de Hayvan Sağlığı Amacıyla Üretilmiş Lisanslı Poliklonal Antikorlar	19
Çizelge 1.5. IgG'ye Kıyasla IgY'nin Özellikleri	25
Çizelge 2.1. Kullanılan Cihazlar	37
Çizelge 2.2. Çalışmada Kullanılan Tavuk Gruplarının Dağılımı	38
Çizelge 2.3. İmmünizasyon İşlemi	41
Çizelge 2.4. PEG 6000 Ekstraksiyon Örnek Uygulama Tablosu	45
Çizelge 2.5. 10 µl'lik Örnek İçin Üreticinin Tavsiye Ettiği Solüsyon Miktarları	49
Çizelge 3.1. Bireysel olarak İzole Edilen IgY Antikorlarına Ait Bradford Testi Sonuçları	59
Çizelge 3.2. Bireysel olarak İzole Edilen IgY Antikorlarına Ait Bradford Testi Sonuçları	59

1. GİRİŞ

Tetanoz, *Clostridium tetani* tarafından üretilen **tetanospazmin (TeNT) nörotoksininin neden olduğu**, insanlar ve hayvanlar için yaşamı tehdit eden bir hastalıktır. Bu Gram-pozitif mikroorganizmanın sporları, coğrafi konumdan bağımsız olarak toprakta, kirli sularda ve hayvan dışkıında doğal olarak bulunur (Orellana vd., 2020). Isıya ve birçok antiseptik maddeye karşı dirençli olan sporlar, çevrede yıllarca canlı kalabilirler. Organizmaya açık bir yaradan giren *C. tetani* sporları, uygun anaerobik koşullar altında vejetatif forma geçerler (Demain vd., 2007). Açık yarada çoğalan bakteriler tetanoz nörotoksini üretir. Bu nörotoksinler dokulara girer, lenf sisteme ulaşır ve ardından sinir sistemi ya da kan dolaşımı aracılığıyla merkezi sinir sistemine aktarılır. Toksin, inhibitör nörotransmitterlerini bloke ederek tetanozla ilişkili tipik kas sertliği ve spazmların oluşmasına neden olur. Tedavi edilmeyen olgularında ölüm oranı %100'e ulaşmaktadır (Garrigues vd., 2022).

Hastalık 1924'ten beri mevcut olan toksoid aşı ile aşılanarak önlenmektedir. Gelişmiş ülkelerde tetanoz insidansını aşılama sonrasında büyük ölçüde azaltmış olsa da, özellikle gelişmekte olan ülkelerde dünya çapında yılda bir milyon insanı ve hayvancılık endüstrisini etkileyen, büyük ekonomik kayıplara neden olan önemli bir sorun olmaya devam etmektedir (Afshar vd., 2011). Tetanoz, gelişmiş ülkelerde rutin olarak bir tehdit oluşturmasa da, büyük ölçekli doğal afetler, herhangi bir sebeple yaşanan yaralanmalar, aşılama durumu hakkında bilgi eksikliği ve tıbbi bakım ve malzemelerdeki olası kısıtlamalar (örn. tetanoz aşısı, tetanoz immünglobülini) tehlikeyi artırabilir (Finkelstein vd., 2017).

Tetanoz tanısı, klinik olarak karakteristik spastik paralitik belirtilerin tanımlanması ile konulmaktadır. Ayrıca açık bir yaranın bulunması tetanozun teşhisini destekleyen bir unsurdur. TeNT'nin tanımlanması zordur ve genellikle biyolojik örneklerde saptanamaz. Tetanoz tanısı konulmuş olan hastaların kan serumlarında TeNT nörotoksinine pek rastlanılmamaktadır. Bunun sebebi ise hastalık belirtilerinin gelişmesi için çok düşük TeNT seviyelerinin yeterli olmasıdır (Popoff, 2020). Tetanoz riskinden şüphelenildiğinde yara debridmanı ve temizliği, antibiyotik kullanımı ve TeNT immünoglobülin enjeksiyonu içeren profilaktik tedaviler gereklidir. Profiksizde kullanılan immünoglobülinler kan-beyin bariyerini geçemedikleri için sadece dolaşımdaki toksini nötralize edebilirler. Klinik belirtilere dayanarak, at anti-tetanoz serumu veya hiperimmün insan tetanoz immünoglobülini ile hızlı bir pasif bağışıklama reçete edilir (Ataro vd., 2011; Rodrigo vd., 2014).

Pasif immunizasyon, bir insanı veya hayvanı enfeksiyon ajanlarından koruyabilmek amacıyla önceden oluşturulmuş antijene spesifik immüoglobülinlerin uygulanması olarak tanımlanabilir. Bu antikorları içeren serumlara antiserum adı verilir ve bunlar çoğu patojene karşı üretilebilir. Bu antiserumlar ile sağlanan koruma acil müdahale içindir ancak kısa ömürlüdür. Pasif bağışıklık, maternal antikorların yavrulara aktarılmasını içeren doğal pasif bağışıklık ve etkene karşı bağışık bireylerden duyarlı bireylere antikorların aktarılmasını içeren yapay pasif bağışıklık olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Baxter, 2007; Kovacs-Nolan vd., 2012). Patojene spesifik olarak önceden oluşturulmuş antikorların intravenöz veya ağızdan uygulanmasıyla sağlanan pasif immunizasyon, çeşitli insan ve hayvan enterik enfeksiyonlarının önlenmesinde antibiyotiklere alternatif olarak ortaya çıkan bir yaklaşımdır (Seal vd., 2013).

Antikorlar, patojenlere yanıt olarak üretilen protein yapıdaki moleküllerdir. Antijenik moleküllere kolaylıkla bağlanabilmeleri, bu moleküllerin bir çok çalışmada tanı ve tedavi amacıyla sıklıkla kullanılmalarını sağlamıştır (Perreira vd., 2019). Şu anda geniş ölçüde poliklonal antikor üretimi için tavşanlar, sıçanlar, fareler ve kobaylar gibi laboratuvar hayvanları veya atlar, koyunlar ve keçiler gibi daha büyük memeliler kullanılmaktadır. Ancak elde edilen bu poliklonal antikorların üretimi; uzun süreli kan alma gibi hayvanlara acı veren uygulamaları içermektedir (Karlsson vd., 2004).

Son yıllarda, tavukların hiperimmünizasyonu sonrasında yumurta sarısından antikorların izole edilmesi, önemli miktarlarda antikor üretimi için popüler bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Yöntem, hem doğal pasif bağışıklığın hem de yapay pasif bağışıklığın ilkelerinden faydalanır. Yumurta sarısına sürekli antikor birikimini sağlamak için tavuklar düzenli aralıklarla spesifik antijenlerle bağışıklanır. Daha sonra yumurta sarısından ekstrakte edilen antikorlar, insan veya hayvan immünoterapisi ve immünodiyagnostiği amacı ile kullanılır. Yumurta sarısı antikorlarının (IgY) antibakteriyel özellikleri IgY konusunun araştırılmasındaki temel ilgi alanlarından biri olmuştur. Birçok rapor, IgY'nin in vivo bakteri bulaşmasını veya enfeksiyonu önlemede bir bağışıklık işlevi gösterdiğini bildirmiştir (Gassmann vd., 1990; Han vd., 2021; Ikemori vd., 1992; Imberechts vd., 1997; Lyu vd., 2021; Peralta vd., 1994; Zhang vd., 2022). Tavuklar ile memeliler arasında filogenetik bir mesafenin olması, genel olarak korunmuş memeli antijenlerine karşı yumurta sarısı antikorlarının üretiminin, memelilere kıyasla daha başarılı olmasını sağlar (Gassmann vd., 1990). Ek olarak, bu antikorlar daha fazla antijenik epitopa yöneliktir ve birkaç türde aynı proteinleri tanıyarak onları daha geniş çapta faydalı hale getirir (Tini vd., 2002).

1.1. *Clostridium*

Clostridium, *Firmicutes* şubesinin “*Clostridia*” sınıfının *Clostridiales* takımındaki *Clostridiaceae* familyasına ait 19 familyadan birincisidir. İlk olarak 1880'de A. Prazmowski tarafından tanımlanan *Clostridium* genusu, 2019 yılının başına kadar yaklaşık 235 tür ve alt türü barındırdığı bildirilmektedir (Amaresan vd., 2020). *Clostridium* cinsinde büyük oranda heterojenite olduğu bilinmektedir (Stackebrandt vd., 1997). Moleküler tanımlama yöntemlerinin kullanımına ilişkin ilk rapor 1970'lerde ortaya çıkması (Johnson vd., 1975) ve 16S rRNA geninin tam dizisinin belirlenmesinin ardından, *Clostridium* cinsinde farklı genlere ve protein dizilerine dayalı olarak büyük bir çeşitlilik tanımlanmıştır (Kersey vd., 2016).

Clostridia büyük, fermantatif, katalaz ve oksidaz negatif olan ve büyüme için zenginleştirilmiş ortam gerektiren Gram-pozitif, anaerobik, spor oluşturan düz veya hafif kavisli çomak şeklinde bakterilerdir. Çoğunluğu peritrik yerleşime sahip olan kamçılar ile hareketlidir (Quinn vd., 2011). Toprakta, tatlı sularda ve deniz kıyı birikimlerinde, çürüten bitki örtüsünde ve hayvansal gereçlerde, kanalizasyonda, omurgalıların ve omurgasızların sindirim sisteminde bulunurlar. Saprofitik formlar, organik maddenin geri dönüştürülmesinde önemli bir rol üstlenirken diğer formlar, kommensal olarak memelilerin sindirim sistemi kanalında yaşamaktadır (Vos vd., 2011).

Clostridiaceae'ye yerleştirilen taksonlar genellikle zorunlu anaerobik basillerdir. Optimal üreme pH ve sıcaklığı pH 6,5-7,0 ve 30-37°C arasındadır. Hücreleri genellikle Gram-pozitifdir ancak önemli bir kısmı, özellikle termofilik türler, tüm büyüme evrelerinde Gram-negatif boyanırlar. Çomak biçimli morfolojiye sahip türlerin yanı sıra, *Clostridiaceae sensu stricto* genusu, kokoid veya polimorfik morfolojilere sahip tür veya cinsler de içerir. Bazı türler kapsül içerir. Kapsül antijenleri bir zamanlar *Clostridium perfringens* suşlarının serotiplenmesi için kullanılmıştır (Gillespie vd., 2006).

Patojenik *Clostridium* türlerinin önemli miktarı zorunlu anaerob olmasına karşın, bazıları kısmen oksijen toleranslıdır. Patojenik türler, üretilen toksinin aktivitesine ve etkilenen hedef dokulara göre üç sınıfta gruplandırılabilir. *C. tetani* ve *Clostridium botulinum*, nörotoksik *Clostridia* grubundadır, kas ve sinir sisteminde harabiyete sebep olurlar. Histotoksik *Clostridia* grubundakiler ise kas ve karaciğer gibi dokularda lokal olarak lezyonlar üretir ve ilerleyen aşamalarda toksemiye neden olabilirler. Üçüncü kategorinin önemli üyeleri olan *C. perfringens* A ve E tipleri, enterotoksemi ile birlikte gastrointestinal sistemde yangısal

lezyonlara neden olur. *Clostridium difficile*, hayvanlarda ortaya çıkan enterik bir patojendir ve insanlarda önemli bir nozokomiyal patojendir. *Clostridium spiroforme* tavşanlarda ishale neden olur ve *C. colinum* kümes hayvanlarının bağırsak patojenidir. Taylarda hepatik nekroza neden olan *Clostridium piliforme*, *Clostridia* 'nın atipik bir üyesidir ve açıklanan üç kategoriden herhangi birine dahil edilmesine izin veren özelliklere sahip değildir (Quinn vd., 2011).

Clostridia bakterisinin ana virülans faktörlerini, bakterinin ürettiği bir takım ekzotoksinler ve hücre dışı enzimler oluşturur. Geleneksel olarak toksinler, alfa (α) ve beta (β) gibi Yunan harfleriyle anılır. Bununla birlikte, bir türün α toksininin başka bir türün α toksininden çok farklı olabileceği vurgulanmalıdır. *Clostridial* ekzotoksinler, hücresel veya biyokimyasal seviyede sahip oldukları etkilere göre birkaç farklı kriterde sınıflandırılabilir. Bu ekzotoksinlerin önemli miktarı enzimatik etkilidir, diğerleri ise immünomodülatör etkilere sahiptir. Bazıları süper antijenler olabilirken diğerleri ise bilinmeyen bir etkiye sahiptir (Gillespie vd., 2006).

Bu anaerobik bakterilerin hayatta kalmasını sağlamak amacı ile numunelerin toplanması ve işlenmesi için özel yöntemler gereklidir. Canlı veya yakın zamanda ölmüş hayvanlardan numune alınmadığı takdirde, ölüm sonrası etken bağırsaktan dokulara hızla yayılarak laboratuvar sonuçlarının yorumlanmasını zorlaştırabilir. Etkilenen hayvanlardan alınan doku veya sıvı örnekleri, alındıktan hemen sonra kültüre edilmelidir. *Clostridia* etkenini kültüre edilebilmesi için maya özü, hemin ve K vitamini ile zenginleştirilmiş kanlı agar kullanılması faydalı olur. Üremeyi artırmak amacıyla %5 ila 10 karbondioksit (CO₂) ile takviye edilmiş hidrojen (H) içeren anaerobik kavanozlarda kültüre edilerek uygun atmosferik gereksinimler sağlanır (Quinn vd., 2011).

Clostridia genusu içindeki patojenik türlerin hepsi insan ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara neden olabilen, anaerobik, Gram-pozitif sporlu bakterilerdir. Bu toprak kaynaklı zoonotik organizmaların patogeneğinde sentezledikleri toksinler önemli rol oynar. Ancak birçok yardımcı virülans faktörü tanımlanmıştır ve yenileri halen keşfedilmeye devam etmektedir (Vos vd., 2011).

1.2. *Clostridium tetani*

1.2.1. Tarihçesi

Tetanoz, MÖ 4. yüzyılda Hipokrat tarafından spastik felç ile karakterize, yaşamı tehdit eden bir omurgalı hastalığı olarak tanımlanmıştır (Megighian vd., 2021). Gowers ise 1888 yılında, hastalığın merkezi sinir sisteminin bir hastalığı olduğunu, hastalıkta spazmların ve şiddetli alevlenmelerin ortaya çıktığını belirtmiş, spazmların genellikle boyun ve çene kaslarında ortaya çıkarak çene eklemının kapanmasına (trismus, kilitli çene) sebep olduğunu ifade etmiştir. Ayrıca, hastalığın gövdede bulunan kasları, kol ve bacaklardakine göre daha sık etkilemekte olduğunu, ani başladığını ve etkilenenlerin büyük bölümünü öldürdüğünü vurgulamıştır (Bennett vd., 2019).

Carle ve Rattone 1884'te, tetanoz nedeniyle ölmüş bir insan tetanoz vakasından alınan irin örneğini, tavşanın siyatik sinirine enjeksiyon yolu ile uygulayarak hastalığın meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Yine 1884 yılında Nicolaier topraktan hazırlanan örneklerin hayvanlara enjekte edildiğinde tetanoz hastalığının oluştuğunu bildirmiştir. Kitasato 1889'da, *C. tetani*'yi saf kültür şeklinde izole etmiş ve hayvanlara enjekte edildiğinde hastalık ürettiğini göstermiştir. Kitasato ve Behring 1890'da, toksinin spesifik antikorlar tarafından nötralize edilebileceğini bildirerek tetanozun önlenmesi ve tedavisine çok büyük katkı sağlamışlardır (Atkinson, 2006).

Nocard 1897'de, pasif olarak uygulanan antitoksinin koruyucu etkisini göstermiştir ve I. Dünya Savaşı sırasında pasif bağışıklama yöntemini insanlarda tedavi ve profilaksi için kullanarak birçok hayat kurtarmıştır. Ardından 1924 yılında Descombey tetanoz toksoidini geliştirdi ve ilk olarak II. Dünya Savaşı sırasında aktif bağışıklama (tetanoz aşılması) amacıyla yaygın olarak kullanılmaya başlandı (Atkinson, 2006).

1.2.2. Etiyolojik Özellikleri

C. tetani düz, ince, anaerobik, Gram pozitif bir çomaktır (Quinn vd., 2011). Eski kültürlerde veya doku örneklerinde 24 saatlik inkübasyon sonrasında Gram negatif hale gelebilmektedir (Bennett vd., 2019). Suşların çoğu peritrik flagellalar sayesinde hareketlidir. Hücreler $0,5-1,7 \times 2,1-18,1$ µm boyutlarındadır ve tek olarak veya çiftler halinde görülür. Sporlar genellikle yuvarlak ve terminaldir, bazen oval veya subterminal veya her ikisi birden

olabilir (Vos vd., 2011). Sporlu hücrelerin çapı vejetatif formdaki hücrelerin çapının iki katı kadar olabilir (Gillespie vd., 2006). Terminal ve şişkin ana hücreler olan endosporlar, sporlanmış organizmalara tipik bir "bağat" görünümü kazandırır. Endosporlar kimyasal maddelere ve kaynamaya karşı dirençlidir fakat 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlandığında inaktive olurlar (Quinn vd., 2011). Sporlar, toprakta ve atların, koyunların, sığırların, köpeklerin, kedilerin, sıçanların, kobayların ve tavukların bağırsaklarında ve dışkılarında yaygın olarak bulunur. Gübre uygulanmış toprak çok sayıda spor içerebilir. Tarımsal alanlarda önemli sayıda yetişkin insan etkeni taşıyabilir (Atkinson, 2006).

C. tetani kanlı agarda iyi ürer. Kanlı agar yüzeyindeki koloniler 4-6 mm çapında, düz, yarı saydam, gri, mat yüzeyle, düzensiz kenarlıdır. Genellikle dar bir β -hemoliz bölgesi oluşturur. Agardaki koloniler şeffaf ve çok yünlüdür. Üreme için optimum sıcaklık 37 °C'dir; 30 °C'de orta derecede üreme vardır, 25 °C veya 45 °C'de çok az veya hiç üreme yoktur. Üreme %20 safra veya %6,5 sodyum klorür (NaCl) ile inhibe edilir (Vos vd., 2011). Kamçılı türlerdeki farklılıklar kabul edilmesine rağmen *C. tetani* tipik olarak tiplendirilmemiştir (Gillespie vd., 2006). Belirlenmiş 10 serotipi, kamçı antijenleri ile ayırt edilebilir (Quinn vd., 2011).

C. tetani suşlarının büyük bir çoğunluğu üreme için aspartat, glutamat, histidin ve serin kullanır, bazıları metionin, treonin ve tirozin kullanır. Glutamat, bir metilaspartat yolu ile amonyak, CO₂, asetat ve bütirata dönüştürülür. *C. tetani* genellikle kloram fenikol, klindamisin, eritromisin, penisilin G ve tetrasikline duyarlıdır. Glikoz içermeyen bir triptikazmaya ekstraktı-tiyoglikolat ortamında oluşan başlıca lipid yağ asitleri, normal doymuş C₁₂, C₁₄, C₁₆ ve C₁₈ asitleri ve 7 veya 9 konumunda bir çift bağa sahip daha az miktarlarda doymamış C₁₈ ve C₁₆ asittir. Dallanmış zincirli yağ asitleri yoktur (Vos vd., 2011).

C. tetani uygun koşullarda tetanolizin ve tetanospazmin (TeNT) olmak üzere iki ekzotoksin üretmektedir. Tetanolizin toksininin fonksiyonu tam olarak aydınlatılmamıştır. TeNT ise bir nörotoksindir ve tetanoz hastalığının klinik bulgularına sebep olmaktadır (Atkinson, 2006). TeNT nörotoksini yaygın olarak tetanoz toksini olarak isimlendirilir ve tüm toksijenik suşlarda bulunan bir plazmid tarafından kodlanır. Tetanolizinin tetanoz patogeneziindeki önemi belirsizdir (Bennett vd., 2019). Ağırlık temelinde, TeNT bilinen en güçlü toksinler arasındadır. Yaklaşık olarak en düşük insan öldürücü dozu, vücut ağırlığının kilogramı (kg) başına 2,5 nanogram (bir ng, bir gramın milyarda biridir) veya 70 kg bir insan için 175 ng'dır (Atkinson, 2006).

1.2.3. Epidemiyolojisi

C. tetani, dünyanın her yerinde coğrafi konumdan bağımsız olarak toprak numunelerinde yaygın olarak bulunan bir etkidir. Sıcaklığın 20°C'den yüksek olduğu ve nemin en az %15'e ulaştığı nötr veya alkalik topraklarda daha yoğun olarak izole edilebilir. Toprakta yapılan izolasyon sıklığı farklı araştırmalara göre değişmektedir. Japonya, Kanada, Brezilya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan araştırmalar, %30-42 oranında pozitif numune tespit etmiştir (Popoff, 2020). Bu organizma toprak dışında, insan ve diğer hayvan dışkılarında, özellikle at dışkısında, bir hastanedeki atmosferde, bazen enfekte diş etlerinde ve dişler dahil olmak üzere hayvanlardaki ve insanlardaki yaralarda, kornea ülserasyonlarında, mastoid ve orta kulak enfeksiyonlarında, intraperitoneal enfeksiyonlarda, omfalit ve doğum sonrası uterus enfeksiyonlarında, travma ile ilgili çeşitli yumuşak doku enfeksiyonlarında (sıyrıklar ve yırtıklar), kontamine iğne ve katgüt ipliklerinde bulunabileceği bildirilmektedir (Vos vd., 2011).

C. tetani'nin coğrafi dağılımına bakıldığında, Batı ve Orta Afrika, Güneydoğu Asya, Hindistan, Pasifik Adaları ve Amerika Birleşik Devletleri'nin güneyindeki sıcak ve nemli bölgelerde tetanoz insidansının daha yüksek olduğu görülmektedir. Dünyanın daha soğuk bölgelerinde (örneğin, Finlandiya, Kanada, İsveç, Norveç, İngiltere gb.), *C. tetani*'nin yaygınlık oranı daha azdır. Buna karşın Güney Afrika'nın Durban bölgesindeki toprak numunelerinin *C. tetani* ile genel kontaminasyon oranının %28 olduğu tahmin edilmiştir. Bu bölgedeki atlardan alınan 118 dışkı örneğinde *C. tetani*'nin izolasyon oranı %5,9 olmuştur. Bu bakteri hayvanların bağırsaklarında saptanabilir, ancak normal sindirim florasının önemli bir bölümünü oluşturmamaktadır (Popoff, 2020).

1992'de Japonya'daki Okinawa Eyaletinde yapılan bir çalışmada 290 toprak örneğinin %18,6'sı *C. tetani* yönünden pozitif olarak bulunmuştur (Kobayashi vd., 1992). Japonya'nın bir başka bölgesi olan Kanagawa eyaletinde, 35 toprak numunesinden *C. tetani* etkeninin yaygınlığı %22,9 olarak belirlenmiştir. Dağlardan alınan örneklerdeki kontaminasyon oranının, tarlalardan, özel bahçelerden veya halka açık yollardan alınan numunelere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Japonya'da yol kenarlarından alınan toprak örneklerinde %20'ye, okul ve hastane alanlarında %30'a, ev bahçelerinde %53'e ve tarlalarda, göletlerde, nehirlerde ve ıslak kıyılarda %85'e kadar değişen oranlarda *C. tetani* izole edildiği bildirilmiştir (Ebisawa vd., 1986).

Bilindiği kadarıyla, Japonya hariç, toprakta *C. tetani*'ye ilişkin ülke çapında hiçbir sistematik araştırma yapılmamıştır, ancak tetanoz dünya çapında görüldüğünden, tüm toprakların bu patojeni içerdiği varsayılmaktadır (Ebisawa vd., 1986). Toprak parçacıkları, toz veya dışkı ile kirlenmiş farklı alanlar ve nesnelere *C. tetani* içerebilir. Hastanelerde katgüt gibi ameliyat iplikleri, pamuk yünü, toz ve hava numuneleri, insan derisi ve yaralardan *C. tetani*'nin toksijenik suşları da izole edilmiştir (Popoff, 2020).

Canlı türlerinin tümü tetanoz etkenine karşı duyarlıdır. Ancak türler arasında duyarlılıkta 'Çizelge 1.1.'de gösterildiği gibi büyük ölçüde farklılıklar bulunmaktadır. Türler arasında at, kobay, maymun, koyun, fare, keçi ve insan en duyarlı türlerdir. Kediler, köpekler, kuşlar ve sığırlar etkenlere dirençlidir. Enteresan bir şekilde, kurbağalar gibi soğukkanlı hayvanlar, dolaşımdaki vücut sıvılarında önemli miktarlarda TeNT barındırmasına rağmen, düşük sıcaklıkta (<18°C) tutulduklarında tetanoz zehirlenmesine karşı dirençlidir. Fakat daha yüksek sıcaklıklara (≥27°C) maruz kaldıklarında duyarlıdır. Soğutmanın koruyucu etkileri, TeNT'in hedef nöronlar üzerindeki bağlanma hızının gecikmesine ve etkisinin inhibisyonuna bağlanmıştır (Popoff, 2020).

Çizelge 1.1. Canlı türlerinin TeNT duyarlılığı (Popoff, 2020)

Tür	Minimum kobay öldürücü doz
At	0,5
Gine domuzu	1
Maymun	2-4
Koyun	2
Fare	2-6
Keçi	12
Sığır	Ölçülemeyen küçük değer
Tavşan	4-900
Köpek	300-600
Kedi	960-7200
Kaz	6000
Güvercin	6000-24000
Tavuk	180000-360000
İnsan	2,5 ng/kg

Avrupa'da 2000 ile 2014 yılları arasında atlarda görülen 176 tetanoz vakasının geriye dönük analizinde ölüm oranı %68,2 olarak bildirilmiştir. Brezilya'da *C. tetani* ile kontamine olmuş bir antihelmintik ile deri altından tedavi edilen 2.830 koyundan 50'sinde (%1,7) tetanozun klinik belirtileri gelişmiş ve tedaviye rağmen mortalite oranı %50 olarak bildirilmiştir (Popoff, 2020).

Tetanoz, özellikle gelişmekte olan ülkelerde halen önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir. Gelişmiş olan ülkelerde rutin olarak bir tehdit oluşturmasa da, büyük ölçekli doğal afetler, yaşanan herhangi bir yaralanma, aşılama durumu hakkında bilgi eksikliği ve tıbbi bakım ve malzemelerdeki olası kısıtlamalar (örn. tetanoz aşısı ve tetanoz immunglobülini) tehlikeyi artırabilecek unsurlardandır. Bu tehlike, yeteri kadar tıbbi kaynağı bulunmayan az gelişmiş ülkelerde daha da büyük sorunlara neden olur (Srivastava vd., 2022). Özellikle tedavisi yapılmayan vakalarda tetanoz sebebi ile ölüm oranının %100'e ulaşabildiği bildirilmektedir (Garrigues vd., 2022).

2001 ve 2008 yılları arasında Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC-Centers for Disease Control and Prevention, ABD) 233 tetanoz vakasına ait raporlar almış, bu vakaların toplam yıllık insidansının 1 milyon kişi başına 0,10 vaka ve 65 yaş ve üzeri 1 milyon kişi başına 0,23 vaka olduğu raporlanmıştır. 2016 yılında dünya genelinde 13.505 tetanoz vakası rapor edilmiş ve bildirilen vakaların çoğu 60 yaşından büyük hastalardan oluşmuştur. Bu durum, hastalıkta azalan bağışıklığın önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir (Bennett vd., 2019). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2015 yılında dünya çapında 34.000 yenidoğanın tetanozdan öldüğünü tahmin etmektedir. Ancak bu sayı, 1988'deki 787.000 ölümle karşılaştırıldığında ölümlerde önemli bir azalmayı (%96) temsil etmektedir (WHO Fact Sheet, 2018).

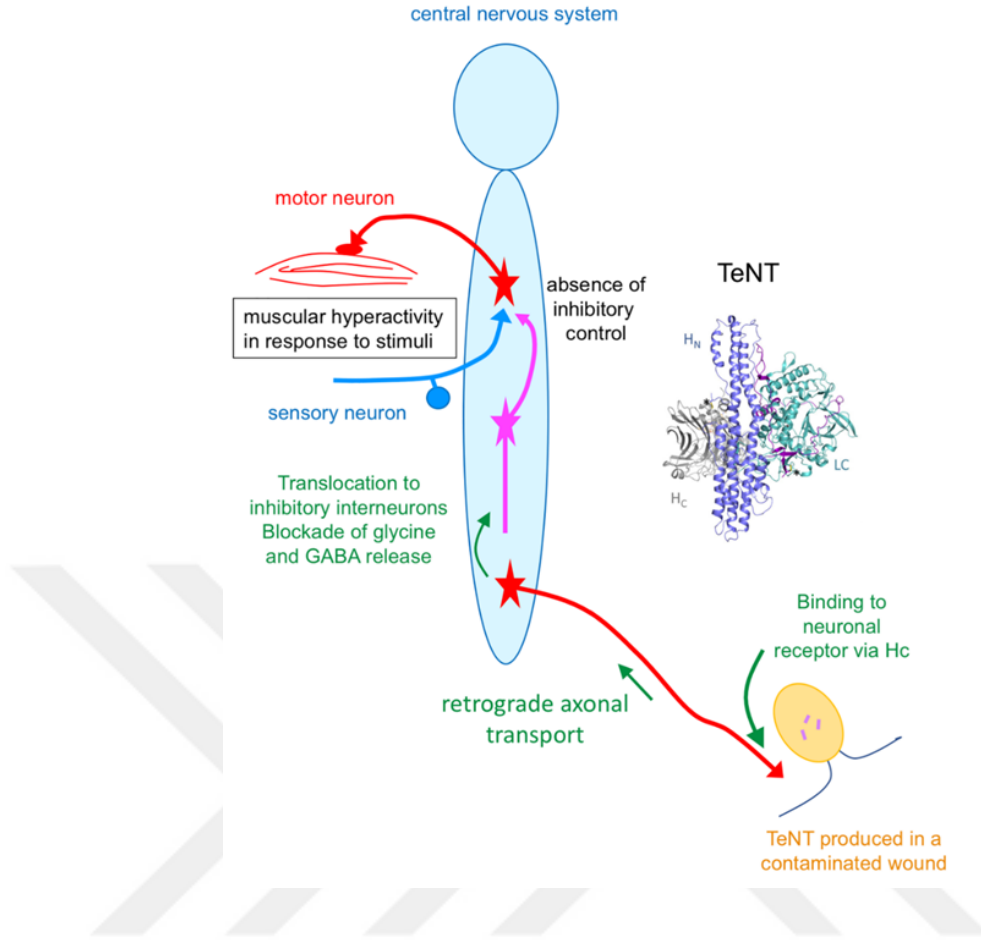
Dünya genelinde tetanoz vakaları olduğundan daha az bildirilmesi nedeni ile tetanozun gerçek insidansı kesin olarak bilinmemektedir (Murray vd., 2004). Türkiye'de tetanoz aşısının rutin olarak uygulanmasıyla insanlarda tetanoz vakalarının insidansı 1 milyon kişi başına 0,02 olarak açıklansa da halen erişkin yaşta ve özellikle ileri yaşlarda tetanoz olgularına rastlanmaktadır (T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı, 2009). Tetanoz, dünya çapında yılda bir milyon insanı ve hayvancılık endüstrisini etkileyen, büyük ekonomik kayıplara neden olan önemli bir sorun olmaya devam etmektedir (Afshar vd., 2011).

1.2.4. *C. tetani* Toksinleri

C. tetani iki patojenik çözülebilir antijen, tetanolizin ve tetanospazmin (TeNT) üretir. Tetanolizin, prototipi *C. perfringens*'ten perfringolizin olan kolesterol bağımlı sitolizin ailesine dahil gözenek oluşturan bir toksindir. Kolesterol bağımlı sitolizinler, hedef hücrelerin zar yüzeyinde büyük gözenekler oluşturarak 40-70 toksin monomerinin oligomerizasyonuna ve hücre zarında hasar oluşumuna sebep olurlar. Ayrıca, bölgesel olarak dokularda birikir ve makrofajlara karşı direnç oluşumuna katkı sağlar (Keyel vd., 2011).

C. tetani tarafından üretilen TeNT ise, tek zincirli yapıda, yaklaşık 150 kDa ağırlığında bir protein olarak üretilir. Bu toksin, ek olarak bakteriyel ortamda klostridial proteazlar veya konakçı tarafından üretilen ekzojen proteazlar aracılığıyla proteolitik olarak etkinleştirilir. Proteolitik bölünme, toksinin üçte birlik N-terminalinde oluşur. Aktifleşen TeNT, bir hafif zincir (L; N-terminali ~50 kDa) ve bir ağır zincirden (H; C-terminali ~100 kDa) oluşmaktadır. Bu zincirler disülfid köprüsü aracılığıyla birbirlerine bağlanırlar (Masuyer vd., 2017). Ağır zincir, hücre yüzey reseptörlerine ve taşıma proteinlerine bağlanmayı sağlarken, hafif zincir, klinik olarak tetanoz oluşturan verici salımının presinaptik inhibisyonunu üretir.

Tetanospazmin toksininin genel yapısı ve etki mekanizmasının şematik olarak anlatımı 'Şekil 1.1.'de özetlenmiştir (Popoff, 2020). Tetanospazminin bağlandığı, daha önce bir gangliyozit olduğu düşünülen reseptörün doğası tartışılmıştır. Son araştırmalar, hücre dışı matriks proteinleri olan nidogen-1 ve nidogen-2'nin tetanospazmin reseptörü olarak görev yaptığını düşündürmektedir (Bennett vd., 2019).



Şekil 1.1. TeNT yapısı ve etki mekanizmasının şematik olarak anlatımı (Popoff, 2020)

H_C = reseptör bağlama alanı; H_N = translokasyon alanı; LC = enzimatik siteyi kapsayan hafif zincir veya enzimatik alan. TeNT, enfekte olmuş yaradan merkezi sinir sistemine motor nöronlar ve muhtemelen duyuşal nöronlar aracılığıyla retrograd aksonal taşıma yoluyla taşınır. Omurilik ve beyinde TeNT, glisin ve GABA salınımını bloke eden inhibitör internöronları hedefler. Bu, ketleyici kontrolün yokluğunun bir sonucu olarak uyarıları (örn. dokunma, ışık, gürültü, sıcaklık) takiben kas hiperaktivitesine neden olur.

1.2.5. Patogenezi

Klasik tetanoz, *C. tetani* sporlarının, vejetatif forma geçmeleri ve daha sonra üremeleri için anaerobik (düşük oksijen) koşulların varlığında tipik olarak toprak veya hayvan dışkısı ile kontamine olmuş bir yaraya girmesi sonucunda ortaya çıkar (Gillespie vd., 2006). Bakteriyele olarak kontamine olmuş yaralar bazen göze çarpmayabilir. Ancak tetanoz, yara iyileşmesi sonrasında da ortaya çıkabilmektedir. Vücudun toprağa değen bölgelerinde oluşan yaraların kontamine olması, *C. tetani* üreme riskini büyük oranda artıran bir faktördür. Örnekler arasında, uzuvların ucunda, gövdenin alt tarafında ve karında dikenli bitkiler tarafından kazara oluşan yaralar veya delikler bulunur (Popoff, 2020). Bu yaraların etkenle kontaminasyonu sonucu anaerop koşullarda TeNT üretilerek kan dolaşımına girer ve buradan sinapşlara giderek

çizgili kaslarda istemsiz kasılmalara neden olan spastik felç oluşturur (Gillespie ve Hawkey, 2006).

Göbek bağının kesilmesi sonrasında bölgenin kontaminasyonuna bağlı olarak oluşan iltahaplar (omfalit), yenidoğanlarda, özelliklede kuzularda ve taylarda tetanoz oluşumu için predispoze faktörlerdendir. Kısırlaştırma, kuyruk ve kulak kesme ameliyatı gibi cerrahi operasyonlara bağlı oluşan yaralar, *C. tetani* sporlarının bulaşmasını kolaylaştırabilmektedir. Yine kontamine olmuş aşılar veya enjeksiyon bölgeleri, kırkım sırasında oluşan enfekte yara oluşumları tetanozun oluşumuna sebep olan yaygın nedenler arasındadır. Ayrıca lohusa tetanozu, zor doğum sırasında vajinal mukoza ve uterusun kontamine olmasına bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir. Havaya çok az maruz kalan derin yaralar ve anaerobik koşulları sağlayan nekrotik dokunun varlığı, sporların vejetatif forma geçip *C. tetani*'nin üremesi ve bunun sonucunda TeNT üretimini kolaylaştırır. Tüm bunlarla birlikte, oluşan bir yara içerisinde var olan hasarlı ve parçalanmış hücreler, *C. tetani* etkeninin üremesi ve toksin üretimi için uygun bir ortam oluşturur (Popoff, 2020).

C. tetani bakterisi iki patojenik çözülebilir antijen olan tetanolizin ve tetanospazmin (TeNT) toksinlerini üretir. Kısmen saflaştırılmış tetanolizinin enjekte edildiği tavşanlarda ve maymunlarda intravasküler hemoliz oluşumuna, farelerde ve maymunlarda ise elektrokardiyografik dalgalanmalara neden olmaktadır. Ayrıca tetanolizin tipik olarak hastalıkla sonuçlandığını gösteren az sayıda bulgu vardır. İnsanlarda ve hayvanlarda klinik tetanoza neden olan tetanospazmin toksini, muhtemelen merkezi sinir sistemine hem perinöral dokudan geçerek hemde lokalize bir üretim yerinden lenfatik ve hematogen yollar aracılığıyla yayılan oldukça güçlü bir nörotoksindir (Vos vd., 2011).

Tetanoz nörotoksini (TeNT) motor nöron terminallerindeki gangliyozyd reseptörlerine geri dönüşümsüz olarak bağlanır. Ardından soma kısmı ile sinir sistemindeki dendritik yapılara, ilerleme ve gerileme hareketi yaparak toksin içeren veziküllerde taşınır. Toksin transsinaptik olarak inhibe edici nöronların terminallerindeki etki bölgesine aktarılır ve bu hücrelere endositoz yoluyla girer ve konformasyonel bir değişikliğe neden olur. Bu değişikliği takiben, bir çinko endopeptidaz olan hafif zincir, inhibitör nöronun sitozolüne girer ve burada, nörotransmitterler içeren veziküllerin protein bileşenleri, inhibitör sinyallerin presinaptik iletimini bloke eder. İnhibitör nöro-transmitterlerin salınımı engellendiği için spastisite ve tetanik kasılmalarla kendini gösteren aşırı kas aktivitesine yol açar ve spastik felç oluşur. Özellikle önemli miktarda toksin üretildiğinde, kan dolaşımı yoluyla taşınır ve daha sonra

merkezi sinir sistemine iletilmeden önce vücuttaki motor terminallerine bağlanır. Bağlanan toksinler için antitetanus immüoglobülinler uygulansa bile toksin inaktivasyonu sağlanamamaktadır (Quinn vd., 2011).

1.2.6. Klinik Bulgular

Tetanoz hastalığının inkubasyon süresi genel olarak 5 ile 10 gün arasında değişmektedir. Fakat bu süre 21 güne kadar uzayabilmektedir. Bazen TeNT ile enfekte olan yara iyileşerek klinik semptomların gecikmesine neden olabilir. Bu durum gizli tetanoz olarak tanımlanır. Tetanoz nörotoksinin klinik ortamlardaki bulguları hem hayvanlarda hem de insanlarda benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, 'Çizelge 1.2.'de gösterilen klinik semptomların şiddeti, bakterilerin ürettiği anatomik lokasyona, etkenin ürettiği toksin miktarına ve canlı türünün hastalığa olan duyarlılığına bağlıdır. Kafa bölgesinde oluşan yaralarda genellikle daha kısa bir inkubasyon süresi görülür. Ayrıca bu tip yaralanmalar sonucu generalize tetanoz oluşumuna daha sık rastlanılmaktadır. Köpeklerde ve diğer daha az hassas türlerde tetanoz, yaralanmanın olduğu bölgede sertliğe ve kas spazmlarına neden olabilir. Bunun nedeni toksinin yara alanının yakınındaki sinir uçlarını etkilemesidir (Quinn vd., 2011).

Klinik olarak sertlik, bölgesel spazmlar, kalp ritimlerinde ve solunum sayısında değişme, yutma güçlüğü (disfaji) ve yüz ifadesinde değişiklik şeklinde bulgular görülür. Kısmen hafif dokunsal veya işitsel uyarılar, kasların tonik kasılma hızını artırabilir. Çiğneme kaslarının spazmı 'kilitlenmeye' neden olabilir. Genele yayılan kas sertliği, özellikle atlarda 'atlama sehpası' duruşuna sebep olabilir (Quinn vd., 2011)..

Tetanoz hastalığını atlatan hayvanlar ve insanlar kesin olarak bağışık değildirler. Bu durum, hastalığın oluşumuna neden olabilecek toksin seviyesinin genellikle koruyucu antikorların üretimini aktive etmek için gereken miktardan daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır (Quinn vd., 2011).

Çizelge 1.2. Tetanozun klinik bulguları (Malinovská vd., 2020)

Tetanozun Klinik Bulguları			
Kas sertliği	Trismus	Dispne	Kasılmış yüz kasları
Uzuvların hiperekstansiyonu	Disfaji	Hiperestezi	Dik kulaklar
Sert yürüyüş	Anoreksiya	İşitsel veya dokunsal uyarılara aşırı duyarlılık	Miosis, enoftalmi, 3.göz kapağının sarkması
Ayakta duramama	Yoksunluk	Üretral ve anal sfinkter hipertonisitesi	Buruşuk alın
Tetrapleji	Kusma	Opistotanus	Risus sardonicus
Kuyruğun uzatılması	Pityalizm	Tortikolis	Yüzün şişmesi

Tetanozun insanlarda inkubasyon süresi 3 ila 21 gün arasında değişir, genellikle yaklaşık 8 gündür. Ancak enfekte olan yaralanma bölgesi merkezi sinir sisteminden uzaklaştıkça kuluçka süresi uzamaktadır. İnkübasyon süresi kısaldıkça hastanın ölüm riskide artmaktadır. Neonatal tetanozda klinik bulgular genellikle doğumu takiben 4 ila 14 gün sonra, ortalama olarakta 7 gün sonra gözlenmesi beklenir (Atkinson, 2006).

Görülen klinik semptomlara göre jeneralize, lokalize, sefalik ve neonatal olmak üzere dört farklı tetanoz formu tanımlanmıştır (Bennett vd., 2019). Lokal tetanoz, hastaların yaralanma ile aynı anatomik bölgede sürekli kas kasılmasının olduğu, ender rastlanılan bir şeklidir. Bu kas spazmlarının kasılma gücü azalmadan önce birkaç hafta devam edebilir. Bununla birlikte, bildirilen lokal tetanoz vakalarının yalnızca yaklaşık %1'i ölüme sonuçlanmaktadır. Sefalik tetanoz, orta kulak florasında *C. tetani*'nin sebep olduğu orta kulak enfeksiyonları (otitis media) sonucunda veya kafa yaralanmaları sonrasında nadiren oluşan, hastalığın ender bir formudur. Bilhassa yüz bölgesinde yer alan kranial sinirleri hedef alır (Atkinson, 2006).

Bildirilen tetanoz vakalarının yaklaşık %80'i en baskın form olan jeneralize tetanozdur. Hastalıkta çoğunlukla ilk semptom trismus veya kilitli çenedir. Bunu boyun bölgesinde sertlik, yutma güçlüğü ve karın kaslarında sertlik takip eder. Bu belirtilere ek olarak yüksek ateş, terleme, hipertansiyon ve kalp atış hızındaki değişiklikler gözlenir. Sık sık birkaç dakika sürebilen spazmlar görülebilir ve 3-4 hafta sürer. Hastanın tamamen iyileşmesi aylar alabilir. Yenidoğan tetanozu, yenidoğanlarda ortaya çıkabilen jeneralize tetanozun bir varyasyonudur. Annenin hastalığa karşı dirençli olmaması nedeniyle pasif bağışıklığı olmayan bebeklerde ortaya çıkmaktadır. Yenidoğan tetanozu yaygın olarak gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir (Atkinson, 2006).

1.2.7. Teşhis

Tetanoz teşhisi klinik gözlem sonucunda elde edilir. Hastalık oldukça sınırlı bir ayırıcı tanıya sahiptir. Semptomlarla birlikte şüpheli bir yaranın bulunması tetanoz teşhisini destekler niteliktedir (Popoff, 2020). Laboratuvar analizleri hastalığı doğrulayamaz fakat tetanozun bulgularına benzer semptomlara sahip zehirlenmelerden ayırabilmek için faydalıdır (Bennett vd., 2019). Glisinin antagonize edildiği striknin zehirlenmesi özellikle köpeklerde tetanozu taklit eden tek durumdur (Quinn vd., 2011). Tetanozdan şüpheleniliyorsa kan serumu ve idrarın toksikolojik testleri yapılmalıdır. Analiz sonrasında striknin zehirlenmesi muhtemel görünse bile tetanoz düşünülmelidir (Bennett vd., 2019). Lezyonlardan alınan Gram boyama bakışı, *C. tetani*'nin karakteristik "baget" biçimlerini ortaya çıkarabilir (Quinn vd., 2011). Yara örnekleri anaerobik olarak kanlı agarda ve pişmiş et suyu içinde kültürlenir. Yara kültürü genellikle anaerob karışımı üretir, ancak *C. tetani*, plakayı bir el merceğinden inceleyerek ve büyüme özelliklerini kullanarak büyümenin olduğu yayılan kenarından örnek olarak saf olarak seçilebilir (Gillespie vd., 2006).

Nekrotik yara dokusundan anaerobik *C. tetani* kültürü denenebilir, ancak genellikle başarısız olur. Nörotoksin genlerinin tespiti için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (q-PCR) dahil olmak üzere PCR tabanlı teknikler, hastalığın teşhisine yardımcı olmak için kullanılabilir. Etkilenen hayvanlardan alınan serum, farelere enjekte edilerek dolaşımdaki nörotoksini göstermek için kullanılabilir (Quinn vd., 2011). TeNT, spesifik poliklonal veya monoklonal antikorlarla Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) analizi ile tespit edilebilir. Tetanospozmin'in tanımlanması genellikle zordur ve çoğu zaman biyolojik örneklerde saptanamaz. İnsanlarda ve hayvanların tetanoz belirtileri geliştirmesi için çok

düşük TeNT seviyeleri yeterlidir ve alınan serum örneklerinde TeNT saptanması nadiren bildirilmektedir (Popoff, 2020).

1.2.8. Profilaksi, Tedavi ve Kontrol

Tetanoz riskinden şüphelenildiğinde yara debridmanı ve temizliği, antibiyotik kullanımı ve TeNT immünoglobülin enjeksiyonu önerilir (Popoff, 2020). İlk olarak tüm yaralar temizlenmelidir. Nekrotik doku ve yabancı cisim çıkarılmalıdır (Atkinson, 2006). Ardından yaralanma bölgesinin hidrojen peroksit ile yıkanması, bakterilerin üremesini engellemeye yardımcı olan aerobik koşullar sağlar (Quinn vd., 2011). Tetanik kasılmalar oluşuyorsa, destekleyici sağaltım ciddi bir öneme sahiptir (Atkinson, 2006). Sinir uçlarına bağlanmayan toksini nötralize etmek için, antitetanus immünoglobülin hemen intravenöz olarak veya subaraknoid boşluğa arka arkaya üç gün uygulanmalıdır (Quinn vd., 2011). Tetanoz tedavisinde kullanılan uygulamalar ‘Çizelge 1.3.’te özetlenmiştir.

Antitetanoz immünoglobulinler (tetanoz immünglobulini veya tetanoz antitoksini olarak da adlandırılır) hiperimmünize sağlıklı atlarda üretilir. At kökenli olmasına rağmen sığır, koyun, domuz, köpek ve kedilerde olduğu kadar atlarda da kullanılabilir (Tizard, 2019). Yaradaki toksin üreten aktif *C. tetani* etkenini yok etmek amacıyla kas içi veya damar yolundan yüksek dozda penisilin verilir. Tedavinin bu aşaması oldukça önemlidir, çünkü insanlar üzerinde yapılmış olan çalışmalar, damar içi penisilin uygulaması ile 16 günlük tedaviden sonra hastalardan debridman olmaksızın *C. tetani* izole etmenin mümkün olduğunu göstermiştir. Hastalıktan etkilenen hastalar tedavi boyunca sakin ve loş bir ortamda tutulmalıdır. Sıvı replasman tedavisi, sedatifler, kas gevşeticiler ve özenli hasta bakım uygulamaları sonrasında klinik belirtiler en aza indirilerek hayati fonksiyonlar sürdürülebilir (Quinn vd., 2011).

Hastalık 1924'ten beri mevcut olan toksoid aşı ile aşılanarak önlenmektedir (Afshar vd., 2011). Tetanoza karşı kullanılmakta olan toksoid aşı, mevcut olan en güvenilir ve etkili aşılarından biridir (Gillespie ve Hawkey, 2006). Formaldehit uygulanarak etkisiz hale getirilen TeNT ile 3-4 haftalık aralıklarla yapılacak iki aşılama hastalığı önleminde etkilidir (Popoff, 2020). Aşılanmış bir hayvanın derin bir yarası varsa, takviye doz aşı önerilebilir. Atlarda, yaraların hızlı cerrahi debridmanı arzu edilir. Aşılanmamış, derin yaraları olan veya ameliyata alınan hayvanlara antitoksin verilmelidir. Bu pasif koruma yaklaşık olarak 21 gün kadar devam eder (Quinn vd., 2011). Antitoksinler ayrıca, kısırlaştırma, kenetlenme ve tetanozun

mevcut olduğu bilinen yerlerde yapılan herhangi bir cerrahi işlemde sonra bağışıklık sistemi yetersiz olan hayvanlara da uygulanmalıdır (Tizard, 2019).

Hiperimmünize sağlıklı atlarda üretilen at immüoglobulin G (IgG)'sinin yarı ömrü 27 ila 39 gün arasında değişmektedir. Kas içinden verilen tetanoz antitoksini, atlar dışındaki türlerde yaklaşık 7 ila 14 gün süren anında bağışıklık sağladığı bildirilmektedir. Tetanoza karşı anında koruma sağlamak için en az 1500 uluslararası birim (IU) dozda immüoglobulin, atlara ve sığırlara boyunlarından subkutan veya intramüsküler olarak verilmelidir. Buzağı, koyun, keçi ve domuza en az 500 IU dozda ve köpeklere en az 250 IU dozda verilmelidir. Antitoksinin uygulama dozu, fiziksel yaralanmanın boyutuna, yaradaki enfeksiyonun derecesine ve yaralanmanın meydana gelmesinden itibaren geçen süreye bağlı olarak dalgalanmalıdır (Tizard, 2019).

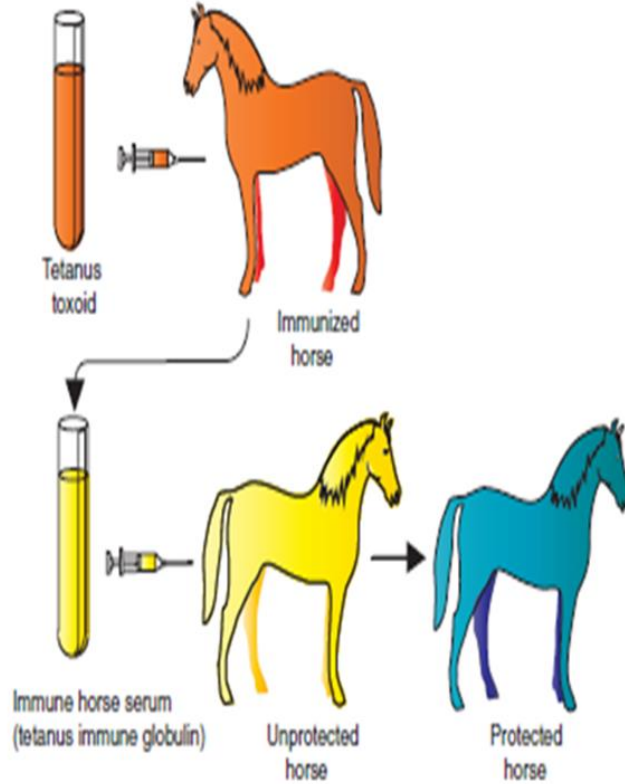
Çizelge 1.3. Tetanoz tedavisinde kullanılan uygulamalar (Malinovská ve ark., 2020)

Antitetanik tedavi uygulamaları	İlaç grupları	Kullanılan ilaçlar
Dolaşımdaki tetanospazminin nötralize edilmesi	Antitoksin	Tetanoz antitoksini
<i>C. tetani</i> 'nin üremesinin engellenmesi	Antimikrobiyal ilaçlar	Penisilin G Amoksisilin-Klavulant-Klindamisin Tetrasiklin Metronidazol
Nörotoksin etkisinin semptomlarını hafifletmek	Sakinleştirici ve kas gevşeticiler	Diazepam Metokarbamol Fenotiyazinler Magnezyum sülfat

1.2.9. Pasif Bağışıklık

Louis Pasteur'ün, kanda bulunan antikorların bağışıklık koruması sağladığını keşfetmesi üzerinden fazla zaman geçmedi. Toksin üretebilen tetanoz veya difteri gibi

bakteriyel toksinlere karşı antikorlar içeren kan serumunun, bağışık bir hayvandan duyarlı bir hayvana ya da insana aktarılabilmesi ve böylece koruma sağlayabileceği gösterilmiştir. Atlar, boyutları ve uysal olmaları nedeniyle bu "antitoksinlerin" birincil kaynağı olmuştur. 1920'li ve 1930'lu yıllarda bu antitoksinler tetanoz ve difteriye dışında, *Neisseria meningitides*, *Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae* gibi patojenlere karşı pasif aşılama amacıyla 'Şekil 1.2.'de gösterildiği gibi yaygın olarak uygulandı. Antitoksinlerden ucuz ve kullanımı daha kolay olan penisilin ve streptomisin gibi antibiyotiklerin keşfiyle birlikte yalnızca tetanoz ve botulizm gibi toksin aracılı hastalıklarda, kuduz gibi virüs hastalıklarında ve yılan zehirlenmesinde kullanılmaya devam etti (Tizard, 2019). Antibiyotik kalıntılarının insan sağlığı üzerindeki etkisi ve antibiyotiğe dirençli bakterilerin ortaya çıkması nedeniyle, şimdi yeniden önem kazanmıştır. Hayvanlardan aşılandıktan sonra elde edilen poliklonal antikorlar ve laboratuvarlarda üretilen monoklonal antikorlar, hem insan hem de hayvan hastalıklarının tedavisinde giderek daha fazla kullanılmaktadır (Agunos vd., 2019). Bu amaçla Amerika Birleşik Devletlerin'de üretilmiş olan lisanslı poliklonal antikorlar 'Çizelge 1.4.'te gösterildiği gibidir.



Şekil 1.2. Pasif bağışıklamanın temel prensibi

Öncesinde etkenle aşılanmış bir hayvandan alınan kan serumu, etkene özgül antikorlar içerir. Bu serum, başka bir memeliye uygulandığında geçici de olsa anında koruma sağlar (Tizard, 2019).

Antikorlar, organizmanın antijenik bir moleküle yanıt olarak ürettiği proteinlerdir. Özgül hedeflere bağlanma kabiliyetleri sebebiyle araştırma, tanı ve tedavide yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Pereira vd., 2019). Mevcut olarak poliklonal antikorların üretimi daha çok fare, sıçan, kobay ve tavşan gibi laboratuvar hayvanlarının veya koyun, keçi ve at gibi büyük memelilerin kullanılması ile gerçekleştirilmektedir. Ancak poliklonal antikorların üretim süreçleri hayvanlarda ciddi ağrıya ve strese neden olabilen prosedürleri içermektedir (Karlsson vd., 2004).

İmmünoglobulinler uygulanmaları sonrasında hemen koruma sağlarlar da, kullanımları ile ilgili bazı problemler bulunmaktadır. Örneğin, bir ineğe veya köpeğe attan elde edilen tetanoz antitoksinleri verilirse, at proteinleri vücutları tarafından yabancı olarak tanımlanacak ve hızla yok edilecek bir bağışıklık reaksiyonuna neden olacaktır. Yine farklı türden bir hayvana veya insana tekrarlanan dozlarda at antikorları uygulanırsa, bu durum IgE üretimini ve alerjik reaksiyonları tetikleyebilir. Ayrıca dolaşımda antijene spesifik yüksek seviyelerde bulunan at antitoksinleri, aktif immünizasyonun etkinliğini engelleyebilir (Tizard, 2019).

Çizelge 1.4. ABD'de hayvan sağlığı amacıyla üretilmiş lisanslı poliklonal antikorlar (Tizard, 2019)

Özellik	Etkenler
Antibakteriyel	<i>Escherichia coli</i> (+K99) <i>Rhodococcus equi</i> <i>Streptococcus equi</i> <i>Salmonella</i> Typhimurium <i>Trueperella pyogenes</i>
Antitoksinler	<i>Clostridium botulinum</i> tip B <i>Clostridium perfringens</i> tip C ve D <i>Clostridium tetani</i> <i>Crotalidae</i> (çingiraklı yılan) antivenomu
Antiviral	Sığır Rotavirus-Coronavirus Bati Nil Virusü

Son yıllarda, tavukların hiperimmünizasyonu sonrasında yumurta sarısından antikorların izole edilmesi, önemli miktarlarda antikor üretimi için popüler bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. IgY teknolojisi olarak isimlendirilen bu yöntem, anneden yavruya

antikorların aktarıldığı doğal pasif bağışıklık ile birlikte antikorların transferiyle tetiklenen yapay pasif bağışıklığın temel prensiplerinden faydalanır. Yumurta sarısında devamlı olarak özgül antikorların oluşumunu sağlayabilmek amacıyla tavuklar düzenli aralıklarla spesifik antijenlerle bağışıklanır. Ardından kanda oluşan ve yumurta sarısına aktarılan spesifik antikorlar, insan veya hayvan immünoterapisi ve immünoyagnozunda kullanılmak üzere yumurta sarısından izole edilir.

1.3. IgY Teknolojisi

1.3.1. Tarihi

Klemperer, ilk olarak, bir tavuğun immunizasyonu sonrasında üretilen spesifik antikorların (Abs) yumurta sarısına aktarılmasıyla sonuçlandığını gösteren bir deneyi tanımladı (Klemperer, 1893). Bilim camiasının hayvan refahını etik bir konu olarak giderek daha fazla ön planda tutmasıyla Klemperer'in bulguları popülerlik kazandı. İlk olarak 1959 yılında Russell ve Burch tarafından yapılan "Principles of Humane Experimental Technique" (İnsancıl Deneysel Tekniğin İlkeleri) başlıklı çalışmanın yayımlanması (Russell vd., 1959) ve sonraki 20 yılda giderek daha fazla sayıda araştırmacının yaptığı çalışmalar neticesinde Klemperer'in sonuçlarının önemi bilim dünyası tarafından kabul gördü.

1992 yılında, orijinal keşiften yaklaşık bir asır sonra, yumurta sarısı immüoglobülinleri ortak bir araştırma projesinin konusu oldu. Hali hazırda yumurta sarısı antikorları ile deneyimi olan çeşitli araştırma grupları Alman Eğitim ve Araştırma Bakanlığı tarafından mali olarak desteklendi ve çalışmaya başladılar. Bu projenin amacı, tavuk antikorlarının memelilerden, özellikle tavşanlardan elde edilen geleneksel olarak kullanılan poliklonal antikorlar kadar etkili olup olmadığını bulmaktır. Filogenetik olarak yüksek oranda korunmuş antijenler söz konusu olduğunda, tavuk antikorlarının memeli antikorlarından bile daha etkili olduğu gösterildi. Proje, IgY teknolojisinin artan ilgi ve kabul gördüğü altı yıl boyunca devam etti. Birkaç yıl içinde, IgY teknolojisi hayvanlar için geleneksel prosedürlere göre daha az stres yaratan kabul görmüş bir alternatif haline geldi (Schade vd., 2000).

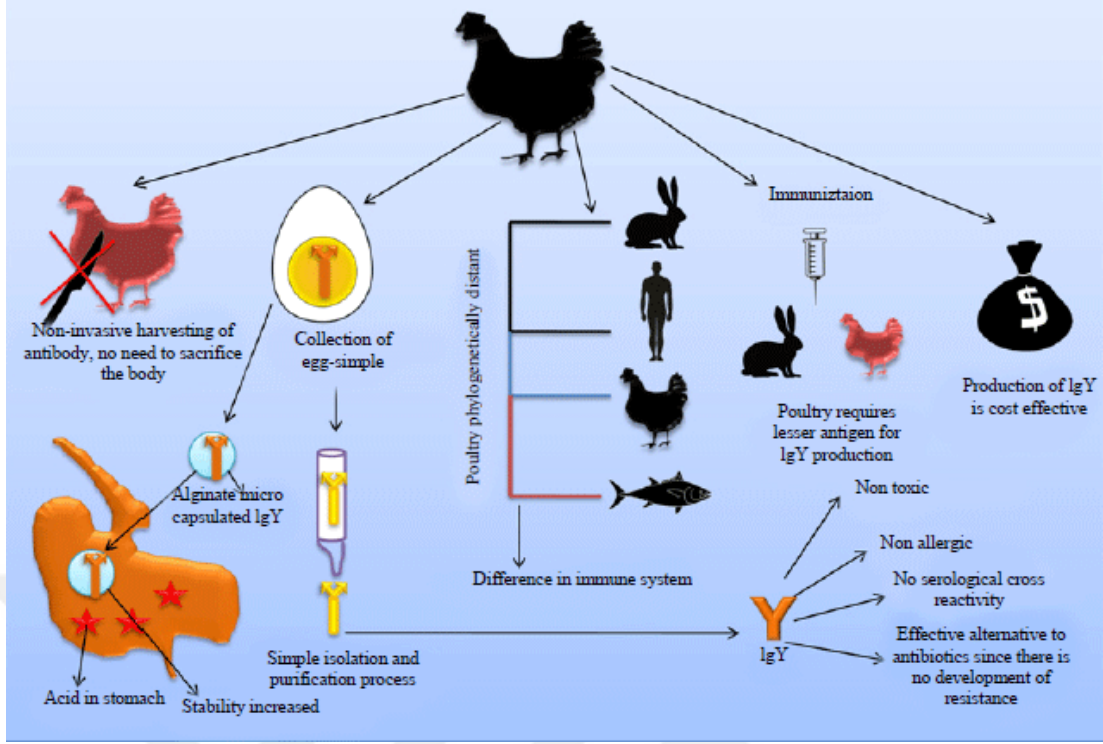
"IgY teknolojisi" terimi 1996 yılında IgY'nin üretimini ve kullanımını tanımlamak için kullanılmaya başlandı. 1996 yılında, Avrupa Alternatif Yöntemleri Doğrulama Merkezi (ECVAM) çalışmayı, invazif antikor (Ab) örnekleme sinin neden olduğu ağrıyı en aza indirmek için memeli IgG'si yerine IgY'nin kullanılmasını önerdi ve IgY ekstraksiyon yöntemleri

hakkında bilgi verdi. Çalıştay, antikor üretimi için tavukların kullanımının hem hayvan refahı açısından bir iyileştirmeyi (kan toplamayı ortadan kaldırarak) hem de hayvan kullanımında bir azalmayı (tavuklar, memelilere oranla daha fazla miktarda antikor üretmektedir) temsil ettiğini bildirdi (Schade vd., 1996). 1999 yılında IgY teknolojisi, İsviçre Hükümeti Veterinerlik Dairesi (Office Vétérinaire Fédéral) tarafından hayvan sağlığını desteklemek amacıyla alternatif bir metot olarak onaylanmıştır (Behn, 2000).

1.3.2. IgY Antikorumun Avantajları

Yumurta sarısı antikorumlarının, temel araştırmalarda ki kullanımı her geçen gün artmaktadır. Bu artışın sebebi, tavuklar ile memeliler arasındaki filogenetik farklılık (heterojenite) nedeniyle, tavuk antikorumlarının, memeli immünoglobülinlerine göre 'Şekil 1.3.'te gösterildiği gibi belirgin avantajlara sahip olmasından ötürüdür. IgY, memeli Fc-reseptörlerine veya romatoid faktörlere bağlanmaz. Bu nedenle tavuk antikorumlarının kullanılması, bazı immünokimyasal tahlillerde nadiren yanlış pozitiflik verebilir. Antikorumların kan plazmasından yumurta folikülü yoluyla yumurta sarısına transfer sayesinde, elde edilen tavuk IgY miktarı muazzamdır. Böylece memelilerden alınan kanın yerini aldığı için hayvanlara yapılan acı verici invazif uygulamalar en aza indirilir. Tavuklar için tek tatsızlık sürecin başındaki immunizasyondur (Schade vd., 2000).

Yapılan bir çalışma, immunize edilmiş bir tavuğun bir aylık bir süre içinde immunize edilmiş bir tavşandan 18 kat daha fazla antikor ürettiğini göstermiştir (Gottstein vd., 1985). Farklı bir çalışmada bir tavuğun bir haftada ürettiği antikor miktarı, 90–100 mililitre (ml) serum veya 180–200 ml tam kana eşdeğer olduğu bildirilmiştir (Larsson vd., 1993). Yine yaklaşık 1500 miligram (mg) IgY'nin 1 aylık bir süre içinde hasat edilebileceğini ve bunun %2-10'unun spesifik IgY'yi oluşturduğu bildirmiştir (Schade vd., 1996). Bu, yaklaşık 200 mg olan ve %5'i spesifik antikoru oluşturan IgG antikorumlarının verimi ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir (Tini vd., 2002). Araştırmacılar yumurta tavuğunu antikor üretimi için "**küçük fabrikalar**" olarak tanımladılar. Bu isimlendirmenin sebebi, her tavuğun her yıl 20 g'ın üzerinde IgY üretebilmesi ve bu üretiminde aynı zaman zarfında 4,3 tavşanın üretimine denk olmasıdır (Xu vd., 2011).



Şekil 1.3. IgY'nin avantajları (Zorriehzahra vd., 2016)

IgY antikorlarının uzun süreli üretimini sağlayacak bağışıklık tepkisi için gereken antijenik doz miktarı, tavşanlarda gerekenden çok daha az olması IgY'nin avantajları arasındadır (Gassmann vd., 1990). Ayrıca IgY teknolojisi ile yumurta sarısından antikorların ağrısız toplanabilmesi, ağrıya neden olan kan alma sürecini ortadan kaldırır. Böylece hayvan refahının temel amacı olan ağrıya sebep olan uygulamaların azaltılması ilkesini de karşılamış olur (Larsson vd., 1993; Tini vd., 2002).

Ek olarak, tavuk yetiştirmek laboratuvar memelilerini kullanmaktan daha düşük maliyettedir ve idaresi daha kolaydır (Gassmann vd., 1990). Bu nedenle, yumurta sarısı antikorlarının üretimi, memeli IgG'sinin üretiminde kullanılan yöntemlere göre hem daha hijyenik hem de ekonomik bir yöntemdir (Mine vd., 2022). Antibiyotiklerin aksine, yumurta sarısı antikorları çevre dostudur ve herhangi bir olumsuz etki, direnç veya toksik kalıntı ortaya çıkarmaz (Coleman, 1999).

1.3.3. IgY Antikorumun Özellikleri

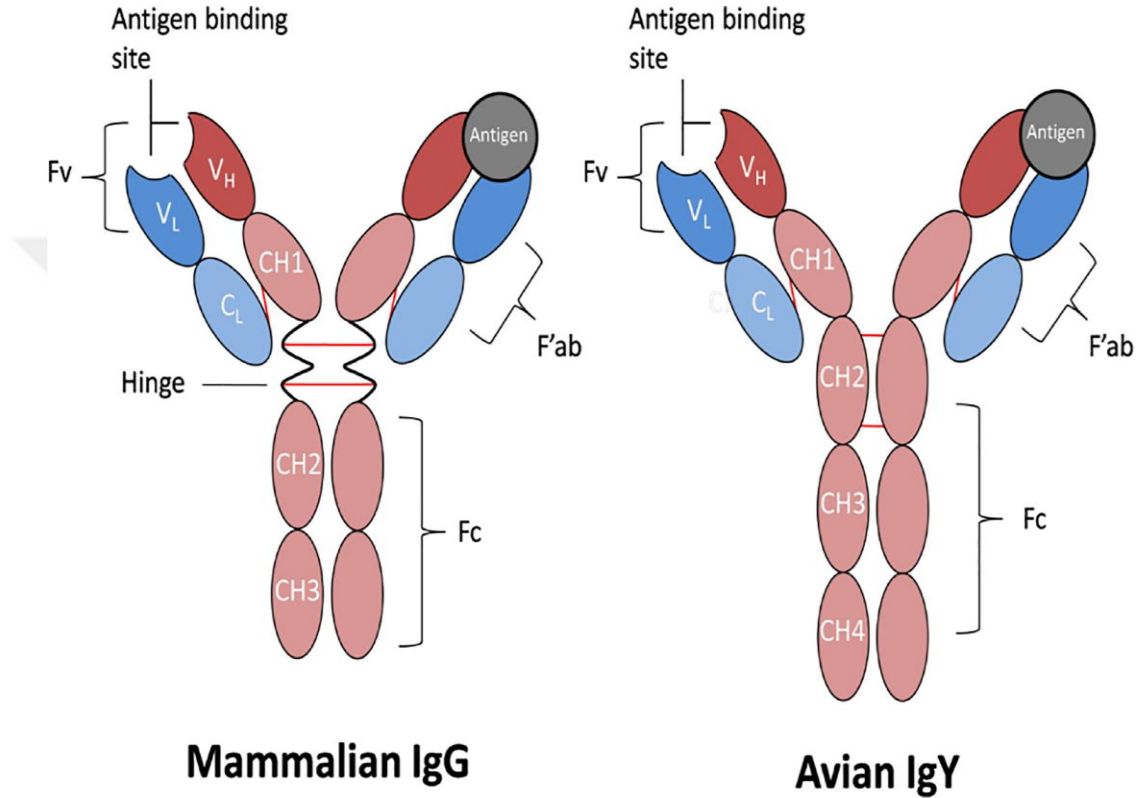
1.3.3.1. Yapısı

Tavuklarda; immunglobulin Alfa (IgA), immunglobulin Mü (IgM) ve immunglobulin Upsilon (IgY) olmak üzere üç farklı immunglobulin sınıfı bulunmaktadır. Tavuklarda bulunan IgA ve IgM, memelilerde ki benzerleriyle hem yapısal hem de işlevsel olarak benzerlikler gösterir. Kan serumunda ve yumurta sarısında baskın antikor grubu olan IgY, fonksiyon bakımından memeli IgG'sine benzediği için IgG olarak kabul görmüştür (Gadde vd., 2015). Ancak araştırmacılar 1969 yılında tavuk serumunda ve yumurta sarısında bulunmakta olan immunglobulinlerin yapısal farklılıklardan ötürü IgG yerine IgY olarak isimlendirilmesini teklif edilmiştir (Leslie vd., 1969). IgG ve IgE'nin evrimsel atası olarak kabul edilen IgY'ler, kuşlar dışında, amfibiler, sürüngenler ve akciğer solunumu yapan balıklarda baskın olan serum antikorlarıdır (Leslie vd., 1969; Warr vd., 1995).

Yumurta içerisinde IgY antikorları daha çok yumurta sarısında bulunurken, IgA ve IgM antikorları yumurta beyazında yoğunlaşmaktadır (Gadde vd., 2015). IgY molekülü, her biri yaklaşık 65 kilodalton (kDa) ağırlıkta iki ağır zincir (H) ve her biri yaklaşık 25 kDa'lık iki hafif zincir (L) ile IgG'ye benzer bir yapıdadır (Pereira vd., 2019). IgG'ye (~150 kDa) kıyasla IgY daha büyük moleküler kütesine (~180 kDa) sahiptir. IgY antikorumun ağır zinciri, Y harfi veya Yunan alfabesinin yirminci harfi upsilon (υ) ile gösterilir (Gadde vd., 2015; Warr vd., 1995). IgG ve IgY'nin moleküler yapıları 'Şekil 1.4.'te açıklanmıştır.

IgY'nin hafif zincirinde, IgG'de olduğu gibi bir adet sabit bölge (CL) ve bir adet değişken bölge (VL) bulunmaktadır. IgY ve IgG arasındaki temel farklılık ağır zincirlerindedir. IgG'nin ağır zincirinde üç adet sabit bölge (CH1-CH3) bulunurken IgY'de, dört adet sabit bölge (CH1-CH4) yer almaktadır (Pereira vd., 2019). Birçok araştırma, IgY'nin CH3 ve CH4 alanlarının, IgG'nin CH2 ve CH3 alanlarıyla denk olduğunu göstermiştir (Fellah vd., 1993; Magor vd., 1994; Parvari vd., 1988; Warr vd., 1995). Ancak IgG'nin CH2'sinde, IgY'nin CH2 bölgesine eşdeğer bir alan yoktur. Çünkü yerini katlama bölgesine bırakmıştır (Fellah vd., 1993; Parvari vd., 1988). IgY, IgG'den daha az esnektir. Bunun sebebi IgY'nin, IgG'de bulunan CH1 ve CH2 alanları arasında yer alan katlama bölgesinden yoksun olmasıdır (Shimizu vd., 1992). Bununla birlikte, katlanma bölgesi bulunmayan IgY molekülüne, CH1-CH2 ve CH2-CH3 alanlarının sınırlarında bulunan kısa prolin ve glisinden yoğun bölgeler sınırlı miktarda esneklik kazandırır (Warr vd., 1995).

IgY ve IgG arasındaki yapısal ve filogenetik farklılıklar, farklı biyokimyasal ve moleküler etkileşimlere yol açar. IgY, memeli Fc reseptörlerini veya romatoid faktörleri aktive etmez (Larsson vd., 1992). Ayrıca protein G ile bağlanamaz (Akerström vd., 1985) ve insan anti-fare antikorları (HAMA) ile reaksiyona girmez (Carlander vd., 1999). IgY ve IgG arasındaki farklılıklar 'Çizelge 1.5'te özetlenmiştir.



Şekil 1.4. IgG ve IgY'nin moleküler yapıları

Zincirler arasındaki kırmızı renkli çizgiler ağır ve hafif zinciri birbirine bağlayan disülfid bağlarının yerlerini belirtir. IgY, IgE'ye benzer şekilde ek CH4 alanına sahipken, IgG'de CH1 ve CH2 arasında yer alan katlanma bölgesinden yoksundur (Lee vd., 2017).

IgY'nin izoelektrik noktası (pI), IgG'ye kıyasla önemli ölçüde düşüktür. İnsan IgG'nin ortalama izoelektrik noktası kabaca pH 6,8 iken IgY'ninki yaklaşık pH 5,8'dir (Polson vd., 1980). Yapılan bir araştırmada, izoelektrik odaklanma ile tavşan IgG ve yumurta sarısı IgY'nin pI değerleri hesaplanmış ve sırasıyla 6,1-8,5 ve 5,5-7,6 arasında tespit edilmiştir. Aynı çalışmada IgY'nin yüzeyinin, IgG'ninkinden daha hidrofobik olduğu bildirilmiştir. Bu durum, IgY'nin Fc bölgesinin (antikor molekülünün en hidrofobik kısmı) IgG'nin Fc bölgesinden daha büyük olması ile açıklanmıştır. IgY'nin hidrofobik özellikte olması, lipitlerden zengin olan

yumurta sarısında bol miktarda bulunmasına olanak sağlamaktadır (Davalos-Pantoja vd., 2000).

Çizelge 1.5. IgG'ye kıyasla IgY'nin özellikleri (Zhang vd., 2021)

Özellikler	IgY	IgG
Türler	Kuşlar, sürüngenler, amfibiler ve akciğerli balıklar	Memeliler
Antikor alt sınıfları	Yok	IgG ₁ , IgG ₂ , IgG ₃ ve IgG ₄
Antikor kaynağı	Yumurta	Kan serumu
Antikor örnekleme	3R hayvan refahı ilkelerini karşılar	Acı verici olabilir
Hayvan başına ortalama antikor	50-100 mg/yumurta sarısı	5 mg/ml/kan, ayda 40 ml'ye kadar kan toplama
Hayvan başına aylık antikor	1000-2800 mg/tavuk/aylık	200 mg/tavşan/aylık
Antijene özgü antikor miktarı	Toplam antikorun %0,5-10	Serumda 50-200 µg/ml
Moleküler ağırlık (kDa)	180	150
İzoelektirik noktası	5,5-7,6	8,5'e kadar
pH stabilitesi	pH 3,5-11/ kararlı	pH 2-11/ kararlı
Proteolitik bozulma	Pepsin, papain	Pepsin, papain, tripsin ve kimotripsin
Isı kararlılığı	65°C kararlı > 2 ay 100°C > 6 dakika 4°C > 6 ay	Genel olarak IgY'den yüksek
Zincir tipi/alan sayısı/katlanma bölgesi	ν zincir/3 sabit alan/yok	γ zincir/2 sabit alan/var
Fc reseptörlerine bağlanma	Hayır	Evet
Romatoid faktör ile çapraz reaksiyon	Hayır	Evet
İnsan anti-fare antikoruna ile (HAMA) çapraz reaksiyon	Hayır	Evet

1.3.3.2. Stabilitesi

IgY antikorları, saklama ve işleme sırasında oldukça kararlıdır. Yapılan bir araştırmada, 6 ay boyunca oda sıcaklığında veya +4°C'de saklanan yumurtalarda IgY'nin stabilitesi incelenmiştir. Araştırma sonucunda IgY aktivitesinde hiçbir kayıp olmadığı ve yumurtaların 6 ay süre ile toplanıp sonrasında IgY'nin saflaştırmasının birlikte yapılabilineceği bildirilmiştir (Nilsson vd., 2012). Bir başka araştırmada, IgY antikorlarının aktivitelerinde ciddi ölçüde bir kayıp olmadan +4°C'de 5 ila 10 yıl kadar saklanabileceği bildirilmiştir (Larsson vd., 1993). Aynı araştırma IgY antikorlarının oda sıcaklığında 6 ay veya 37°C'de 1 ay saklandıktan sonra bile etkinliğini koruduğunu gösterilmiştir. Bu konuda yapılmış olan diğer bir araştırma, izole edilen IgY solüsyonları içerisine mikrobiyal üremeyi önlemek için %0,02 sodyum azid

(NaN₃), %0,03 timerosal veya 50 mikrogram/mililitre ($\mu\text{g/ml}$) gentamisin eklenmesi sonrasında birkaç yıla kadar +4°C'de aktivite kaybı olmadan saklanabileceği bildirmiştir (Schade vd., 2005).

IgY antikorlarını uzun süreli saklayabilmek için en çok tavsiye edilen yol, bu solüsyonların -20°C'de dondurulmasıdır. Bunun nedeni, -70°C'de saklamanın IgY aktivitesinde %50'ye varan oranda kayıplara neden olabileceğidir (Schade vd., 2000). Dondurma ve liyofilizasyon işlemleri birden çok kez tekrarlanmadığı sürece IgY stabilitesi üzerinde önemli bir değişikliğe yol açmaz (Shimizu vd., 1988). Az sayıda rapor, minimum antikor aktivitesi kaybından bahsetmektedir, ancak bazı araştırmacılar dondurarak kurutma işleminin ardından IgY'nin çözünürlüğünde ciddi ölçüde bir kayıp olduğunu bildirmişlerdir (Chansarkar, 1998; Sunwoo vd., 2002). IgY preparatları, antikor aktivitesini kaybetmeden uzun süreli depolayabilmek için sprey ile kurutulabilir. Liyofilizasyonun bakteri üremesini azaltmada ve saflaştırılmış IgY'nin yapısal bütünlüğünü korumada etkili olmasına rağmen, sprey kurutmanın daha uygun maliyetli bir alternatif olduğu rapor edilmiştir (Yokoyama vd., 1992).

Yumurta sarısı antikorları ısıya karşı mukavemetleri oldukça yüksektir. Ancak yüksek sıcaklıklarda stabiliteleri ve bağlanma aktiviteleri azalır. Araştırmacılar yumurtaların kaynar suda altı dakika pişirildiğinde IgY yoğunluğunun azalmadığını, fakat onuncu dakikanın ardından antikor yoğunluğunun ve aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir (Lösch vd., 1986). Bir başka çalışmada IgY'nin 30 dakika 70°C'de ısıtılmasının ardından antikor aktivitesinin yaklaşık %50'sini koruyabildiği, fakat 80°C'de 10 dakika ısıtıldıktan sonra yalnızca %10 aktivitesini koruduğu bildirilmiştir (Hatta vd., 1993). Öte yandan farklı bir araştırmada, IgY antikorlarının, 60°C ila 70°C arasındaki sıcaklıklarda sabit bir aktiviteye sahip olduğu, 15 dakika süreyle 70°C'ye ısıtılmalarının ardından aktivitelerinin büyük bir çoğunluğunu koruyabildiği bildirilmiştir (Shimizu vd., 1992). Ek olarak, IgY çözeltisine %30-50 (ağırlık/hacim) sakkaroz veya invert şekerin dahil edilmesinin, 75-80°C aralığındaki sıcaklıklarda ısı denatürasyonunu etkili bir şekilde önlediği gösterilmiştir (Shimizu vd., 1994).

Yumurta sarısı antikorları pH 4 ile pH 11 arasında stabil aktivite gösterir. Buna karşın IgY'nin aktivitesinin pH 3 'te bütünüyle durduğu bildirilmiştir (Shimizu vd., 1988; Shimizu vd., 1992). Yapılan farklı çalışmalar, pH 3,5'un altına geldiğinde IgY bağlanma aktivitesinin geri döndürülemez kaybı ile benzer sonuçlar göstermiştir (Hatta vd., 1993; Lee vd., 2002; Lösch

vd., 1986; Schmidt vd., 1989). Bu aktivite kaybı, IgY'de diğer memeli IgG'lerinden daha hızlı ilerleyen antijen bağlama bölgesine zarar veren konformasyonel değişikliklere bağlanabilir (Shimizu vd., 1993). Şekerler, kompleks karbonhidratlar veya %30-50 sorbitol dahil olmak üzere stabilizatörlerin eklenmesi, IgY'nin asit kaynaklı inaktivasyonunu önleyebilir (Lee vd., 2002; Shimizu vd., 1994). Alkali koşullar altında, IgY antikorlarının aktivitesinin pH 11'e kadar stabil olduğu ancak pH'nın 12 veya daha yüksek olması durumunda ciddi ölçüde azaldığı bildirilmektedir (Lösch vd., 1986; Shimizu vd., 1992).

IgY'nin oral uygulanabilirliği büyük ölçüde mide ve bağırsaklardaki enzimlere karşı stabilitesine bağlıdır. Araştırmalar, IgY antikorlarının, tripsin ve kimotripsine karşı kısmi direnç gösterse de, özellikle asidik ortamlarda pepsin sindirimine karşı oldukça duyarlı olduklarını göstermektedir (Jaradat vd., 2000; Otani vd., 1991; Reilly vd., 1997; Shimizu vd., 1988). Pepsin enziminin IgY üzerindeki proteolitik aktivitesi pH 5'te sonlanır ve antikorlar hem antijen bağlama hem de hücre aglütinasyon aktivitelerini korur. Ancak pH <4,5'ta bu aktivitelerin her ikisinin birden ortadan kalktığı bildirilmektedir (Schmidt vd., 1989; Shimizu vd., 1988). IgY antikorları üzerinde tripsinin, kimotripsinden daha güçlü inaktive edici etkiye neden olduğu Schmidt vd. (1989)'nin yaptıkları çalışmada bildirilmiştir. Ayrıca yumurta sarısı, yumurta süspansiyonları ve izole edilmiş IgY antikorları in vitro ortamda tripsin ve kimotripsin ile 3 saat inkübasyona bırakılmış ve sonrasında IgY antikorlarının tripsin tarafından tamamen inaktive edildiği, kimotripsin tarafından ise büyük ölçüde inaktive edildiği görülmüş. Buna karşın yumurta sarısı ve yumurta süspansiyonlarının antikor aktivitesinde daha da artış olduğu rapor edilmiştir. Bu, yumurta içerisinde yer alan ve tampon görevi gören diğer protein bileşenlerden kaynaklanır. Bu nedenle, bağırsaktaki IgY'nin stabilitesi, yaş, sağlık durumu, beslenmeyle ilişkili olan mide pH'sı ve enzim seviyeleri gibi bir takım faktörlere bağlıdır.

IgY'nin stabilitesine ilişkin yapılmış çalışmalardan elde edilen sonuçların çoğu, laboratuvar ortamında elde edilmiştir. Çeşitli çalışmalar, ağızdan uygulanan antikorların bağırsaktan geçtikten sonra biyolojik olarak aktif formlarını koruduğunu göstermiştir (Berghman vd., 2005; Carlander vd., 2000; Reilly vd., 1997). Yemlerde, yumurta sarısında ve bütün yumurta matrisinde IgY stabilitesi gösteren daha fazla in vivo çalışmaların yapılması, IgY'nin ticari uygulamalarda kullanım potansiyeli açısından önemlidir.

1.3.3.3. Etki Mekanizması

Ağız yoluyla uygulanan yumurta sarısı antikorlarının etki mekanizmaları kesin olarak açıklanamamaktadır. Ancak bu mekanizmanın büyük ölçüde antijen-antikor etkileşimleri sonucu olduğu bilinmektedir (Rahman vd., 2013). IgY'nin koruyucu etkisini açıklamak için çeşitli teoriler ortaya atılmıştır. Birincil mekanizma, antikorların patojenler üzerindeki belirli antijenlere bağlanmasını, dolayısıyla bunların biyolojik işlevlerini veya çoğalma yeteneklerini bozmasını içerir. IgY antikorları, bakterilerin flagella (kamçı), fimbria (pili), dış zar proteinleri ve lipopolisakkarid gibi antijenik özelliğe sahip yapılarına bağlanarak bunların bağırsak duvarına yapışmasını engeller (Jin vd., 1998; Peralta vd., 1994; Tsubokura vd., 1997; Yokoyama vd., 1998). Bakterilerin bağırsak hücrelerine yapışmasındaki bu azalma, bağırsak hücreleri içindeki patojenlerin çoğalmalarını ve kolonizasyonunu azaltır (Girard vd., 2006; Jin vd., 1998; Lee vd., 2002; Sugita-Konishi vd., 2000; Sunwoo vd., 2002). IgY'nin antijenler üzerindeki diğer etki mekanizmaları arasında, hareketsizleştirme vasıtasıyla ölümle sonuçlanan bakteriyel aglütinasyon, toksinlerin nötralizasyonu (Wang vd., 2011) ve enzim aktivitesinin engellenmesi bulunmaktadır (Rahman vd., 2013). Spesifik IgY'nin bakterilere bağlanması ayrıca bakteriyel hücrel sinyal olaylarını değiştirebilir ve böylece bunların toksin üretimini ve salınmasını azaltabilir (Xu vd., 2011).

1.3.4. IgY Üretimi

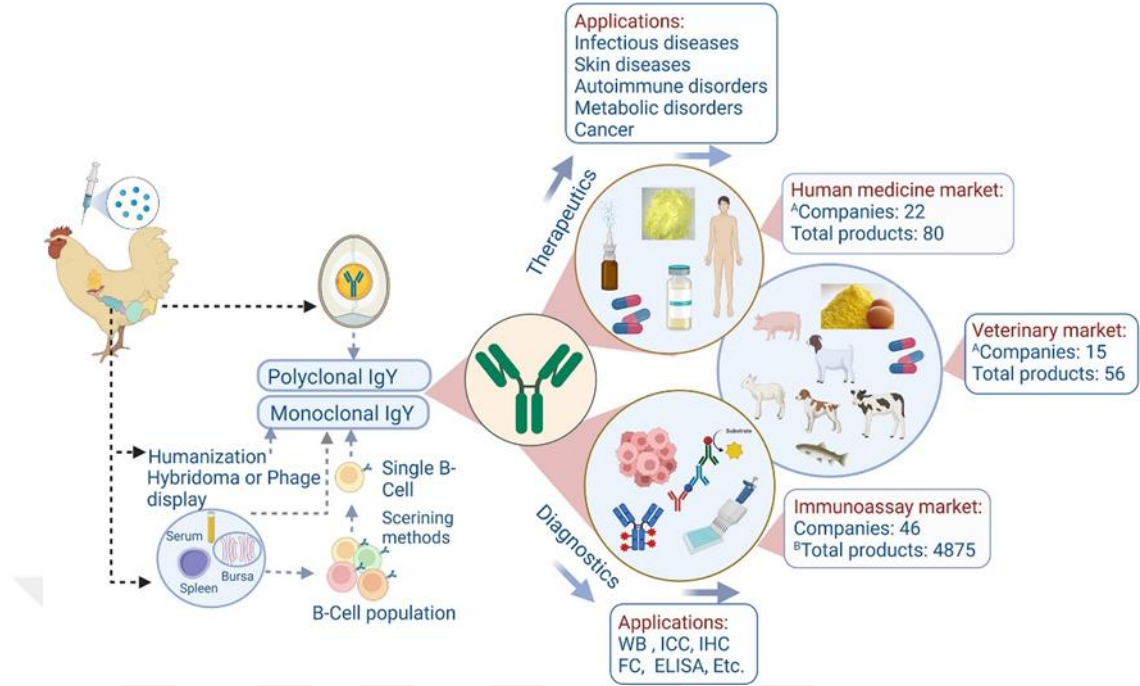
IgY antikorlarının üretiminde, bağışıklama sonucu olarak antikor gelişimi ve üretimi pek tahmin edilebilir olmaması sebebiyle farklı bağışıklama protokolleri ve bunların çeşitli önerileri kullanılabilir. Antikor titreleri antijenin tipi, dozu ve uygulama yolu, kullanılan adjuvant tipi, aşılama sıklığı, tavuğun yaşı, cinsi ve gelişme aşaması gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilir (Chalghoumi vd., 2009; Schade vd., 2005). Bu farklı değişkenleri gözlemleyerek IgY elde etmek için çeşitli protokoller uygulanmıştır (Michael vd., 2010; Schade vd., 2005). Temel olarak, her vakada yüksek antikor titrelerine ulaşabilmek amacıyla farklı antijenler ve hayvanlar için çoklu aşılama protokolleri test edilmiştir (Michael vd., 2010). Tavuklarda etkene spesifik IgY üretmek amacıyla karmaşık yapıdaki antijenler (virüsler, bakteriler ve parazitler) ve daha basit yapıdaki antijenler (proteinler, polisakkaritler, peptitler ve nükleik asitler) gibi farklı antijenik yapılar kullanılmıştır (Chalghoumi vd., 2009). Elde edilen veriler tavukların protein yapıdaki antijenler ile immunize edilmeleri sonrasında genel olarak spesifik antikorları ürettiğini göstermiştir. Ancak yeterli seviyede bağışıklık

tepkisi elde edilebilmesi için gereken en düşük antijenik molekül ağırlığının, memelilerde ve tavuklarda benzer olup yaklaşık olarak 5 ila 10 kDa aralığında olduğu bildirilmektedir (Schade vd., 2000). Yumurta sarısı antikorunun üretimi ve pazar durumunun şematik anlatımı 'Şekil 1.5.'te açıklandığı gibidir.

Yüksek miktarda antikor titrelerinin oluşumunu tetikleyebilmek için adjuvantların kullanımına ihtiyaç duyulur. Bu amaçla kullanılan adjuvantlar içerisinde Freund'un Tam Adjuvantı (FCA), "**altın standart**" olarak kabul edilir ve bağışıklama amacıyla en çok kullanılan adjuvandır (Schade vd., 2000). Ancak FCA, yüksek seviyede antikor titrelerinin oluşumunda en güçlü etkiye sahip olmasına karşın, uygulandığı alanlarda şiddetli inflamasyonlara yol açabilmektedir (Chalghoumi vd., 2009). Bazı çalışmalar, FCA ile aşılamanın memelilere oranla tavukların tolerasyonunun daha fazla olduğu ve tavuklarda doku hasarı oluşturmadığını göstermektedir (Bollen vd., 1996; Gassmann vd., 1990), tavuk bağışıklamak için FCA kullanan farklı çalışmalar bu sonuçlarla çelişmektedir (Olbrich vd., 2002; Wanke vd., 1996).

Freund'un tamamlanmamış adjuvantı (FIA), FCA'nın en iyi alternatiflerinden birisidir ve FCA'dan farklı olarak mikobakteri içermez (Schade vd., 2000). İmmünizasyon için ilk bağışıklama genellikle FCA kullanılarak yapılırken sonraki bağışıklamalarda, enjeksiyon bölgesinde inflamasyon oluşmaması için FIA ile gerçekleştirilmesi hayvan refahı açısından daha güvenilir bir yöntemdir (Łupicka-Słowik vd., 2014; Reddy vd., 2013).

Tavuklarda IgY üretimi için en yaygın antijen uygulama yolu, immunizasyonun genellikle göğüs kasına yapıldığı kas içi (i.m.) yoldur. Bu yöntem daha çok genç yaştaki tavuklar için uygundur. Zira boyundan yapılan deri altı enjeksiyon (s.c.) daha zor olabilir ve hayvanı gereksiz strese sokar. Yine bağışıklamanın bacak kasından yapılması topallığa neden olabilir, dolayısı ile bu bölgeye enjeksiyon işleminden kaçınılmalıdır (Schade vd., 1996). Ayrıca, non-invaziv bir yöntem için, antijen uygulaması işlemi ağız yoluyla da gerçekleştirilebileceği bildirilmektedir (Thibodeau vd., 2017).



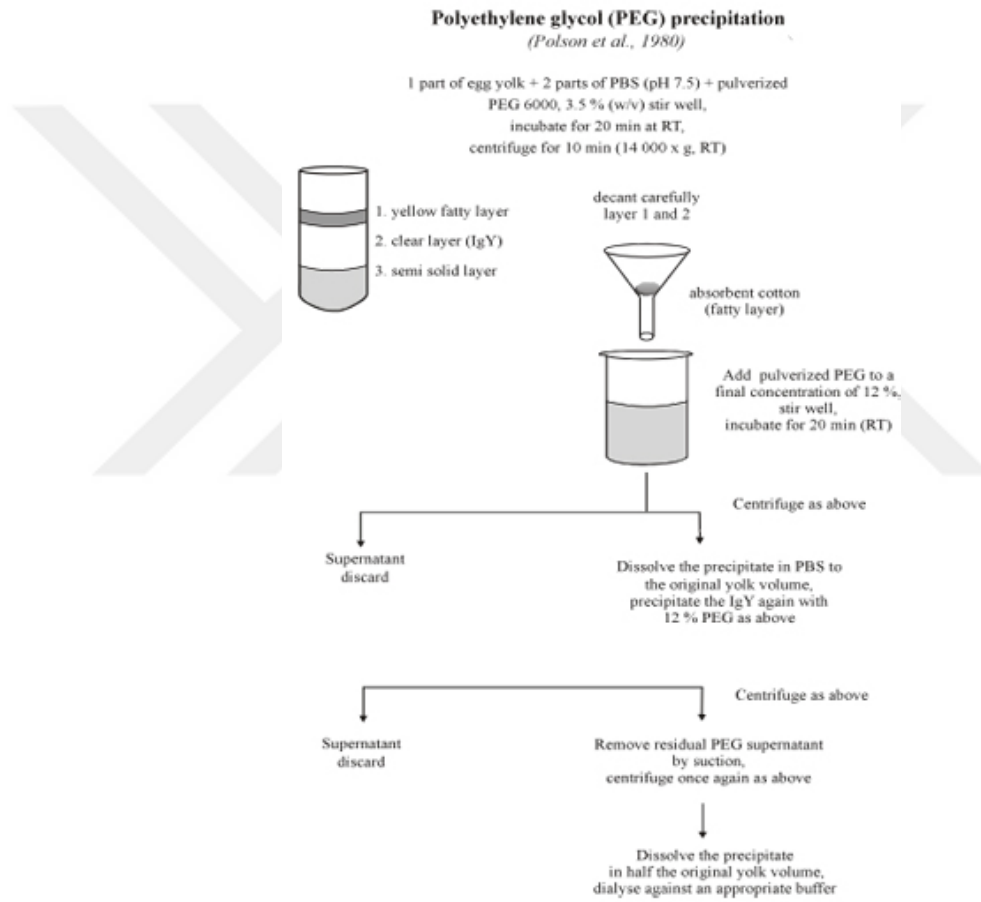
Şekil 1.5. Yumurta sarısı antikorunun üretimi ve pazar durumunun şematik anlatımı (Yakhkeshi vd., 2022)

(A) Veteriner hekimlik ve beşeri hekimlik alanlarında IgY bazlı ürünler üreten şirket sayısı. (B) Birincil antikor (pAb), ikincil antikor (sAb), monoklonal ve poliklonal antikorlar ile teşhis kitleri. ELISA; enzimle bağli immünosorbent deneyi, IC; immünositokimya, IHC; immünohistokimya, FC; akış sitometrisi, WB; western blot (Yakhkeshi vd., 2022).

Gerekli olan immunizasyon sayısı, kullanılan adjuvanta, verilen antijenin özelliklerine ve uygulama dozuna göre değişmektedir. İstenilen seviyede antikor elde etmek için, tavuklar yumurtlama dönemine girmeden önce dört veya altı hafta aralıkla en az iki bağışıklama yapılması önerilmektedir (Pereira vd., 2019). Elde edilen IgY titreleri, son immunizasyondan 14 gün sonra ölçülmelidir. Antikor titrelerinin istenilen seviyenin altında çıkması durumunda, artırmak için yumurtlama dönemi boyunca daha sık bağışıklama yapılması önerilmektedir (Schade vd., 1996). Yumurta sarısı antikorlarının titrelerindeki artış, immunizasyon uygulamasını takip eden 14. günden (Sui vd., 2011; Wen vd., 2012) ya da antijen inokülasyonunun ardından beşinci hafta itibari ile gözlemlenebilmektedir (Grzywa vd., 2014). İstikrarlı bir artışın ardından, antikor titresinde en yüksek seviyeye ulaşır ve stabilizasyon meydana gelir. Bundan sonra kademeli olarak azalır (Wen vd., 2012). Ancak takviye immunizasyon uygulamalarıyla, yumurta sarısı antikorlarını yüksek titrelerde 150 günden daha fazla tutulabileceği bildirilmiştir (Meenatchisundaram vd., 2011).

Yumurta sarısı antikorlarının izolasyonu, su içerisinde çözünebilen bir form oluşturabilmek amacıyla öncelikle lipidlerin uzaklaştırılması ve sonrasında burada bulunan

antikorların çökeltmesi yoluyla gerçekleştirilir. Yumurta sarısından IgY elde etmek için; polietilen glikol çökeltme metodu, suyla seyreltme metodu, amonyum veya sodyum sülfat çökeltme metodu, dekstran sülfat çökeltme metodu, önceden soğutulmuş propan ve aseton metodu ve suyla seyreltme, ultrafiltrasyon metodu gibi çeşitli ekstraksiyon metotları mevcuttur. Mevcut bu yöntemler arasından ‘Şekil 1.6.’da gösterilen Polson’un bildirildiği polietilen glikol çökeltme yöntemi yaygın olarak kabul görmektedir (Schade vd., 2000). Buna karşın uygun yöntemin seçimi, farklı saflaştırma dereceleri gerektirebilen amaca, ekstraksiyon ölçeğine, maliyete ve mevcut teknolojiye bağlıdır (Chalghoumi vd., 2009).



Şekil 1.6. PEG 6000 çökeltme yoluyla IgY ekstraksiyonunun şematik diyagramı (Polson vd., 1980)

PEG 6000 çökeltme yoluyla IgY'nin ekstraksiyonu, öncelikle yumurta sarısının beyazdan ayrılmasını ardından yumurta sarısında bulunan antikorların lipidlerden ve yumurta içeriğinden arındırılarak saflaştırılmasını içerir (Karlsson vd., 2004). Bu yöntem IgY'nin izolasyonunda en yaygın başvurulan metottur. Yağlı maddelerin uzaklaştırılmasına yönelik teknik, %3,5 PEG 6000 ile birlikte fosfat tamponlu salinde (PBS) seyreltilmiş yumurta

sarısının santrifüjlenmesini içerir. Daha sonra, birinci adımın süpernatantından, antikorları çöktürmek için %8,5 ve %12 PEG 6000 ile iki kez santrifüjlenir (Polson vd., 1980).

Tavuklar, yumurta sarısı içerisinde 100 ila 150 mg IgY antikorunu üretebilir ve bunun yaklaşık %1 ila %10'u spesifik antikorları oluşturur (Michael vd., 2010). Bir yılda, tek bir yumurtlayan tavuk 17 ila 35 g toplam IgY üretir (Schade vd., 2006). Araştırma için IgY üretimi esas olarak tavukta yapılmakta, tavuklar için kullanılan benzer bir bağışıklama protokolü kullanılarak kaz (Fink vd., 2017), bıldırcın (Najdi vd., 2016) gibi diğer kuşlarda aynı amaçla kullanılabilir.

1.3.5. IgY'nin Terapötik ve Profilaktik Uygulamaları

Bulaşıcı hastalıklara karşı spesifik olarak üretilen poliklonal yumurta sarısı antikorlarının kullanılması mikrobiyal direnç olasılığını en aza indirir. Bu nedenle spesifik IgY antikorları, dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına karşın insan ve hayvan sağlığında antimikrobiyal amaçla kullanım için uygun bir seçenektir (Rahman vd., 2013). Bu amaçla gastrointestinal ajanlara yönelik olarak IgY'nin antibakteriyel aktivitesi geniş çapta araştırılmıştır. IgY'nin oral uygulamalarının, sığır ve insan rotavirüsleri, enterotoksijenik *Escherichia coli* ve *Salmonella* ssp. gibi çeşitli gastrointestinal etkenlerin tedavisinde başarılı ile sonuçlandığı kanıtlanmıştır (Karlsson vd., 2004). İnsan rotavirüsü (HRV), akut infantil gastroenterit oluşumuna katkıda bulunan etkenlerin başında yer alır ve ortalama yılda bir milyondan fazla ölümle neden olur. Üç farklı rotavirüs serotipi (fare, insan ve maymun) ile bağışıklanmış tavuk yumurtalarından izole edilen IgY'nin oral yolla kullanılmasının, rotavirüs pozitif farelerde ishali önleyebildiği bildirilmiştir (Hatta vd., 1993; Yolken vd., 1988).

Yumurta sarısı antikorlarının influenza virüsüne karşı koruyucu etkisi kapsamlı araştırmalara konu olmuştur. Yapılan bir çalışmada Vietnam'daki marketlerde satılan yumurtalardan Avian Influenza A (H5N1) virüsüne karşı IgY izole edilmiştir. Sonrasında elde edilen anti-H5N1 IgY, farelerde H5N1 ve H5N2 ile enfekte edilmeden öncesinde ve sonrasında intranazal olarak uygulanmış ve hastalığın başlamasını kesin olarak önlediği bildirilmiştir (Nguyen vd., 2010). Yine Influenza B virüsüne karşı IgY'nin koruyucu etkisi araştırılmış ve anti-Influenza B IgY, intranazal olarak uygulandığında, virüse maruz kalmadan önce uygulanan farelerde influenza gelişimini önlediği ve enfeksiyon sonrası tedavi edilen farelerde ise hastalığı hafiflettiği rapor edilmiştir (Wen vd., 2012). Ayrıca kümes hayvanlarında enfeksiyona yol açan, Newcastle disease virüsü (NDV), Enfeksiyöz bursal

hastalık virüsü (IBDV), Influenza ve Reovirüse karşı etkili IgY'ler üretilmiştir (Aizenshtein vd., 2016). Tüm bu araştırmalar yumurta sarısı antikollarının çeşitli viral ajanlara karşı koruma sağladığını ve IgY ile pasif immunizasyonun mümkün olabileceğini göstermektedir.

Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC), ishal oluşumu nedeniyle bir diğer önemli sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. ETEC, yeni doğan buzağular, domuz yavruları, çocuklar ve gelişmekte olan bölgelere seyahat edenler arasında enterik kolibasilozun en yaygın nedenidir ve yılda ortalama bir milyon ölüme yol açmaktadır (Mine vd., 2002). ETEC enfeksiyonlarına karşı anti-ETEC IgY'nin sağladığı koruyucu etkisi domuz yavruları ve buzağularda araştırılmış ve her ikisinde de enfeksiyona bağlı oluşan ishali kontrol altına alabilen profilaktik ve terapötik bir yaklaşım sunduğu görülmüştür. Anti-ETEC IgY'nin ağız yolu ile kullanılmasının hayvanlarda gastrointestinal enfeksiyonların profilaksisinde başarılı olduğunun kanıtlanması, insanlarda, bilhassa bebeklerde ETEC enfeksiyonlarını önleyebileceği düşünülmektedir (Ikemori vd., 1992; Yokoyama vd., 1992).

Salmonella spp. gıda kaynaklı zehirlenmelerinin önde gelen sebeplerindedir. Etken virülans ile ilgili dış zar proteinleri, lipopolisakkaritler, flagella ve bazı suşlarda fimbrial antijenler gibi çeşitli yüzey bileşenlerine sahiptir (Mine vd., 2002). Salmonellozun kontrol edilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, buzağular ve farelerde etkenin dış zar proteinleri, lipopolisakkaritleri, veya flagella antijenlerine karşı üretilen spesifik IgY'nin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, etkene spesifik IgY antikolları uygulanan tavukların hayatta kalma oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Yokoyama ve ark., 1998). Ayrıca IgY'nin in vitro olarak *Salmonella* Enteritidis'in insan bağırsak hücrelerine yapışmasını engellediği de rapor edilmiştir (Sugita-Konishi vd., 1996).

C. difficile sporlarına karşı oral IgY uygulamasının, enfeksiyondan önce tedavi edilen farelerde hem ishal başlama süresini geciktirdiği hem de tekrarını azalttığı gözlenmiştir. Bu yüzden, *C. difficile* enfeksiyonunun önlenmesinde enfeksiyon geçirmiş kişilerin bağırsaklarında kalan sporları ortadan kaldırmak ve ishalin tekrarını azaltmak amacıyla immünoterapötik olarak spesifik IgY kullanılabileceği rapor edilmiştir (Pizarro-Guajardo vd., 2017). IgY'nin *Helicobacter pylori*'ye karşı terapötik etkisi, hem tüm hücreye hem de spesifik proteinlere yönelik antikollar aracılığıyla büyük ölçüde incelenmiştir. Anti-*H. pylori* IgY'nin oral uygulaması, in vitro olarak *H. pylori* büyümesini inhibe ettiği ve doku üzerinde nötrofil ve lenfosit infiltrasyonunda önemli bir azalma ile farelerde mide iltihabını azalttığı görülmüştür (Malekshahi vd., 2011).

IgY'nin solunum yolunda enfeksiyonlara neden olan bakteriyel patojenlere karşı koruyucu etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla üretilen anti-*Mycobacterium tuberculosis* IgY'lerin, sıçanlarda doza bağlı olarak periferik kan mononükleer hücrelerinin çoğalmasını sağladığı tespit edilmiştir. Hücrel bağışıklık tepkisini uyaran sitokin aktivitesinde artış gözlenmiştir. RT-PCR analizi, interlökin-2 (IL-2) ve interferon gama'nın (IFN- γ) mRNA miktarlarının arttığını tespit edilmiştir. Bu bulgular, üretilen anti-*M.tuberculosis* IgY'nin, bağışıklık tepkisini uyaran bir immünoterapötik olarak önemli potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Sudjarwo vd., 2017). Yine *Acinetobacter baumannii*'nin çok ilaca dirençli suşlarına karşı üretilen spesifik IgY'lerin laboratuvar ortamında farelerde bakteri üremesini durdurduğu, enfekte farelerin ölüm oranını ciddi oranda azalttığı ve akciğer inflamasyonunu yatıştırdığı bildirilmiştir (Shi vd., 2017).

IgY'nin aynı zamanda *Prevotella intermedia*'nin neden olduğu diş eti enfeksiyonlarına karşı terapötik etkisi de araştırılmıştır. Spesifik IgY'nin, sıvı ortamda bakteriyel üremeyi inhibe ettiği ve *P. intermedia* kaynaklı diş eti iltihabı olan farelerde terapötik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Hou vd., 2014). Yine sıvı ortamda *Fusobacterium nucleatum*'a karşı üretilen terapötik IgY'nin biyofilm oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Anti-*F. nucleatum* IgY'nin periodontal hastalığı olan farelerde enfeksiyondan sonra uygulandığında kemik kaybını azalttığı ve dolayısıyla terapötik bir fonksiyonun olduğuda bildirilmiştir (Xu vd., 2012). Ayrıca IgY'nin diş çürüklerini önleme potansiyeli üzerine birçok araştırmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışma, farelerde çürük oluşumuna neden olan *Streptococcus mutans*'a karşı IgY içeren soya fasulyesi sütünün etkisi araştırıldı. Bu sütle beslenen farelerin, diş biyofilmindeki *S. mutans* miktarında azalma tespit edildi ve soya fasulyesi sütünün alınmasından 15 gün sonra bile tükürükte halen IgY'nin bulunduğu rapor edildi (Bachtiar vd., 2015). Aynı araştırmacılar farklı bir çalışmada, *S. mutans*'ın çekirdek algılama sinyal reseptörü olan ComD proteinine karşı spesifik IgY'lerin etkisi incelendi. Antijene spesifik olarak üretilen anti-ComD IgY'lerin, in vitro olarak, çürüğü olan ve olmayan kişilerin ağız boşluğundan *S. mutans*'ın biyofilm oluşumunu önlediği görüldü (Bachtiar vd., 2016).

Suda yaşayan canlılarda enfeksiyona neden olan etkenlere karşı da yumurta sarısı antikorlarının antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Karideslerin (*Litopenaeus vannamei*) ana ölüm nedeni olan *Vibrio* spp.'ye karşı IgY üretilmiş ve anti-*Vibrio* IgY içeren toz formdaki yumurta sarısının *V. harveyi* ve *V. parahaemolyticus* ile enfekte edilmiş karideslerin ölüm oranını ciddi ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir (Gao vd., 2016). Ayrıca *Propionibacterium acnes* bakterisine karşı üretilen IgY'nin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, özgül antikorun,

bakterilerin üremesini ve in vitro biyofilm oluşumunu engelleyerek akne sağaltımında antibiyotiklere muhtemel bir alternatif oldukları gösterilmiştir (Revathy vd., 2014). Farklı bir çalışmada IgY'nin, fırsatçı enfeksiyonlara sebep olan ve birçok antimikrobiyale direnç geliştiren *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı koruyucu etkisi incelenmiştir. Araştırma sonucunda anti-*P. aeruginosa* IgY'nin, hücrel immün yanıtı artırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, spesifik IgY'lerin, kistik fibroz teşhisi konulan hastalarda profilaksi amacıyla kullanılabilirliğini göstermiştir (Thomsen vd., 2016).

IgY'nin kolay bir şekilde saflaştırılması anti-venom seroterapisinde de kullanılması açısından değerlendirilmiştir. *Bothrops* sp. yılan cinsinin zehrine karşı anti-venom IgY üretilmiştir. Bu antikorların zehri nötralize ettiği ve farelerde çok az yan etki gösterdiği veya hiç yan etki göstermediği rapor edilmiştir (Araújo vd., 2010). Farklı bir çalışmada Peru yılanı olarak adlandırılan *Bothrops atrox*'un zehrine karşı anti-venom IgY üretilmiştir. Bu anti-venom IgY, *Bothrops brazili*'nin zehriyle önemli ölçüde çapraz reaksiyon göstermiş ve sadece *B.atrox* anti-venomu olarak değil, aynı zamanda farklı türlerden zehirlerle çapraz reaksiyon araştırması için bir araç olarak da kullanılabilirliği bildirilmiştir (Mendoza vd., 2012).

Tetanoz, *C. tetani* tarafından üretilen TeNT nörotoksininin neden olduğu, insanlar ve hayvanlar için yaşamı tehdit eden bir hastalıktır. Hastalığın tedavisinde çoğunlukla atlardan ve insanlardan elde edilen antitoksinler kullanılmaktadır. Fakat bu antitoksinlerin kullanılmasında birtakım klinik yan etkiler ve dezavantajların olduğu bildirilmektedir. IgY teknolojisi hayvanlar için geleneksel prosedürlere göre daha az stres yaratan ve bir çok avantajı olan kabul görmüş alternatif bir metottur. Bu tez çalışması ile IgY teknolojisi kullanılarak hayvan refahı, etik değerler, **3R; Replacement, Reduction, Refinement** 'başka şey kullanma, azaltma, arındırma' kuralları gözetilerek tetanoz toksininin tanı ve tedavisinde mevcut uygulamalara alternatif olarak kullanılabilir anti-*C. tetani* IgY antikorlarının izole edilmesi ve etkene spesifik olarak üretildiğinin doğrulanması amaçlandı. Spesifik tetanoz antikorlarının elde edilmesi sonrasında bu antikorların gelecekte insanlarda ve evcil hayvanlarda immünoterapi, tanı ve teşhis amacıyla alternatif değerli bir terapötik araç olarak kullanılabilirliği hedeflenmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 05.06.2021 tarih ve 843 sayılı kararı ile bu çalışmanın yapılması etik açıdan uygun görüldü (Ek-1). Tez çalışmasında yöntem ve buna bağlı olarak yapılan isim değişikliği ise yine aynı kurulun 07.03.2023 tarih ve 843-1 sayılı kararı ile uygun bulunmuştur (Ek-2). Bu tez çalışması T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, TAGEM/HAYSÜD/Ü/22/A4/P46175 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

2.1.1. Deneysel Hayvanı ve İlgili Materyal

Bu tez çalışmasında; Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Etçi Tavuk Yetiştirme ve Islahı Bölümü bünyesinde bulunan 22 haftalık yaşta, 25 adet Anadolu-T Irkı etçi damızlık tavukların saf hatları kullanıldı. Tavukların yerleşimi için kümes ortamında 50x50x60 cm ebatlarında bireysel galvaniz kafesler, bağışıklama amacı ile 1 ml'lik 26G, 13 mm çaplı insülin enjektörü ve antiseptik olarak povidon iyot kullanıldı.

2.1.2. İmmünizasyon

Tesadüfi seçilen tavukları immunize etmek amacıyla tetanoz toksoidi olarak prospektüsünde (Ek-3) 1 ml içerisinde 30 IU tetanoz toksoidi içirdiği belirtilen 'Cloteid 4 inj' ticari aşı kullanıldı. 1 IU tetanoz toksoidi 0,03384 mg olarak tanımlanmıştır (Tizard, 2019). Yüksek antikor titrelerinin uyarılması amacı ile aşı ile beraber Freund'un Tam Adjuvantı (FCA, 5881, Sigma-Aldrich, Almanya) ve Freund'un tam olmayan adjuvantı (FIA, F5506, Sigma-Aldrich, Almanya) kullanıldı.

2.1.3. Kullanılan Cihazlar, Kimyasal Malzemeler ve Kitler

Çalışma boyunca kullanılan cihazlara ait bilgiler 'Çizelge 2.1.'de açıklandığı gibidir.

Çizelge 2.1. Kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihazlar	Model ve Firma	Ülke
Mikroplaka Okuyucu	BioTek 800 TS TM	ABD
Mikrolitre ve Hematokrit Santrifüj	Nuve, NF 048	Türkiye
Analitik Terazi	And, GR-200	Japonya
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Are, F20500162	İtalya
Pipetör	Brand, Transferpette	Almanya
Vorteks	HumaTwist	Almanya
Soğutmalı Santrifüj	Hermle Z 326 K	Almanya
Ultra Saf Su Cihazı	Elix® Essential 10 UV	Fransa
Elisa Okuyucu	Chromate 4300 Awareness Technology	ABD
Termal Döngüleyici	LongGene® A300	Çin
Jel Elektropherez Seti	Mini Jel Tankı, ThermoFisher Scientific	ABD
Transilluminator	BIO-HELIX - BP001CU	Tayvan
Western Blot Transfer Sistemi	IBlot 2 Dry Blotting, ThermoFisher Scientific	ABD
Western Cihazı	Invitroge iBind TM Flex, ThermoFisher Scientific	ABD
Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı	GenBox ERBiyotek	Türkiye
İnkübatör	Miprolab MSİ 120	Türkiye
Otoklav	Alp CL-32L	Japonya

Yapılan tez çalışmasında IgY izolasyonu için; PBS (Phosphate Buffered Saline, No:P4417, Sigma Aldrich, Almanya), PEG (Polyethylene Glycol 6000) (Sigma Aldrich, Almanya), Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, (No: 66012) (Thermo Fisher Scientific, ABD), Whatman (No: WHA1001125) kalitatif filtre kâğıdı (Merck, Almanya), eppendorf ve falkon tüpleri kullanıldı.

Protein miktarı ölçümü amacıyla; Coomassie Plus Protein Assay Reagent (No:1856210, Thermo Fisher Scientific ABD), Bovine Serum Albümin (BSA), Coomassie Brilliant blue G-250 kullanıldı. Serolojik izleme amacı ile Tavuk Total İmmünoglobulin ELISA Kiti (Mybiosource No: MBS743332, ABD) kullanıldı.

SDS-PAGE için, amonyum sülfat, asetik asit, NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) (No: NP0007 Thermo Fisher Scientific, ABD), Coomassie Brilliant blue Staining, NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X) (No: NP0009 Thermo Fisher Scientific, ABD), Bolt™% 4-12 Bis-Tris Plus Jel (No: NW04120BOX Thermo Fisher Scientific, ABD), İnvitrogen SeeBlue Plus 2 Prestained Standart Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı.

Western Blot için; iBlot™ 2 Transfer Stacks (No: IB23002 Thermo Fisher Scientific, ABD), iBind™ Flex Solution Kit (No: SLF2020 Thermo Fisher Scientific, ABD), Rabbit anti-Chicken IgY (H+L) Secondary Antibody, Biotin (No: 31401 Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı.

Agar Jel İmmunodifüzyon Testi (AGID) uygulamasında; Noble Agar (A5431, Sigma Aldrich, Almanya), fenol, sodyum klorür ve distile su kullanıldı.

Çabuk Lam Aglitinasyon Testi uygulamasında; lam, pipetör (Brand, Transferpette, Almanya) ve ‘Cloteid 4 inj’ ticari aşısı kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Deney Hayvanları

Bu tez çalışmasında; Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Etçi Tavuk Yetiştirme ve İslahı Bölümü bünyesinde 2015 yılından beri ıslah çalışmaları yürütülen ve T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından 2020 yılında ırk tescili yapılan 22 haftalık yaşta, 25 adet Anadolu-T Irkı etçi damızlık tavukların saf hatları kullanıldı. Kullanılan tavukların dağılımı ‘Çizelge 2.2.’de, kümes içerisindeki yerleşimleri ise ‘Şekil 2.1.’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan tavuk gruplarının dağılımı

Saf Hatlar	Deney Grubu	Kontrol Grubu
A ₁ (1. ana hattı)	3 adet	2 adet
A ₂ (2. ana hattı)	3 adet	2 adet
A ₃ (3. ana hattı)	3 adet	2 adet
B ₁ (1. baba hattı)	3 adet	2 adet
B ₂ (2. baba hattı)	3 adet	2 adet



Şekil 2.1. Deney hayvanlarının bireysel kafesler içerisinde kümes yerleşimi

Yaklaşık iki yıl sürecek deneyler için gerekli hayvan etik kurul izni, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 05.06.2021 tarih ve 843 sayılı karar ile alındı. Daha sonra tez çalışmasında kullanılacak olan tavuklar 22 haftalık yaşa geldiklerinde verimli bir şekilde bakılabilmesi amacıyla ‘Şekil 2.2.’de gösterildiği gibi kümes ortamında bireysel olarak kafeslere yerleştirildi.

Kullanılan deney hayvanları kümes ortamına alındıktan sonra gerekli ısı, ışık, nem, temiz hava, temiz içme suyu ve ırka uygun formüle edilmiş günlük yem ile beslenildi. Mental ve fiziksel durumları tez çalışması boyunca günlük olarak kontrol edildi.



Şekil 2.2. Deney hayvanlarının bireysel kafesler içerisinde kümes yerleşimi-2

2.2.2. İmmunizasyon

22 haftalık yaşa gelen her bir deney hayvanından her bağışıklama öncesinde ve 14 gün sonrasında serolojik izleme amacı ile kanat veninden 1 ml kan alındı. Toplanan kan örnekleri, 3000 rpm'de 10 dakika (dk) santrifüj edilerek serumları çıkarıldı. Serumlar deney hayvanları kodu ve alınma tarihi ile etiketlenerek -18°C kaldırıldı. Kan alımından 6 saat sonrasında toksoid olarak kullanılan 'cloteid 4 inj' aşısı içerisindeki toksoid miktarı hesaplanarak, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ toksoid içerecek şekilde konsantrasyonu belirlendi. 'Çizelge 2.3.'te gösterildiği gibi deney grubundaki tavuklara 3 kez ve 4 haftada bir kas içi (i.m.) antijen enjeksiyonu yapıldı.

Deney gruplarına ilk enjeksiyonda 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ toksin içerecek şekilde 167 mg aşısı + 333 mg PBS (fosfat tamponlu salin) eşit hacimde FCA (500 mg- Freund's Complete Adjuvant, F5881, Sigma-Aldrich) ile birleştirildi. Toplam 1 ml hacimdeki antijen + adjuvant solisyonu vortekslenerek birbiri ile iyice karıştıktan sonra göğüs kasından 4 farklı bölge içerisine enjekte edildi.

İlk immunizasyon sonrasında ikinci ve üçüncü enjeksiyonlarda, yine aynı miktarda toksoid ve PBS karışımı eşit hacimde IFA (Freund's Incomplete Adjuvant, F5506, Sigma-

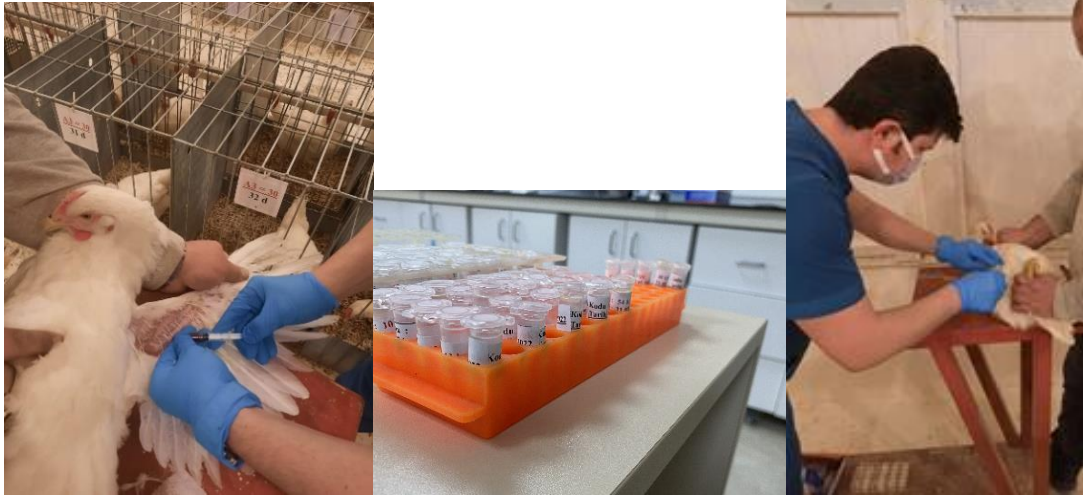
Aldrich) ile bileştirilerek toplam 1ml hacimdeki antijen + adjuvant solisyonu yine göğüs kasından 4 farklı bölge içerisinde ‘Şekil 2.3.’te gösterildiği gibi enjekte edilerek immunizasyon tamamlandı.

Kontrol grubunda yer alan deney hayvanlarına aynı hacimde PBS tamponu (500 mg) ve adjuvant (500 mg, FCA ve IFA), toplam 1ml hacimde yine göğüs kasından enjeksiyon yapılarak immunizasyon işlemi tamamlandı.

Çizelge 2.3. İmmunizasyon işlemi

Antijen	Adjuvant	Doz	Toplam Hacim	Veriliş Yolu	Yaş	Aşılama Grubu
<i>C. tetani</i> toksoidi + Adjuvant	FCA	150 µg/ml toksoid + PBS + 0,5 ml adjuvant	1 ml	I.M.	22 haftalık	Deney Grubu
<i>C. tetani</i> toksoidi + Adjuvant	IFA	150 µg/ml toksoid + PBS + 0,5 ml adjuvant	1 ml	I.M.	26 haftalık	Deney Grubu
<i>C. tetani</i> toksoidi + Adjuvant	IFA	150 µg/ml toksoid + PBS + 0,5 ml adjuvant	1 ml	I.M.	30 haftalık	Deney Grubu
Adjuvant + PBS	FCA	0,5 ml FCA+ 0,5 ml PBS	1 ml	I.M.	22 haftalık	Kontrol Grubu
Adjuvant + PBS	IFA	0,5 ml IFA+ 0,5 ml PBS	1 ml	I.M.	26 haftalık	Kontrol Grubu
Adjuvant + PBS	IFA	0,5 ml IFA+ 0,5 ml PBS	1 ml	I.M.	30 haftalık	Kontrol Grubu

Bağışıklama işlemi tamamlandıktan (üçüncü enjeksiyondan) bir hafta sonra yumurtalar toplanmaya başlandı, iki ay boyunca toplanan yumurtalar (yumurta/gün) günlük olarak etiketlenip +4°C’de IgY izolasyon işlemine kadar ‘Şekil 2.4.’te görüldüğü gibi muhafaza edildi.



Şekil 2.3. İmmünizasyon öncesi kan alma ve immünizasyon işlemi



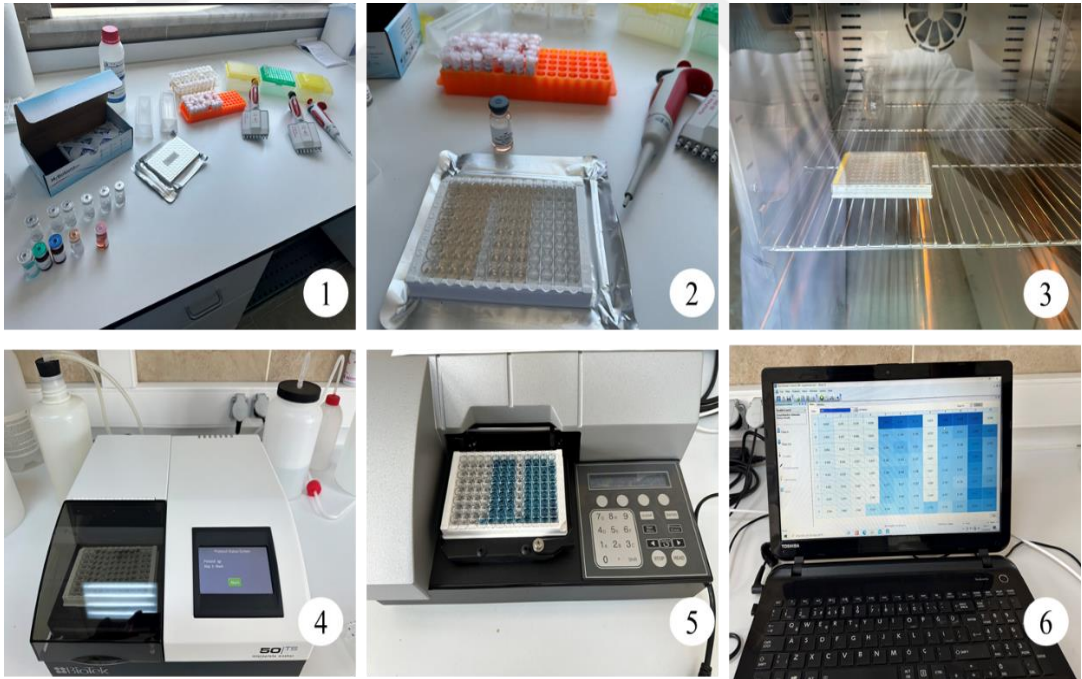
Şekil 2.4. IgY izolasyon işlemine kadar +4°C'de depolanan yumurtalar

2.2.3. ELISA ile Total Antikor Titrasyonu

İmmünizasyon işlemi tamamlandıktan sonra deney hayvanlarının kodu ve kan alınma tarihleri ile etiketlenen serumlardan, ‘Şekil 2.5.’te gösterildiği gibi total antikor titre titrasyonu ölçüldü. Bu amaçla öncelikle Tavuk Total İmmünoglobulin ELISA Kiti (Mybiosource, Catalog MBS743332, ABD)’nin bileşenleri (standartlar, konjugat, substrat A, substrat B ve stop solüsyonu) ve serum örnekleri oda sıcaklığına (20-25°C) getirildi.

Bağışıklama öncesi ve 1. immunizasyon sonrası (toplam 25+25=50 adet), 2. bağışıklama öncesi ve 14 gün sonrası (toplam 25+25=50 adet), son bağışıklama öncesi ve 14 gün sonrası (toplam 25+25=50 adet) olmak üzere toplam 150 adet serum örneği üreticinin belirttiği şekilde PBS ile 1/4 oranında (100 µl serum örneği + 300 µl PBS) seyreltildi. Yıkama solüsyonu için 10 ml yıkama solüsyonu konsantresi 990 ml deiyonize suyla seyreltilerek 1.000 ml olarak hazırlandı. ELISA plaklarındaki ilk 6 kuyucuğa (1A-1F) 100 µl standart, 7. kuyucuğa (kör kontrol) PBS eklendi. 8. kuyucuk boş bırakıldı. 2A kuyucuğundan başlamak üzere serum örnekleri kuyucuklara yerleştirildi.

PBS olan hariç olmak üzere her kuyucuğa 50 µl konjugat eklenerek iyice karıştırıldı ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Otomatik yıkayıcıda seyreltilmiş yıkama solüsyonu ile plaka beş kez yıkandı ve kurutuldu. Ardından kör kontrol kuyucuğu da dahil her kuyucuğa sırasıyla 50 µl substrat A ve 50 µl substrat B ilave edildi ve 37°C'de 15-20 dk kadar inkübasyona bırakıldı. Sonrasında kör kontrol kuyucuğu da dahil olmak üzere her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek iyice karışması sağlandı. Ardından numunelerin optik yoğunluğu (O.D.), bir mikroploka okuyucu yardımıyla 450 nm'de spektrofotometrik ölçüm yoluyla değerlendirildi.

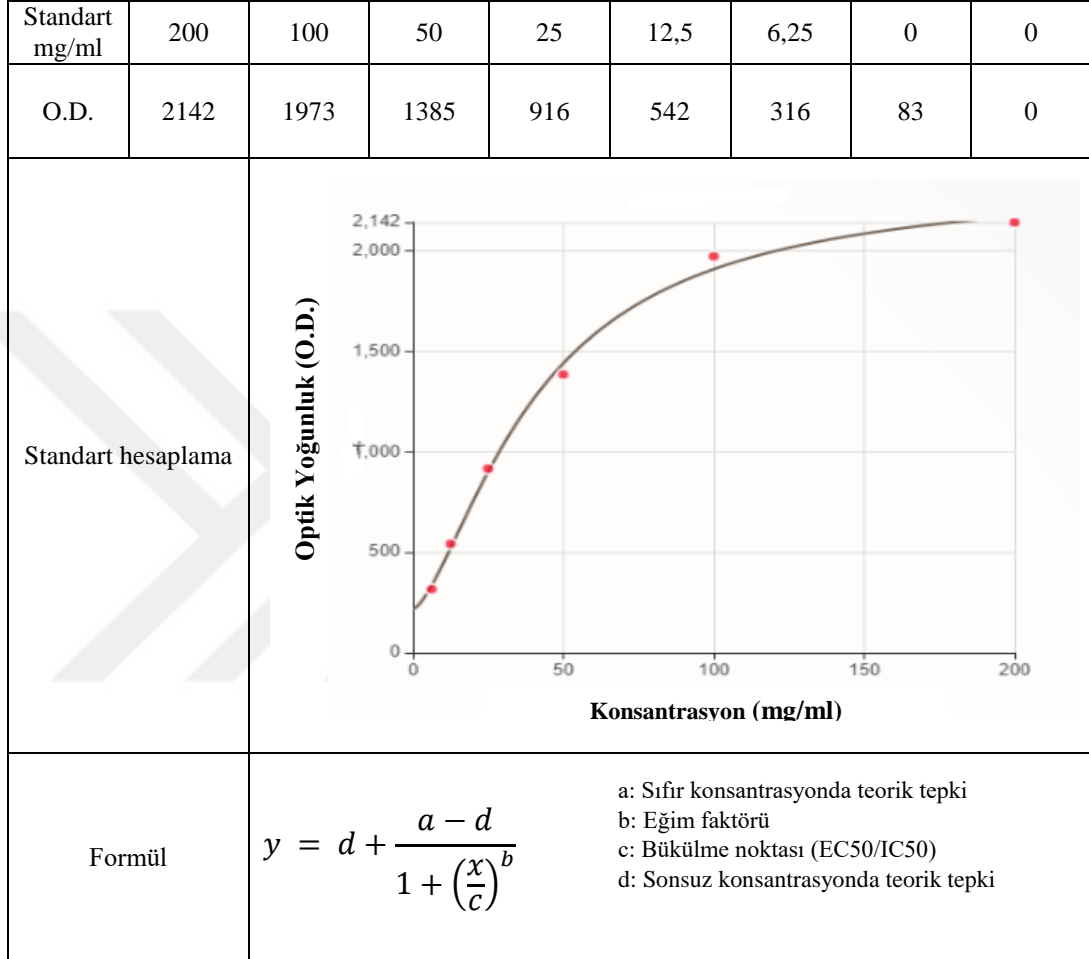


Şekil 2.5. ELISA çalışmaları

1-Kit bileşenleri ve serumların oda sıcaklığına (20-25 °C) gelene kadar bekletilmesi. 2-Standartlar ve numunelerin plate içerisine yerleşimi. 3-Inkübasyon (37 °C'de 1 saat). 4-Otomatik yıkayıcıda plakanın yıkanması. 5- Mikroploka okuyucu yardımıyla 450 nm'de spektrofotometrik ölçüm aşaması. 6-Örneklerin optik yoğunluğu (O.D.)'nun tespit edilmesi.

2.2.3.1. ELISA Testinin Değerlendirilmesi

Tespit edilen optik yoğunluk (OD) değerleri, üreticinin belirttiği hesaplama yöntemine göre ilişkilendirilen standart bir eğriye göre ‘Şekil 2.6.’daki gibi hesaplandı.



Şekil 2.6. Elisa testinin değerlendirilmesi

2.2.4. İmmüoglobülin Y (IgY) İzolasyonu

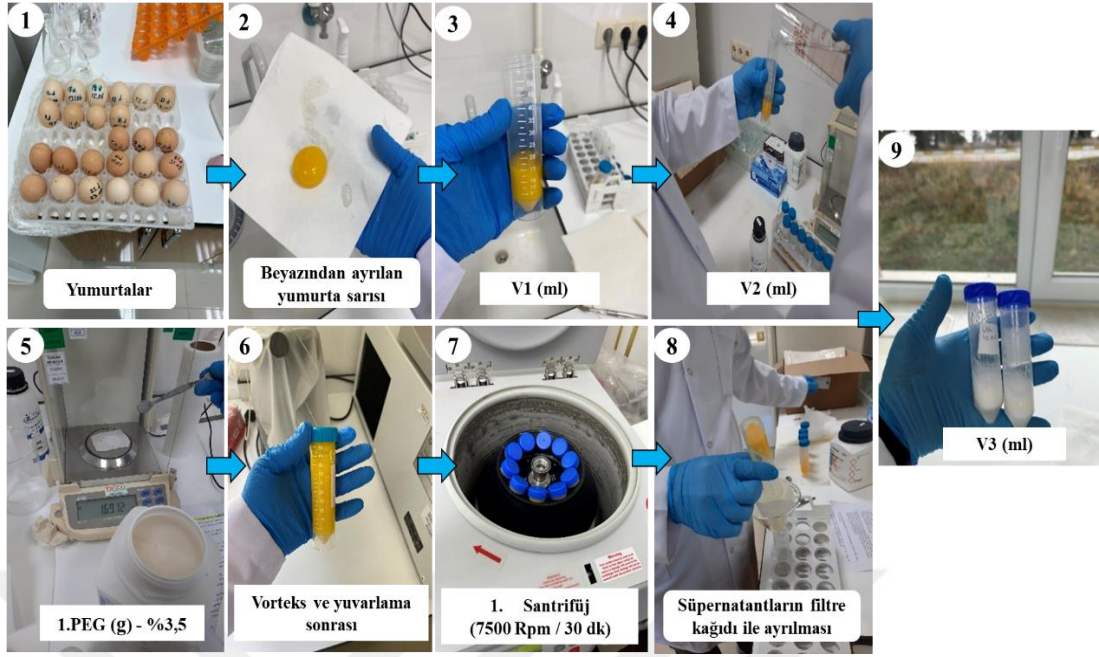
Yumurta sarısı antikorlarının izolasyonu, Polson vd. (1980) tarafından bildirilen polietilen glikol 6000 çökeltme metodu kullanılarak ‘Çizelge 2.4.’te gösterilen örnek protokole göre gerçekleştirildi.

Çizelge 2.4. PEG 6000 ekstraksiyon örnek uygulama tablosu

Yumurta Numarası	1	2	3
Yumurta Sarısı Hacmi: V1 (ml)	15	14	13
PBS (2xV1) PBS +V1= V2 (ml)	(2x15) PBS+15 = 45	(2x14) PBS+14 = 42	(2x13) PBS+13 = 39
1.PEG (g) = %3,5 x V2	1,58	1,47	1,37
Santrifüj Sonrası Filtrasyon: V3 (ml)	31	29	25
2.PEG (g) = %8,5 x V3	2,63	2,47	2,13
PBS İçinde Çözünen Topak: V4 (ml)	10	10	10
3.PEG (g) = %12 x V4	1,2	1,2	1,2
PBS İçinde Çözünen Topak: V5 (ml)	1,2	1,2	1,2
Diyaliz Sonrası Hacim: V6 (ml)	1,7	1,7	1,7

İzolasyon için immunize edilen ve edilmeyen tavuklardan bireysel olarak yumurtalar toplandı. Her bir yumurta kırılmadan önce alkol yardımıyla dezenfekte edildikten sonra özenle kırılarak sarısı ve beyazı, yumurta sarı kaşığı yardımıyla birbirinden ayrıldı. Ardından filtre kâğıdına aktarılan yumurta sarısı kâğıt üzerinde dairesel hareketler yapılarak içerisinde kalan yumurta beyazından arındırıldı. Sonrasında yumurta sarısının zarı bistüri yardımıyla kesilerek akan yumurta sarısı 50 ml'lik falkon tüpüne dökülerek hacmi kaydedildi (V₁).

Yumurta sarısı hacminin (V₁), iki katı PBS (V₂), falkon tüpüne aktarıldı ve toplam hacmin ($\Sigma V_1 + V_2$) %3,5'u kadar toz halindeki PEG 6000 gram olarak falkon tüpüne eklenip vortekslendi ve 10 dakika elle yuvarlandı. Sonrasında falkon tüpleri, 30 dakika boyunca 7500 rpm'de +4°C'de santrifüj edildi. Falkonlardaki oluşan süpernatantlar huni içerisine yerleştirilen katlanmış filtre kâğıdından geçirilerek süzüldü ve yeni bir falkona aktarıldı (V₃). Böylece 'Şekil 2.7.'de de gösterildiği gibi yumurta sarısından lipitler uzaklaştırılmış oldu.



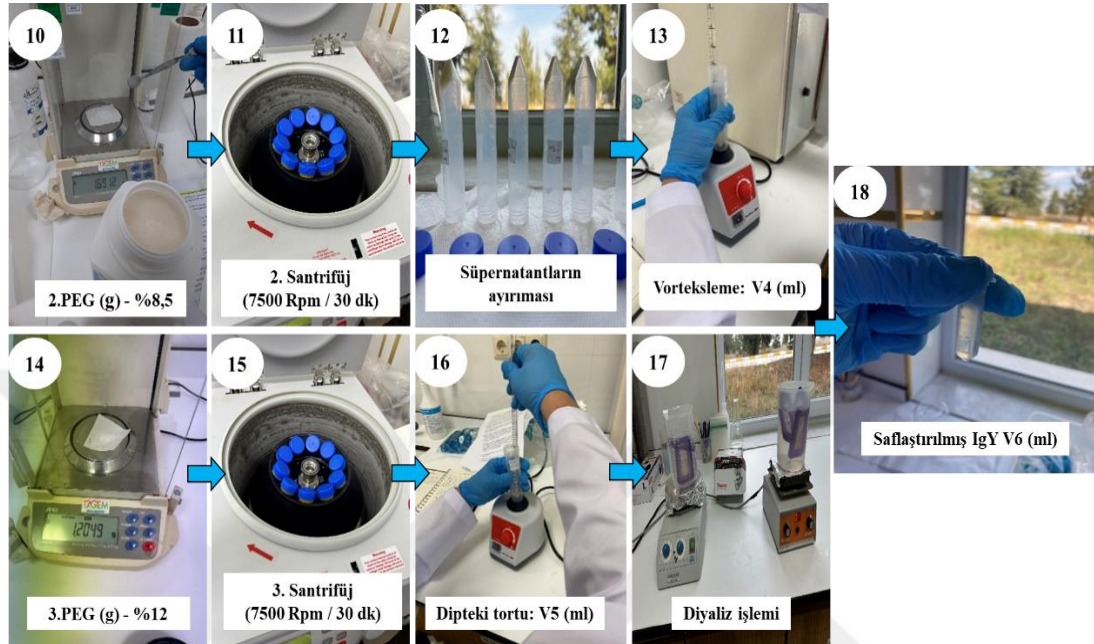
Şekil 2.7. PEG 6000 lipidlerin uzaklaştırılması

V_3 hacminin %8,5'u kadar PEG 6000 gram olarak tüp içerisine eklenerek vortekslendi ve 10 dakika süre ile elde yuvarlandıktan sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 7500 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Falkon bir kaba boşaltılarak ters çevrilerek süpernatant kısmı atıldı. Falkonun içerisine 1 ml PBS eklenerek kapağı açık şekilde cam bir palet yardımı ile dikkatli bir şekilde vortekslenerek dipte kalan kısım çözdürüldü. Sonrasında son hacim (V_4) 10 ml olacak şekilde PBS falkona eklendi. V_4 hacminin %12'si PEG 6000 gram olarak (1,2 gram) eklenerek vortekslendi. Sonrasında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 7500 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi ve tekrar süpernatant kısmı atıldı.

Son pellet 800 μl PBS içerisinde kapağı açık şekilde cam bir palet yardımı ile dikkatli bir şekilde vortekslenerek çözdürüldü (V_5) ve mikrodiyaliz kapsülüne aktarıldı. Kapsül içerisinde %0,1 NaCl çözeltisi içerisinde manyetik karıştırıcıda gece boyu diyalize bırakıldı. Ertesi sabah %0,1 NaCl çözeltisi PBS ile değiştirildi ve üç saat kadar daha diyaliz edildi. Diyaliz tamamlandığında IgY özü son hacmi (V_6) efendorf tüplere transfer edildi ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Yumurta sarısından IgY antikorların ekstraksiyonu, Polson'un bildirdiği polietilen glikol 6000 çöktürme yöntemine göre gerçekleştirildi. Bu yöntem yumurta sarısından lipidlerin uzaklaştırılması ve birinci adımın süpernatantından toplam IgY'nin çökeltmesi olmak üzere iki önemli adımı içermektedir.

Emek yoğun olarak gerçekleştirilen bu işlemler her bir yumurta için tek tek yapıldı. Polietilen glikol çöktürme protokolünün birinci adımın süpernatantından toplam IgY'nin çöktürülmesine ilişkin akış diyagramı 'Şekil 2.8.'de gösterilmiştir.



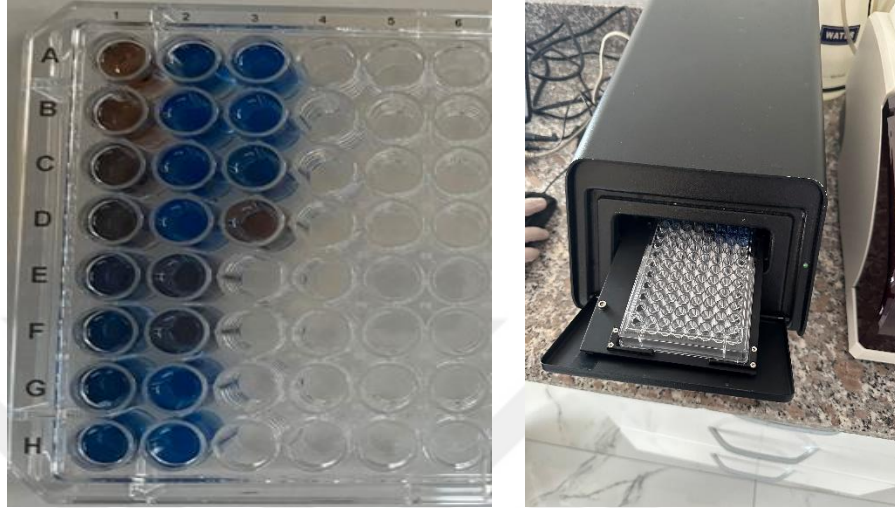
Şekil 2.8. PEG 6000 birinci adımın süpernatantından toplam IgY'nin çöktürülmesi

2.2.5. Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması

İzole edilen IgY antikorlarının protein konsantrasyonu Bradford protein tayin yöntemi (Bradford, 1976) ile Coomassie Plus Protein Assay Reagent kullanılarak ölçüldü. Analiz için öncelikle 100 mg Coomassie Brilliant blue G-250 boya, 50 ml %95'lik etanol içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan çözeltinin üzerine 100 ml %85'lik fosforik asit eklenerek boyanın çözülmesi beklendi. Ardından karışımın üzerine 850 ml distile su eklenerek toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı ve Bradford reaktifi olarak analiz için +4°C'ye kaldırıldı.

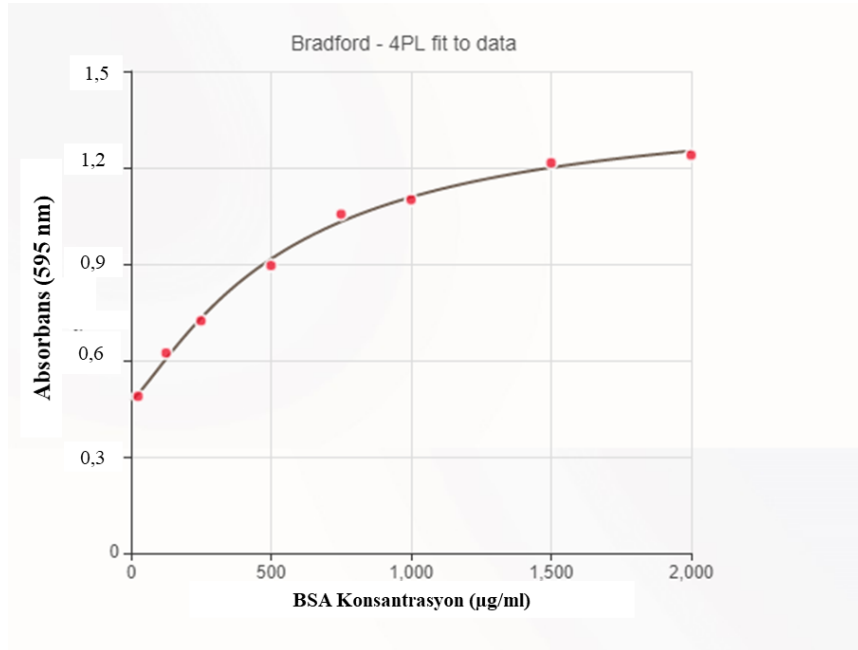
Protein standardı olarak Coomassie Plus Protein Assay Reagent ölçüm kiti içerisinde çıkan 2 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) kullanıldı. İlk olarak, üretici tarafından belirtilen seri dilüsyonlar (0 µg/ml, 25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1.000 µg/ml, 1.500 µg/ml, 2.000 µg/ml) hazır hale getirildi. Saflaştırılan yumurta sarısı antikorlarından absorban okuması için kuyucukların her birine 10 µl eklendi ve üzerlerine öncesinde hazırlanmış olan Coomassie Brilliant blue G-250 boyasından 300 µl hacimde ilave edildi ve karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 5-10 dk inkübasyona bırakıldı. Sonrasında

‘Şekil 2.9.’da gösterildiği gibi mavi renk oluşumu gözlemlenerek 595 nm’de mikropate okuyucuda (Chromate 4300) ölçüldü. Ardından‘Şekil 2.10.’da oluşturulan standart eğriye göre dört parametrelili logistik regresyon analizi kullanılarak örneklerdeki protein miktarı hesaplandı.



Şekil 2.9. Bradford sıvısı solüsyon içindeki protein (BSA) miktarına göre renk değişimi ve absorbans okuması

Plate; 1A en düşük protein konsantrasyonu, 1H en yüksek protein konsantrasyonu, 2. ve 3. kuyucuklar; IgY örnekleri.



Şekil 2.10. Bradford protein standart eğrisi

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

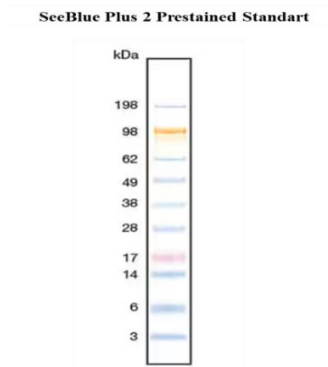
SDS-PAGE için %4'lük yükleme jeli ve %12'lik ayırma jeli içeren farklı akrilamid konsantrasyona sahip Bolt™%4-12 Bis-Tris Plus Jel (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. İzole edilen IgY'lerden 'Çizelge 2.5.'te gösterilen oranlarda örnekler (39 µl IgY, 15 µl LDS Sample Buffer, 6 µl Sample Reducing Agent) hazırlandı.

Çizelge 2.5. 10 µl'lik örnek için üreticinin tavsiye ettiği solüsyon miktarları

Kullanılan Solüsyon	Miktarı	Toplam Hacim
LDS Sample Buffer	2,5 µl	10 µl
Sample Reducing Agent	1 µl	
Bilinmeyen Örnek	6,5 µl	

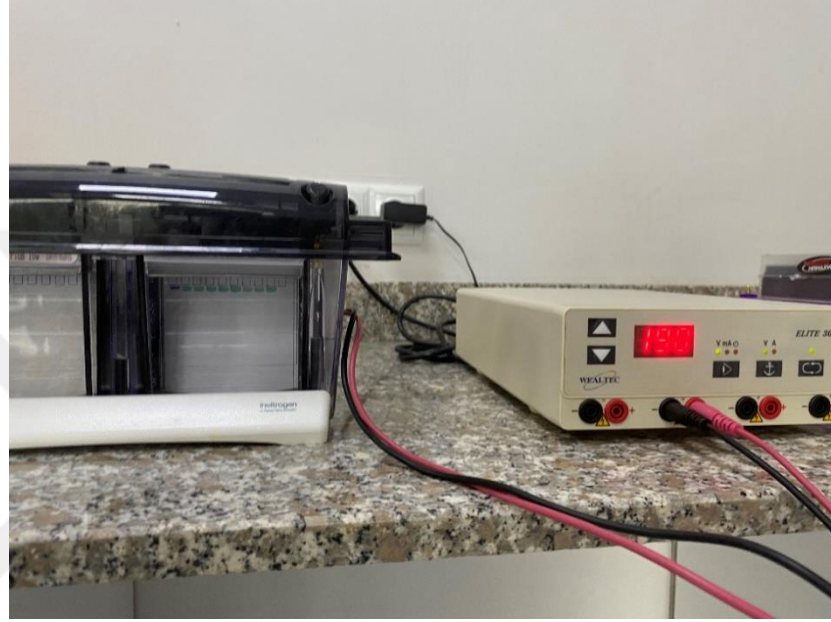
Hazırlanan tüpler termal döngüleyici (LongGene® A300, Çin)'de 70°C'de 10 dakika inkübe edildi ve inkübasyon sonunda +4°C'de bir süre bekletildi. Yürütme işlemi için 950 ml distile suya 50 ml SDS çalıştırma tamponu eklenerek Running Buffer hazırlandı.

Protein molekül ağırlığı belirleyicisi olarak 'Şekil 2.11'de gösterilen İnvitrogen SeeBlue Plus 2 Prestained Standart Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Birinci kuyucuğa marker diğer kuyucuklara IgY örnekleri dikkali bir şekilde yüklendi. Ardından 'Şekil 2.12.'de gösterildiği gibi 190 voltta yaklaşık olarak 30-35 dk yürütme işlemi yapıldı.



Şekil 2.11. SDS-PAGE analizinde kullanılan molekül ağırlık belirleyicisi İnvitrogen SeeBlue Plus 2 Prestained Standart Ladder

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel kapakların içinden çıkartılarak tarak kısımları kesildi ve %1 Coomassie Blue Staining boyama solüsyonu içerisinde 15 dakika bekletildi. Daha sonra Destaining Solüsyonu içerisine alınarak protein bantları görünene kadar yıkama yapıldı. Yıkama işleminin ardından transilluminator (BluPAD Dual LED Blue/ White Light, Tayvan) cihazında jelin görüntüsü alındı.

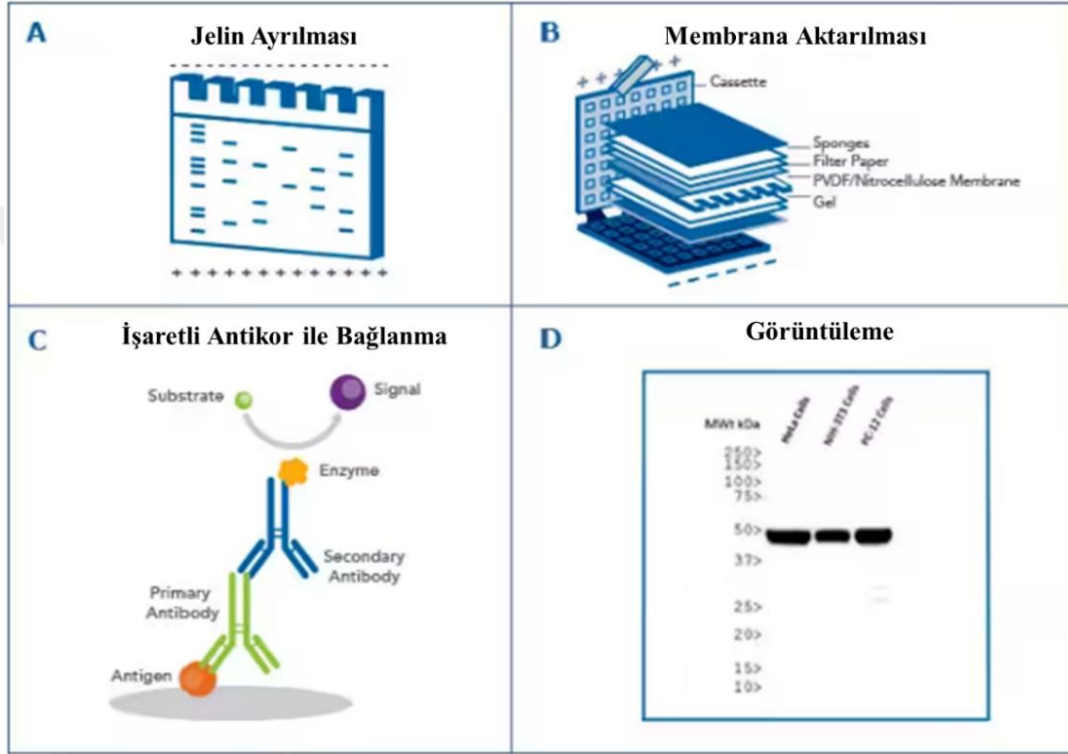


Şekil 2.12. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) analizi

2.2.7. Western Blot

Hazırlanan SDS-PAGE jelinin nitroselüloz membrana transfer işlemi için Thermo Fisher Scientific IBlot 2 Dry Blotting Sistemi kullanıldı. Jeli haznesinden çıkarabilmek için saf su dolu küvet içerisinde jel sudan geçirildi ve köşelerinden spatula yardımıyla kaldırılarak kapağından dikkatlice ayrıldı. Ardından ‘Şekil 2.13.’de şematize edilen geleneksel western blot protokolü uygulandı. Bu amaçla öncelikle IBlot 2 cihazının membran aktarım sistemi (IBlot™ 2 Transfer Stacks) kullanılarak elektrik alanı altında elektroblotlama yöntemiyle 20 voltta yedi dakikalık bir süre içerisinde jel, nitroselüloz membrana aktarıldı. Transfer işleminden sonra 40 ml saf su üzerine 10 ml 5X Buffer ve 500 µl 100X Additive Solüsyonu eklenerek Bloking Solüsyonu hazırlandı. Transfer işlemi bittikten sonra membrandaki jel görüntüsü kesilerek alındı ve hazırlanan bloking solüsyonu içerisine 5 dk bekletildi. Antikor uygulama aşamasında Invitrogen™ iBind™ Flex Western cihazı kullanıldı. Doğrulama antikor olarak Rabbit anti-Chicken IgY (H+L) Secondary Antibody, HRP (Thermo Fisher

Scientific, ABD) üreticinin tavsiye ettiği şekilde 1/10.000 konsantrasyonda kullanıldı. iBind™ Flex'e özel olan kart üzere yüklenen IgY ve seconder antikorların 2,5 saatlik bir zaman zarfında bağlama işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında iBind™ Flex kartı 10 ml bloking solüsyonu ile ıslatıldı, membranın yerleştirileceği alana aynı solüsyondan 1 ml daha eklendi. Membran karta ters olarak yerleştirildi ve silindirle üzerinden geçilerek sabitlendi ve cihazında 3 saat bekletildi.



Şekil 2.13. Geleneksel western blot protokolü (Novus, B. 2023, 12 Şubat)

<https://www.novusbio.com/application/western-blotting>

1 ml Luminol üzerine 1 ml Peroksidaz eklenerek çalışma solüsyonu hazırlanadı ve çıkarılan membran solüsyona yatırılarak bir dk inkübe edildi. Ardından görüntüleme işlemi için kemilüminesans (GenBox, ERBiyotek) görüntüleme sistemi kullanılarak membranda ki western blot görüntüleri imagER Eyes programı ile kaydedildi. Western blot çalışmalarına ilişkin görsel 'Şekil 2.14.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.14. Western blot çalışmaları

A- Jelin nitroselüloz membrana aktarılması. B- Antikor uygulaması. C- Görüntüleme.

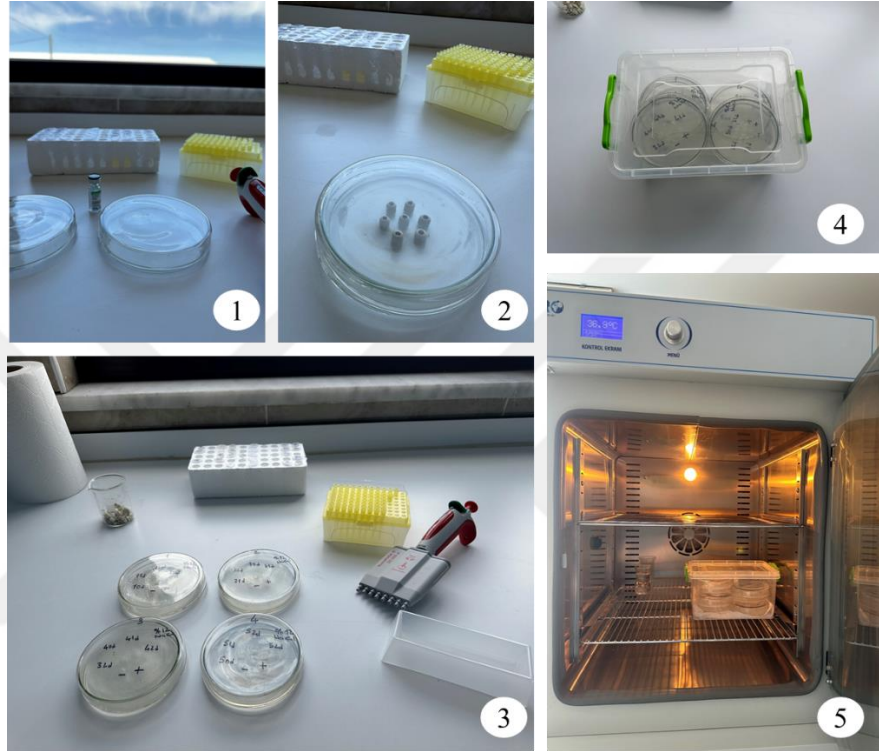
2.2.8. Agar Jel İmmunodifüzyon Testi (AGID)

Agar jel immunodifüzyon testinde antijen olarak 1 ml içerisinde 30 IU tetanoz toksoidi içeren ‘Cloteid 4 inj’ ticari aşı kullanıldı. Pozitif kontrol olarak son aşlamadan 14 gün sonra toplanan kan serumları kullandı. Negatif kontrol olarak toksoid verilmeyen ve Bradford protein tayin testinde en düşük konsantrasyona sahip kontrol grubu deney hayvanlarının yumurtalarından izole edilen IgY’ler kullanıldı. AGID çalışmalarına ait görsel ‘Şekil 2.15.’te gösterilmiştir.

IgY antikorlarının katlanma bölgesi olmaması nedeniyle bu moleküllerin esneklikleri sınırlıdır. Bu yüzden yalnızca yüksek tuz konsantrasyonlarında çökmeye veya aglütinasyona neden olurlar (Tizard, 2017). Bu sebeple agar jel immunodifüzyon testinde kullanılacak Noble Agarın en iyi presipitasyonu sağlanacağı tuz yoğunluğu belirlendi. Bunun için agarlar %8, %12, %16 ve %20 NaCl konsantrasyonlarında Office International des Epizooties (OIE) (2000) tarafından bildirilen yöntemle hazırlandı.

Her bir tuz konsantrasyonu için ayrı ayrı olmak üzere 80 gram (g), 120 g, 160 g ve 200 g NaCl, 5 g Fenol ve 12,5 g Noble Agar (A5431, Sigma Aldrich, Almanya) 1000 ml distile su içerisinde eritilerek %1,25’lik agar hazırlandı ve sıcak su içerisinde eriyene kadar bir süre bekletildi. İyiye çözülebilmesi için mikrodalga fırında en yüksek ayarda bir dakika süre ile ısıtılarak agarlar hazır hale getirildi. Farklı tuz konsantrasyonlarında hazırlanan agarlardan en iyi presipitasyonun görüldüğü agar tespit edilerek deneyde kullanılacak agarın tuz yoğunluğu belirlendi ve bu orana göre hazırlanan agar, filtreden süzülerek, 25 ml’lik hacimlerde falkon

tüplerine dağıtıldı. Ardından steril petrilerin yüzeyine 10'ar ml agar döküldü. Petrilerde bulunan agar donduktan sonra önceden otoklavda sterilize edilmiş 6 mm çapındaki porselen boncuklar agar üzerine steril bir pens yardımıyla birbirlerine 3 mm uzaklıkta olacak şekilde biri ortaya ve diğerleri de çevresine olacak şekilde dizildi. Agarın geri kalan 15'er ml'lik kısmı petrilere dökülerek agarın donması beklendi.



Şekil 2.15. AGID çalışmaları

1. Steril petrilere dökülen 10'ar ml agar. 2. Porselen boncuklar (6 mm çapında) ile açılan kuyucuklar. 3. Açılan uygun kuyucuklar içerisine yerleştirilen antijen ve antikorlar. 4. Nemli ve ağzı kapalı olarak yerleştirilen petriler. 5. İnkubasyon (37°C' de 48 saat) aşaması.

Agar donduktan sonra pens yardımıyla porselen boncuklar agardan çıkartılarak uygun kuyucuklar açılmış oldu. Hazırlanan kuyucuklardan ortadaki göze tetanoz toksoidi içeren 'Cloteid 4 inj' ticari aşı, çevredeki gözlere ise pozitif, negatif kontroller ve test edilecek 1. ana hattı-A1 (10d,11d,12d), 2. ana hattı-A2 (20d,21d,22d), 3. ana hattı-A3 (30d,31d,32d), 1. baba hattı-B1 (40d,41d,42d), 2. baba hattı-B2 (50d,51d,52d) olmak üzere hatlarından elde edilen *C.tetani* spesifik izole IgY eklendi. Petriler, nemli ortamda, ağzı kapalı uygun bir kutu içerisinde 37°C' de 48 saat inkube edildi. Karanlık bir ortamda koyu bir zemin üzerinde tek odaklı ışık kaynağıyla petriler incelendi ve presipitat çizgilerinin varlığı yönünden kontrol

edildi. Test materyali ile pozitif serum arasında oluşan presipitat görüntüsü pozitif olarak değerlendirildi.

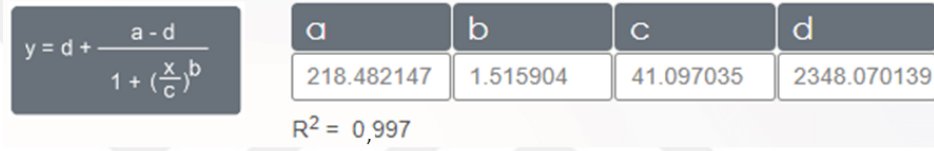
2.2.9. Çabuk Lam Aglütinasyon Testi

Çabuk lam aglütinasyon testinde antijen olarak 1 ml içerisinde 30 IU tetanoz toksoidi içiren 'Cloteid 4 inj' ticari aşından her bir test grubu için 10 µl lam üzerine damlatıldı. Üzerine test edilecek deney gruplarından elde edilen 10d (1. ana hattı-A₁), 20d (2. ana hattı-A₂), 30d (3. ana hattı-A₃), 40d (1. baba hattı-B₁), 50d (2. baba hattı-B₂) *C.tetani* spesifik izole IgY aynı miktarda (10 µl) eklendi. Kontrol grubu deney hayvanlarının yumurtalarından izole edilen IgY'ler ve tetanoz toksoidi ise negatif kontrol amacı ile test edilecek deney grubunun hemen altına yine aynı miktarda eklendi. Birkaç dakika içinde oluşan tipik kümeleşmelerin gözlenmesi pozitif olarak değerlendirilirdi. Homojen bir yapıda gözlenen kontrol grubu antijen-antikor karışımı negatif olarak değerlendirildi.

3. BULGULAR

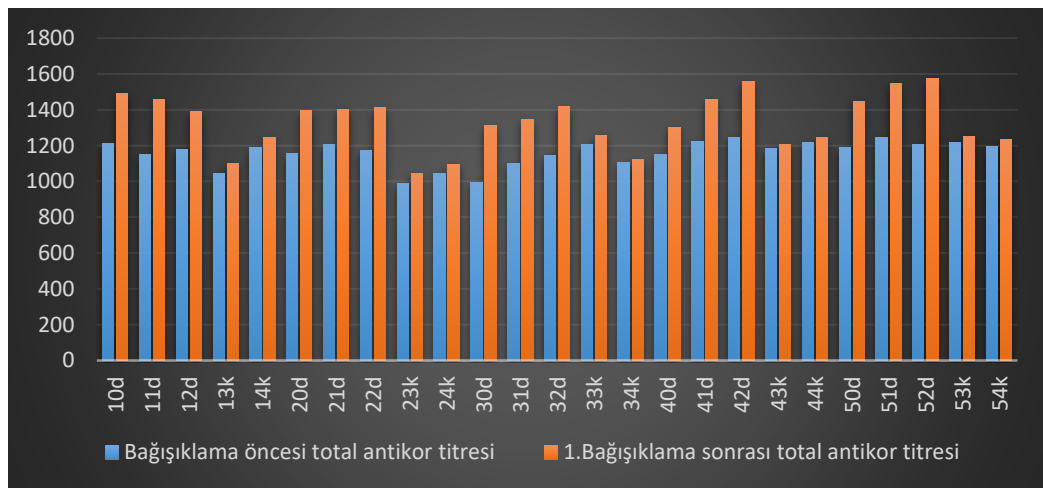
3.1. Kan Serumunda İmmünizasyon Bulguları

Tez çalışması boyunca tüm tavukların düzenli sağlık kontrolleri gerçekleştirildi. Palpasyonda ağrı, rahatsızlık ya da aşılama alanında herhangi bir doku hasarı gözlenmedi. Toksoid ile bağışıklanan deney gruplarındaki tavukların, adjuvant (FCA/FIA) + PBS verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında büyüme kinetiklerinde hiçbir farklılık görülmedi. İmmünizasyon öncesi ve sonrasında alınan kan serum örneklerindeki (her bağışıklama öncesi ve 14 gün sonrası 25+25=50 adet/3 aşılama) total antikor titreleri ELISA ile ölçüldü ve ‘Şekil 3.1.’de gösterildiği gibi hesaplanan regresyon denkleminde $R^2 = 0,997$ olarak bulundu.



Şekil 3.1. Elisa testi regresyon denklemi ile hesaplama sonuçları

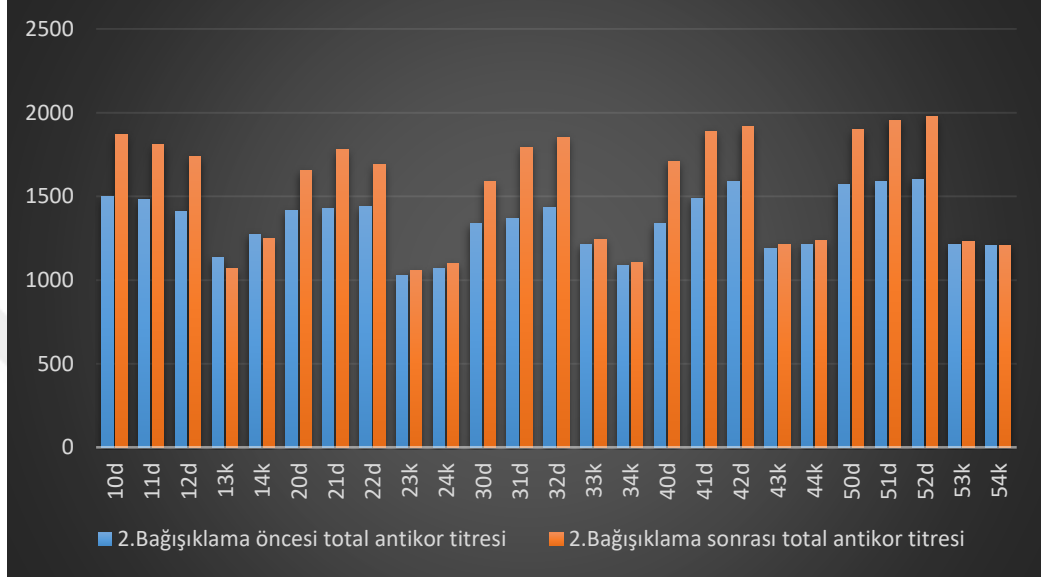
Bireysel olarak *C. tetani* toksoidi + adjuvant (FCA) ile immunize edilen deney grubunda total antikor titrelerinde bağışıklama sonrasında artış görülürken adjuvant (FCA) + PBS verilen kontrol grubunda ‘Şekil 3.2.’de gösterildiği gibi önemli bir değişikliğe rastlanılmadı.



Şekil 3.2. İmmünizasyon öncesi ve 1. bağışıklama sonrası alınan kan serumlarının ELISA sonuçları

(d):deney, (k):kontrol, (10,11,12,13,14): 1. ana hattı-A₁, (20,21,22,23,24): 2. ana hattı-A₂, (30,31,32,33,34): 3. ana hattı-A₃, (40,41,42,43,44): 1. baba hattı-B₁, (50,51,52,53,54): 2. baba hattı-B₂.

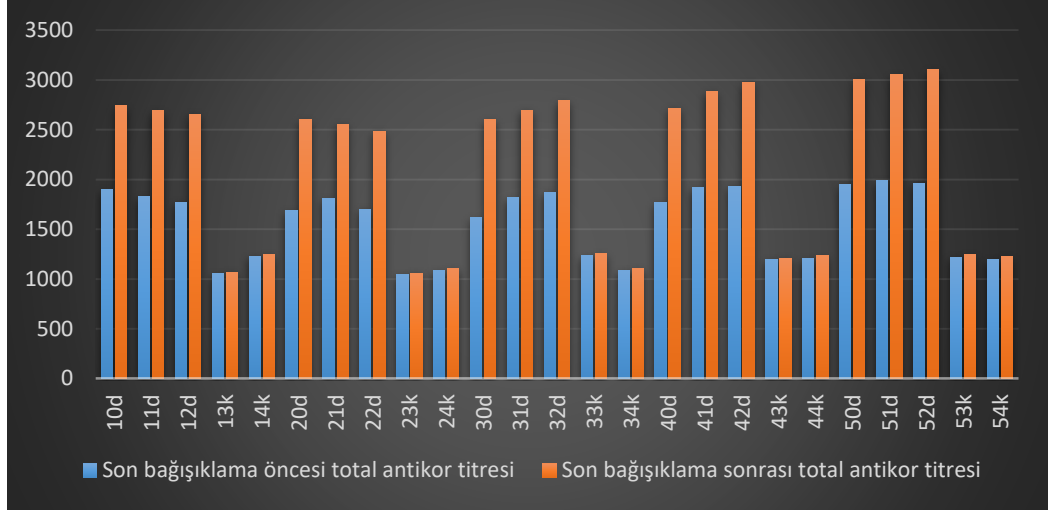
İkinci bağışıklama sonrasında bireysel olarak *C. tetani* toksoidi + adjuvant (FIA) ile immunize edilen deney grubunda total antikor titrelerinde artış ‘Şekil 3.3.’de gösterildiği gibi devam ettiği görüldü. Adjuvant (FIA) + PBS verilen kontrol grubunun total antikor titrelerinde önemli bir değişikliğe rastlanılmadı.



Şekil 3.3. İkinci immunizasyon öncesi ve 2. bağışıklama sonrası alınan kan serumlarının ELISA sonuçları

(d):deney, (k):kontrol, (10,11,12,13,14): 1. ana hattı-A₁,(20,21,22,23,24): 2. ana hattı-A₂, (30,31,32,33,34): 3. ana hattı-A₃, (40,41,42,43,44): 1. baba hattı-B₁, (50,51,52,53,54): 2. baba hattı-B₂.

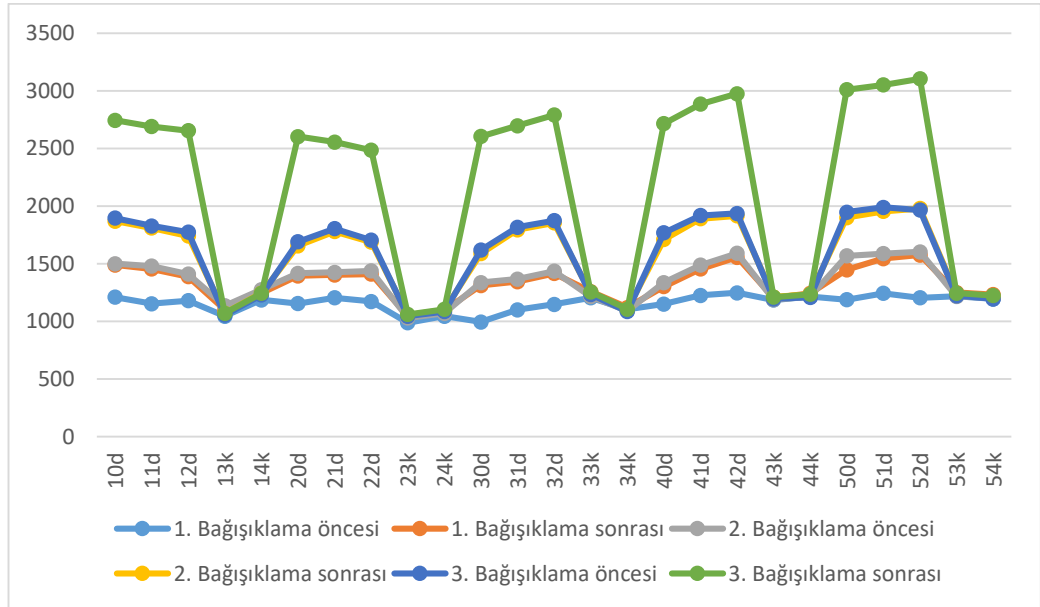
Son bağışıklama sonrasında, bireysel olarak *C. tetani* toksoidi + adjuvant (FIA) ile immunize edilen deney grubunda yer alan tavukların total antikor titrelerinde ‘Şekil 3.4.’te gösterildiği gibi ciddi oranda artış görüldü. Öte yandan adjuvant (FIA) + PBS verilen kontrol grubundaki tavukların total antikor titrelerinde önemli bir değişikliğe rastlanılmadı.



Şekil 3.4. Son immunizasyon öncesi ve son bağışıklama sonrası alınan kan serumlarının ELISA sonuçları

(d):deney, (k):kontrol, (10,11,12,13,14): 1. ana hattı-A₁, (20,21,22,23,24): 2. ana hattı-A₂, (30,31,32,33,34): 3. ana hattı-A₃, (40,41,42,43,44): 1. baba hattı-B₁, (50,51,52,53,54): 2. baba hattı-B₂.

İmmünizasyonun her aşaması değerlendirildiğinde ‘Şekil 3.5.’te gösterildiği gibi her bağışıklama sonrası tavuklar arasında ufak bireysel farklılıklar görülse de, deney gruplarında total antikor titrelerinde artış görüldü. Son bağışıklama sonrasında görülen total antikor titrelerinde ki artış miktarı en belirgin olanıydı. Buna karşın, kontrol grubunda yer alan tavuk serumlarında ki total antikor titrelerinde kayda değer bir değişime rastlanılmadı.

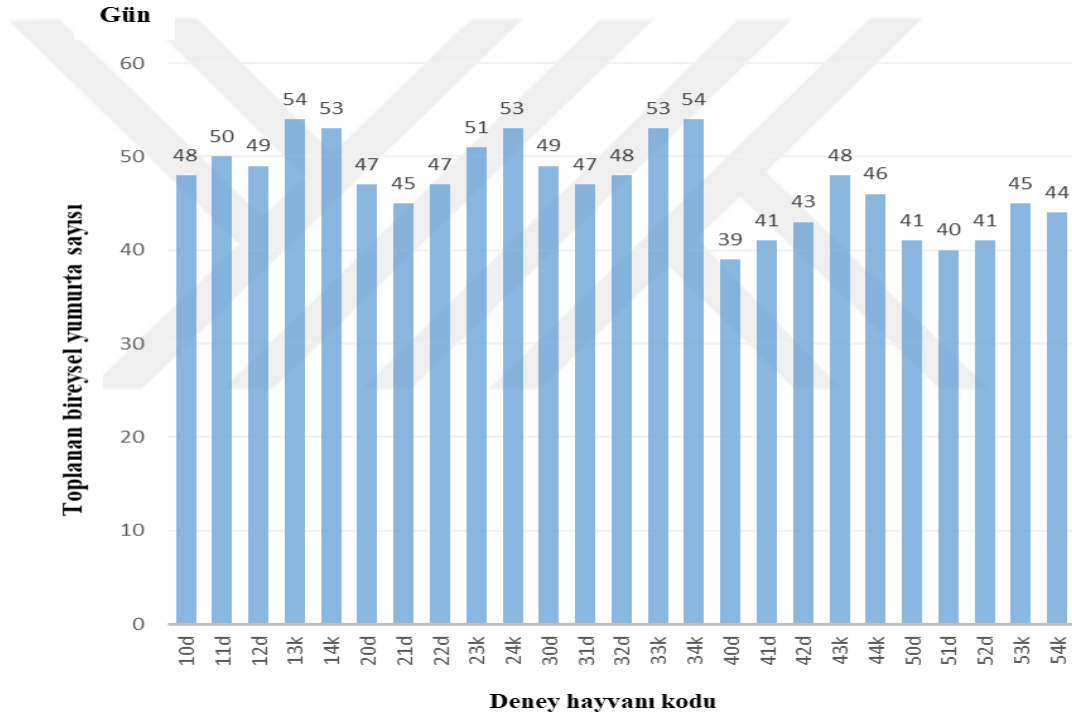


Şekil 3.5. İmmünizasyon sonrası total antikor titrelerindeki değişim

(d):deney, (k):kontrol, (10,11,12,13,14): 1. ana hattı-A₁, (20,21,22,23,24): 2. ana hattı-A₂, (30,31,32,33,34): 3. ana hattı-A₃, (40,41,42,43,44): 1. baba hattı-B₁, (50,51,52,53,54): 2. baba hattı-B₂.

3.2. Toplanan Yumurta Miktarı

Bağışıklama işleminin tamamlanmasının ardından (üçüncü enjeksiyondan bir hafta sonra) bireysel olarak yumurtalar toplanmaya başlandı. Sekiz hafta boyunca ‘Şekil 3.6.’da gösterildiği gibi deney grubundan 675 adet (97’si kırık, çatlak, çift sarılı gibi standart dışı formda olması sebebi ile uygun olmayan), kontrol grubundan 501 adet (74’ü kırık, çatlak, çift sarılı gibi standart dışı formda olması sebebi ile uygun olmayan) olmak üzere toplam 1.176 adet yumurta toplandı. Toplanan bu yumurtalardan 171 adeti izolasyona uygun olmadığı için ayrıldı. Geriye kalan 1.005 adet yumurta IgY izolasyonu için uygun (standart yumurta formu) özellikteydi.



Şekil 3.6. İki aylık sürede toplanan bireysel yumurta sayısı

(d):deney, (k):kontrol, (10,11,12,13,14): 1. ana hattı-A1,(20,21,22,23,24): 2. ana hattı-A2, (30,31,32,33,34): 3. ana hattı-A3, (40,41,42,43,44): 1. baba hattı-B1, (50,51,52,53,54): 2. baba hattı-B2.

İzolasyon için uygun özellikteki yumurtalardan bireysel olarak 30’ar adet olmak üzere toplamda 750 adet yumurta polietilen glikol (PEG 6000) çökeltme yöntemi kullanılarak saflaştırıldı.

3.3. İzole Edilen Anti-*C. tetani* IgY'nin Protein Konsantrasyonu

PEG 6000 çöktürme yöntemi kullanılarak İzole edilen anti-*C. tetani* IgY antikorlarının protein konsantrasyonları Bradford protein tayin yöntemi kullanılarak ölçüldü. Alınan sonuçlar oluşturulan standart eğriye göre dört parametrelili logistik regresyon analizi ile hesaplandı.

Elde edilen konsantrasyon bulguları 'Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de gösterildiği gibi *C. tetani* toksoidi + adjuvant (FCA/FIA) uygulanan deney gruplarındaki protein konsantrasyonunun adjuvant (FCA/FIA) + PBS uygulanan kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu görüldü.

Çizelge 3.1. Bireysel olarak izole edilen IgY antikorlarına ait Bradford testi sonuçları

(d):deney, (k):kontrol, (10,11,12,13,14): 1. ana hattı-A₁(20,21,22,23,24): 2. ana hattı-A₂(30,31,32,33,34): 3. ana hattı-A₃(40,41,42,43,44): 1. baba hattı-B₁(50,51,52,53,54): 2. baba hattı-B₂.

Numune	Absorbans	Sonuç (µg/ml)	Numune	Absorbans	Sonuç (µg/ml)
A Standart	1,239	2000,0	10d	1,382	4979,7
B Standart	1,215	1500,0	11d	1,519	7833,3
C Standart	1,100	1000,0	12d	1,522	7895,8
D Standart	1,055	750,0	13k	1,277	2458,4
E Standart	0,895	500,0	14k	1,078	903,6
F Standart	0,723	250,0	20d	1,379	4916,6
G Standart	0,623	125,0	21d	1,380	4937,5
H Standart	0,488	25,0	22d	1,491	7250,0
I Standart	0,464	0,0	23k	1,235	1654,7

Çizelge 3.2. Bireysel olarak izole edilen IgY antikorlarına ait Bradford testi sonuçları

(d):deney, (k):kontrol, (10,11,12,13,14): 1. ana hattı-A₁(20,21,22,23,24): 2. ana hattı-A₂(30,31,32,33,34): 3. ana hattı-A₃(40,41,42,43,44): 1. baba hattı-B₁(50,51,52,53,54): 2. baba hattı-B₂.

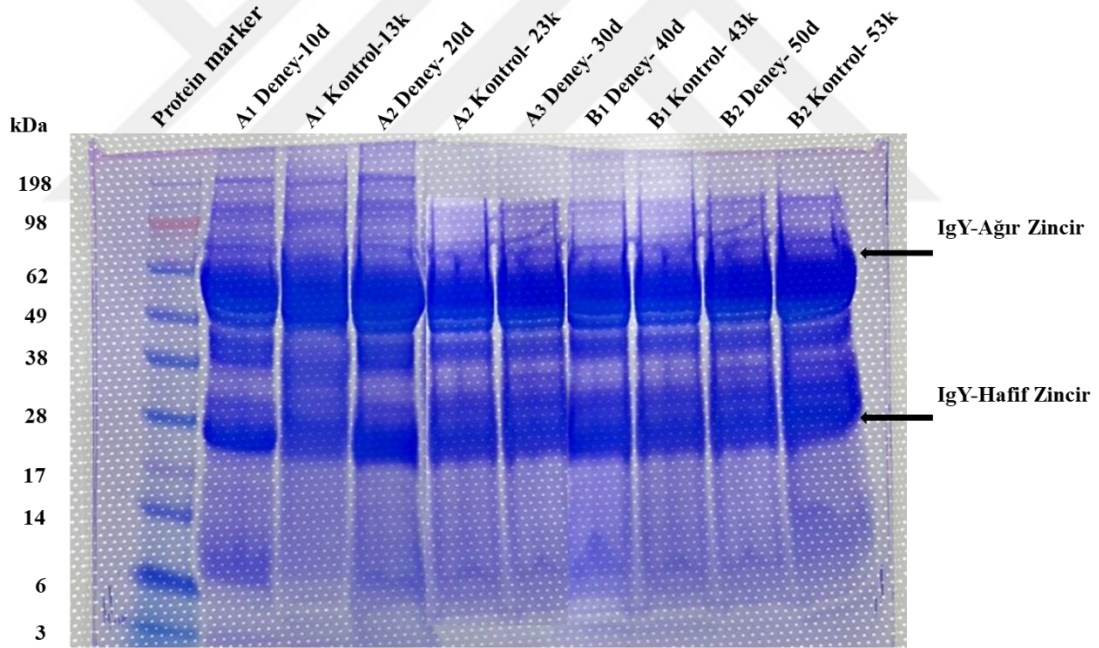
Numune	Absorbans	Sonuç (µg/ml)	Numune	Absorbans	Sonuç (µg/ml)
24k	1,180	1418,6	43k	1,053	813,6
30d	1,462	6645,8	44k	1,197	1505,1
31d	1,401	6533,3	50d	1,482	7070,6
32d	1,502	7785,8	51d	1,390	5137,5
33k	1,089	903,6	52d	1,528	8318,4
34k	1,151	1251,7	53k	1,177	1403,5
40d	1,582	8109,7	54k	1,282	1878,4
41d	1,471	6909,7			
42d	1,515	7750,8			

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

Bulguları

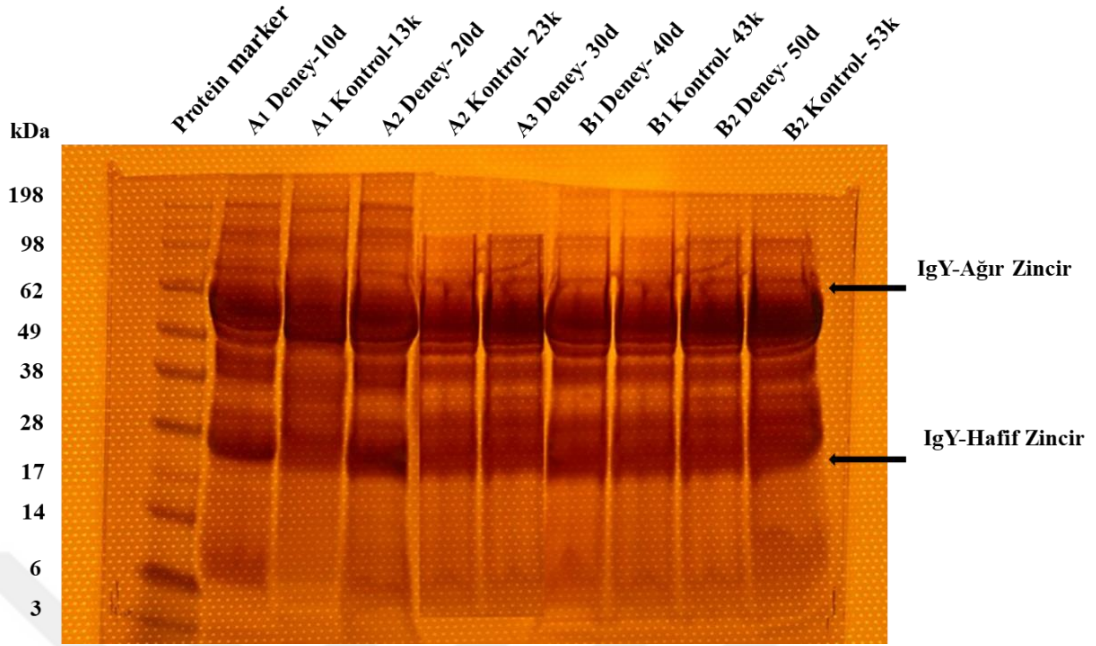
PEG 6000 çökeltme yöntemi kullanılarak saflaştırılan yumurta sarısı antikorlarının saflığını ve molekül ağırlığını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE'den yararlanılmıştır. Protein molekül ağırlığı belirleyicisi olarak İnvitrogen SeeBlue Plus 2 Prestained Standart Ladder kullanıldı. Saflaştırılan anti-*C. tetani* IgY örnekleri %4-12'lik jele yüklendi ve protein bantları Coomassie blue staining ile boyandıktan sonra incelendi.

İnceleme sonrasında jel üzerinde uygun ve beklenen konumda moleküler ağırlığı yaklaşık 60 kDa (IgY ağır zincir) ve 25 kDa (IgY hafif zincir) arasında olan bantlar görüntüledi. Görüntülenen bantların jel üzerinde ki pozitif görüntüsü 'Şekil 3.7.'de, negatif jel görüntüsü ise 'Şekil 3.8.'de verilmiştir.



Şekil 3.7. SDS-PAGE pozitif jel görüntüsü

(d):deney, (k):kontrol, Protein marker: İnvitrogen SeeBlue Plus 2 Prestained Standart Ladder, A₁:1. ana hattı (10d), A₂: 2. ana hattı (20d), A₃: 3. ana hattı (30d), B₁: 1. baba hattı (40d), B₂: 2. baba hattı (50d).



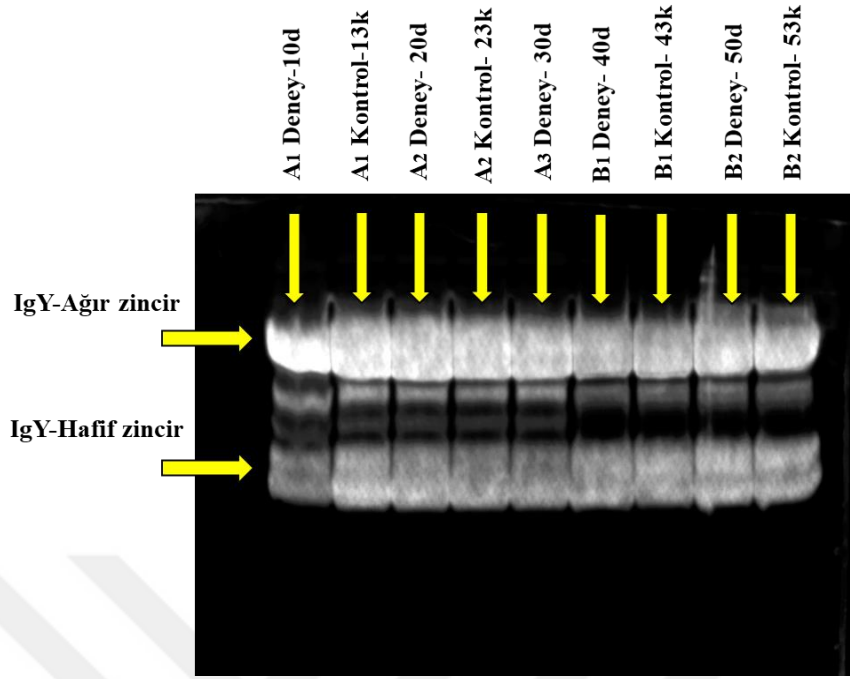
Şekil 3.8. SDS-PAGE negatif jel görüntüsü

(d):deneç, (k):kontrol, A₁:1. ana hattı (10d), A₂: 2. ana hattı (20d), A₃: 3. ana hattı (30d), B₁: 1. baba hattı (40d), B₂: 2. baba hattı (50d).

3.5. Western Blot Analizine İlişkin Bulgular

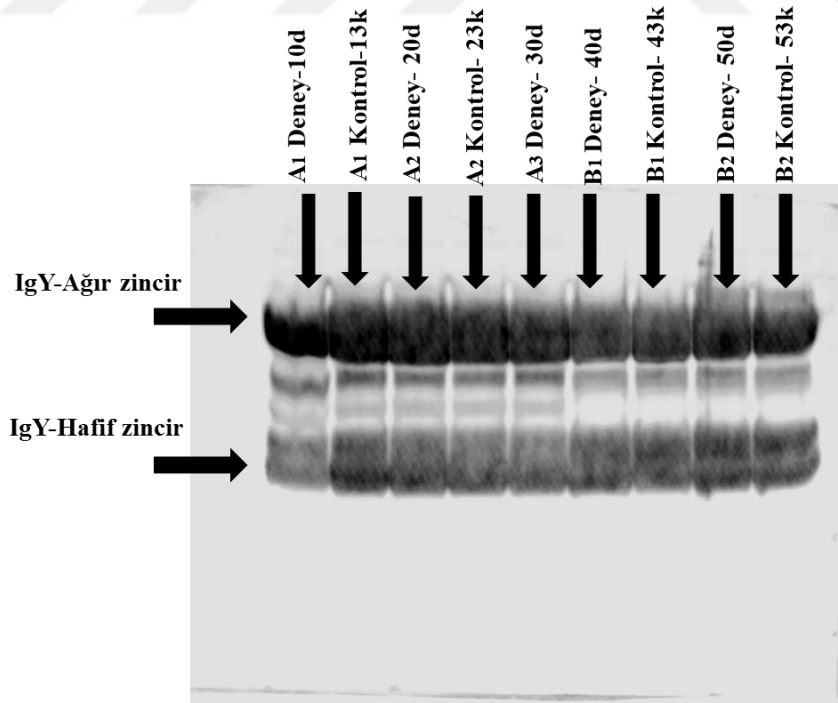
SDS-PAGE ile jel üzerinde uygun ve beklenen konumda moleküler ağırlığı tespit edilen IgY antikorlarının doğrulanması amacı ile western blot analizi yapıldı. Analiz için ticari olarak temin edilen ‘Rabbit anti-Chicken IgY (H+L) Secondary Antibody’ doğrulama antikorunu olarak kullanıldı.

SDS-PAGE sonrasında nitroselüloz membrana aktarılan jel, kemilüminesans görüntüleme sisteminde imager Eyes programı yardımı ile görüntülendi. Western blot analizi sonrasında elde edilen ve ‘Şekil 3.9. ile Şekil 3.10.’da verilen görüntüler; izole edilen IgY antikorlarının varlığını kesin olarak doğrulamış oldu.



Şekil 3.9. Western blot kemilüminesans pozitif görüntüsü

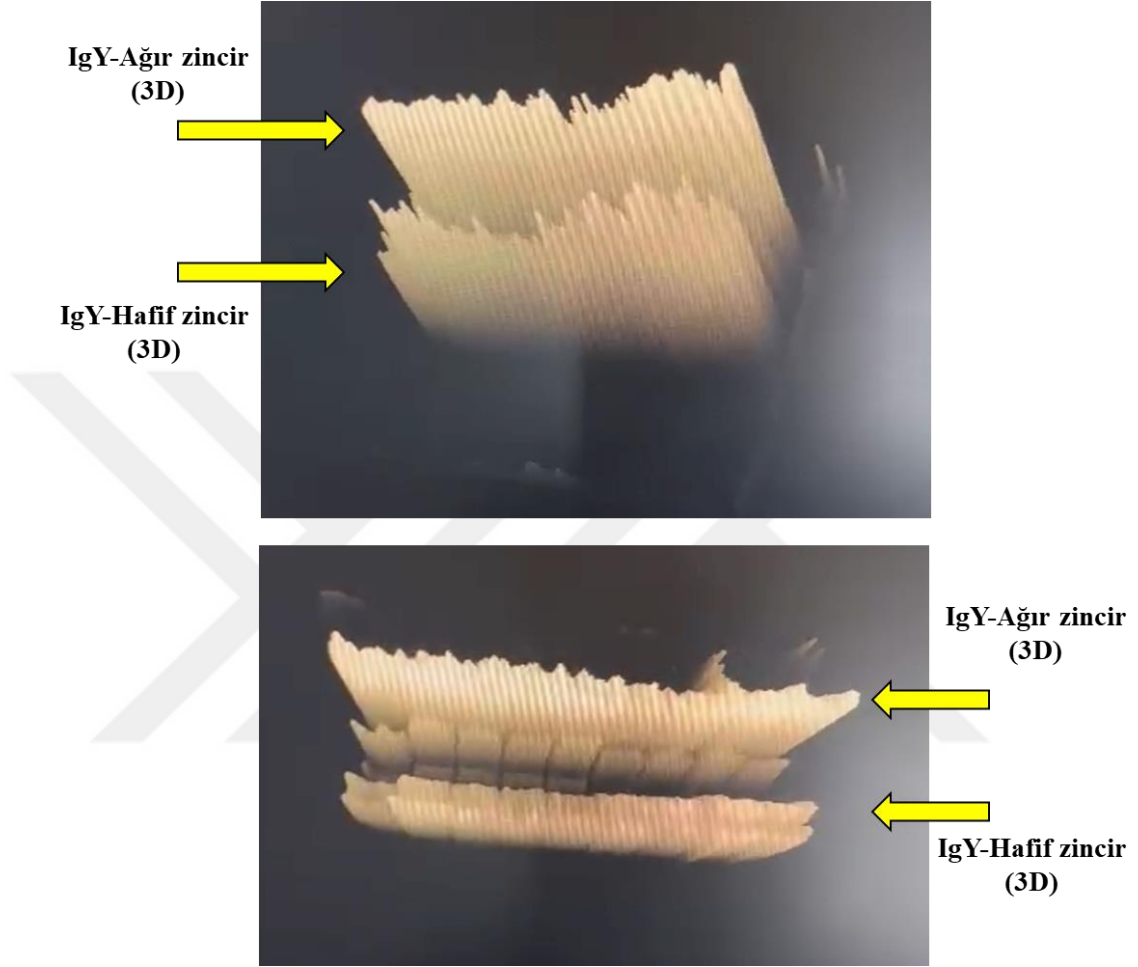
(d):deneý, (k):kontrol, A₁:1. ana hattı (10d), A₂: 2. ana hattı (20d), A₃: 3. ana hattı (30d), B₁: 1. baba hattı (40d), B₂: 2. baba hattı (50d).



Şekil 3.10. Western blot kemilüminesans negatif görüntüsü

(d):deneý, (k):kontrol, A₁:1. ana hattı (10d), A₂: 2. ana hattı (20d), A₃: 3. ana hattı (30d), B₁: 1. baba hattı (40d), B₂: 2. baba hattı (50d).

Western blot analizi sonrasında imagER Eyes programı yardımı ile görüntülenen IgY antikorlarının ağır ve hafif zincirlerinin üç boyutlu (3D) olarak alınmış görüntüsü ‘Şekil 3.11.’de verilmiştir.



Şekil 3.11. Western blot analizi imagER Eyes programı ile doğrulanan IgY antikorlarının üç boyutlu (3D) görüntüsü

3.6. Agar Jel İmmunodifüzyon Testi (AGID) Bulguları

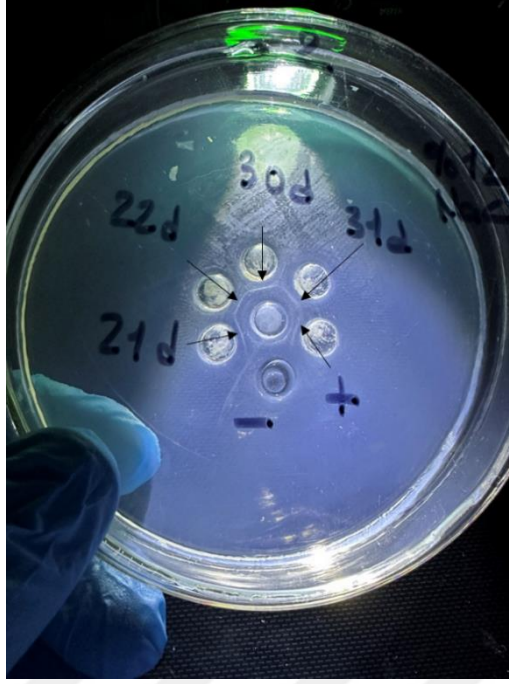
Polietilen glikol (PEG 6000) çökeltme yöntemi kullanılarak izole edilen yumurta sarısı antikorların, SDS-PAGE ve Western blot analizi ile IgY molekülü oldukları tespit edildi. Ardından elde edilen antikorların anti-*C. tetani* IgY olduklarını ispatlayabilmek adına, agar ile oluşturulan yarı katı ortamda antijen ve antikorun birleştiği alanlarda çökelti oluşması esasına dayanan AGID testi yapıldı. IgY antikorlarının katlanma bölgesi olmaması bu moleküllerin esneklikleri sınırlı olmasına neden olmaktadır. Bu sebeple yüksek tuz konsantrasyonlarında çökelmeye veya aglütinasyona neden olurlar. Bu bilgi ışığında tez çalışmasında uygulanan

agar jel immunodifüzyon testinde kullanılacak agar %8, %12, %16 ve %20 NaCl konsantrasyonlarında Office International des Epizooties (OIE) (2000) tarafından bildirilen yöntemle göre hazırlandı. Hazırlanan agarlardan en iyi presipitasyon %12'lik NaCl konsantrasyonu ile hazırlanan agarda görüldü ve buna göre hazırlandı. Pozitif kontrol olarak son aşlamadan 14 gün sonra toplanan ve ELISA testinde en yüksek antikor titresine sahip kan serumları kullandı. Negatif kontrol olarak toksoid verilmeyen ve Bradford protein tayin testinde en düşük konsantrasyona sahip kontrol grubu deney hayvanlarının yumurtalarından izole edilen IgY'ler kullanıldı. Petrilere yerleştirilen A1 (10d,11d,12d), A2 (20d,21d,22d), A3 (30d,31d,32d), B1 (40d,41d,42d) ve B2 (50d,51d,52d) kodlu deney grubundan izole edilen *C. tetani* spesifik IgY'ler, nemli ortamda 37°C'de 48 saat inkubasyon sonrasında karanlık bir ortamda koyu bir zeminde tek odaklı ışık kaynağı altında 'Şekil 3.12., Şekil 3.13., Şekil 3.14. ve Şekil 3.15.'te gösterildiği gibi presipitat çizgilerinin varlığı yönünden kontrol edildi.



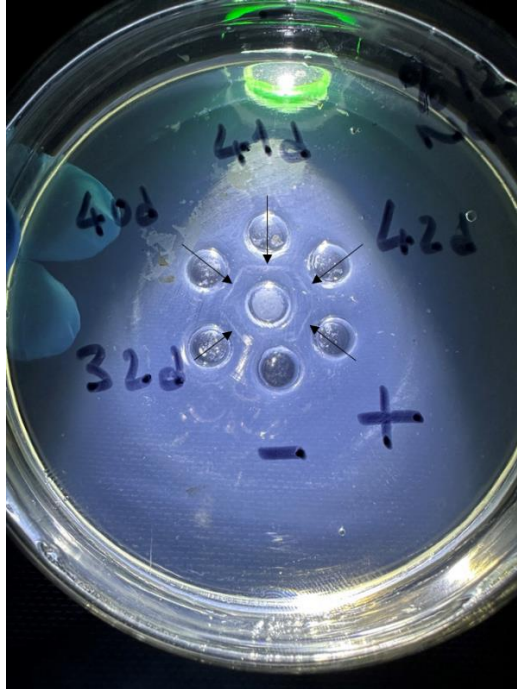
Şekil 3.12. AGID testi 1. petri presipitasyon görüntüsü

(d):deney, (k):kontrol. 10d,11d,12d: A₁ (1. ana hattı) deney grubu, 20d: A₂ (2. ana hattı). Pozitif kontrol (12d kan serumu). Negatif kontrol (14k-IgY).



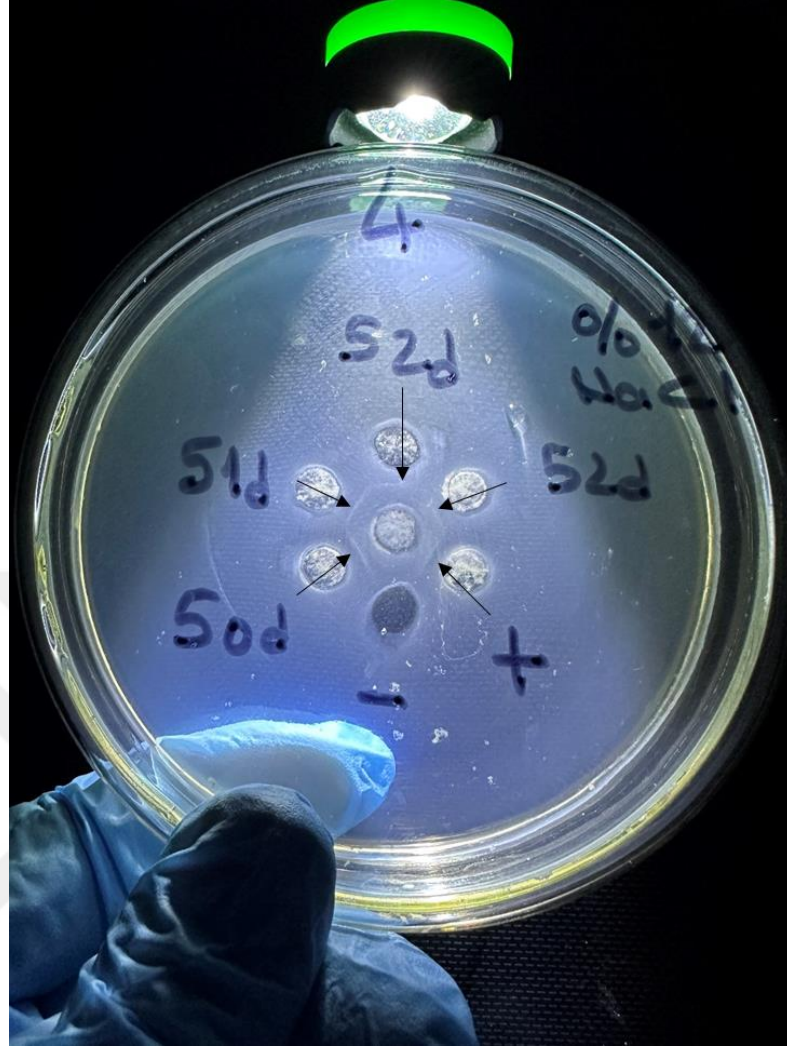
Şekil 3.13. AGID testi 2. petri presipitasyon görüntüsü

(d):deney, (k):kontrol 21d,22d: A₂ (2. ana hattı) deney grubu, 30d, 31d: A₃, (3. ana hattı). Pozitif kontrol (22d kan serumu). Negatif kontrol (23k-IgY).



Şekil 3.14. AGID testi 3. petri presipitasyon görüntüsü

(d):deney, (k):kontrol 32d: A₃ (3. ana hattı) deney grubu, 40d, 41d, 42d: B₁, (1. baba hattı). Pozitif kontrol (40d kan serumu). Negatif kontrol (33k-IgY).



Şekil 3.15. AGID testi 4. petri presipitasyon görüntüsü

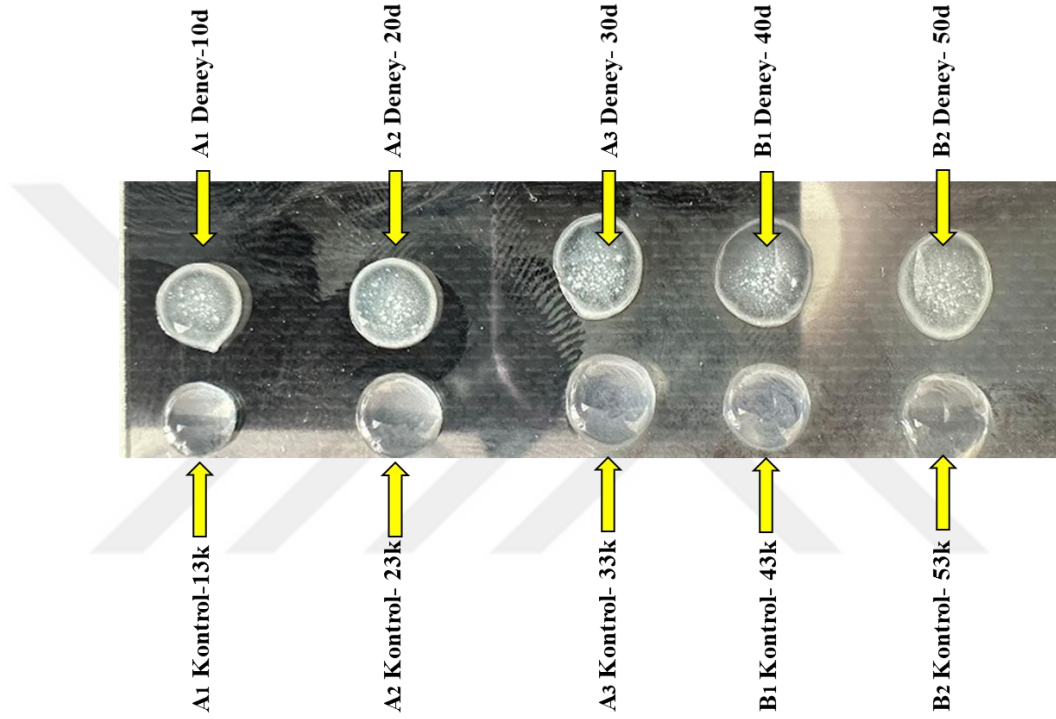
(d):deney, (k):kontrol 50d,51d,52d: B₂ (2. baba hattı) deney grubu. Pozitif kontrol (52d kan serumu). Negatif kontrol (53k-IgY).

Test sonucunda elde edilen IgY antikorları ile tetanoz toksoidi arasında oluşan prisipitat görüntüsü, elde edilen yumurta sarısı antikorlarının *C. tetani* toksoidine spesifik olarak üretildiğini kanıtladı.

3.7. Çabuk Lam Aglütinasyon Testi Bulguları

AGID testinin ardından partikül halindeki antijenlerin özgül antikorlarla birleşmesi ve çapraz bağlar oluşturarak kümeleşme esasına dayanan lam üzerinde uygulanan ve birkaç dakika gibi kısa sürede yanıt veren çabuk lam aglütinasyon testi yapıldı. Testde antijen olarak ‘Cloteid 4 inj’ ticari aşı antijeni lam üzerine damlatıldı. Üzerine test edilecek deney

gruplarından elde edilen *C. tetani* spesifik izole IgY eklendi. Kontrol grubu deney hayvanlarının yumurtalarından izole edilen IgY'ler ise negatif kontrol amacı ile test edilecek deney grubunun hemen altına eklendi. Birkaç dakika içinde 'Şekil 3.16.'da gösterildiği gibi deney grubunda tipik kümeleşmelerin olduğu gözlemlendi ve izole edilen yumurta sarısı antikorlarının *C. tetani* toksoidine spesifik olarak üretildiği birkez daha teyit edildi. Toksoid verilmeyen kontrol grubu deney hayvanlarının yumurtalarından izole edilen IgY'ler ile toksoid aşısı homojen bir yapıda gözlemlendi.



Şekil 3.16. Çabuk lam aglütinasyon görüntüsü

(d):deney, (k):kontrol, A1:1. ana hattı (10d), A2: 2. ana hattı (20d), A3: 3. ana hattı (30d), B1: 1. baba hattı (40d), B2.: 2. baba hattı (50d).

4. TARTIŞMA

Tetanoz, *C. tetani* tarafından üretilen TeNT nörotoksininin neden olduğu, insanlar ve birçok hayvan türü için yaşamı tehdit eden bakteriyel bir hastalıktır. Tetanoza karşı tüm canlı türleri duyarlı olsa da, türler arasında hastalığa karşı duyarlılık farklılıklar gösterir. Özellikle atlar, çevreleri ve yaralanma eğilimleri nedeniyle hassastır. Antikorların en önemli uygulamalarından biri pasif bağışıklama yoluyla hastalık etken ve toksinlerine karşı hızlı koruma uygulamasıdır. Bu amaçla kullanılan tetanoz antitoksini, donör atların hiper immunizasyonu (bağışıklaması) ve ardından kan serumundan antikorların toplanmasıyla üretilir ve hastalığa karşı duyarlı atlara anında fakat kısa süren pasif koruma sağlamak için kullanılır (Barnett vd., 2001).

IgY antikorları, teşhis ve profilaksi amaçlı kullanımda atlardan, farelerden ve tavşanlardan monoklonal ve poliklonal antikorlar üretmeye kıyasla çeşitli avantajlara sahiptir. 3R ilkeleri göz önüne alındığında, IgY üretimi memeli antikorlarının yerini alacak etik bir alternatifi temsil eder (Russell ve ark., 1959). Literatürde bildirildiği üzere, poliklonal antikor üretimi ile tanısal ve pasif profilaksi uygulanmasındaki IgY teknolojisinin faydaları bu araştırmayı motive etmiştir. Ayrıca bu çalışma, memeli kökenli IgG antikorlarından kaynaklanan sorunlardan kaçınmak için IgY antikorlarının kullanılmasını ve tetanoz tedavisinde hayvan refahını gözeterek alternatif bir yöntem geliştirmeyi amaçladı.

Bu tez çalışmasında, bireysel olarak *C. tetani* toksoidi ve adjuvant (FCA/FIA) ile bağışıklanan deney grubundaki tavukların total antikor titrelerinin her immunizasyon sonrasında artış gösterdiği ortaya kondu. Son bağışıklamadan 14 gün sonra alınan kan serumu örneklerinde total antikor titrelerinin en yüksek seviyeye ulaştığı görüldü. ELISA testinde elde edilen sonuçlar, bir rapel immünizasyondan sonra antikor titresinin önemli ölçüde arttığını bildiren Schade vd. (2005)'ni desteklemektedir. Buna karşın adjuvant (FCA/FIA) ve PBS verilen kontrol grubunun total antikor titrelerinde önemli bir değişikliğe rastlanılmadı. Bu durum tetanoz toksoidi ile bağışıklanan deney grubundaki tavukların bağışıklık sistemi tarafından antijene karşı önemli bir antikor titresi oluşturduğunu göstermiştir. Fathi vd. (2020)'nin *E. coli* Shiga benzeri toksine karşı yaptıkları IgY konulu benzer bir çalışmada, birinci ve ikinci antijen enjeksiyonu sonrası serum ve yumurta sarısında antijene karşı üretilen antikor titreleri karşılaştırılmış ve kontrol grubuna göre deney grubunda antijene karşı önemli bir antikor titresi tespit edilmiştir. Dolayısı ile Fathi vd. (2020)'nin bulguları ile bu tez çalışmasından elde edilen bulgular örtüşmektedir.

Başıklama işlemleri tamamlandıktan bir hafta sonra yumurtalar toplanmaya başlandı. 8 haftalık sürede toplamda 1176 adet yumurtanın toplanmış olduğu tez çalışmasında, deneyde kullanılan tüm tavukların yumurtlama performansında herhangi bir kayıp gözlenmedi. Schniering vd. (1996)'nin, tavukları bir bağırsak paraziti (*Ascaris suum*) antijenleri (somatik, sekretorik-ekskretorik) ile bağışıkladığı bir çalışmada, antijen enjekte edilen tavukların yumurtlaması, önce 3 haftada bire kadar düştüğü ve sonrasında tamamen durduğu bildirilmiştir. Öte yandan tez çalışması bulguları ile paralel şekilde Hlinak vd. (2000) tavukların normal koşullarda basit bir antijen enjeksiyonundan çok az etkilendiğini rapor etmiştir. Schniering vd. (1996)'nin bulguları muhtemelen bağırsak parazitlerinden kaynaklanan toksik maddeler nedeniyle olabileceği düşünülebilir.

IgY'nin özellikleri izolasyon ve saflaştırma yöntemlerinden derinden etkilenmesi sebebi ile; suyla seyreltme yöntemi, amonyum veya sodyum sülfat çökeltme yöntemi, PEG çökeltme yöntemi, dekstran sülfat çökeltme yöntemi, önceden soğutulmuş propan ve aseton yöntemi ve suyla seyreltme ultrafiltrasyon yöntemi dahil olmak üzere çeşitli IgY izolasyon yöntemleri ayrıntılı olarak incelenmiş ve tez çalışmasında PEG 6000 çökeltme yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar yumurta sarısından izole edilen IgY antikorların stabil titreye sahip oldukça spesifik antikorlar olduğunu göstermiştir. Aynı yöntemi kullanan birçok çalışmada benzer sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir (Bentes vd., 2022; Fathi vd., 2020; Li vd., 2020).

İzole edilen anti-*C. tetani* IgY antikorlarının protein konsantrasyonları Bradford protein tayin yöntemi (Bradford, 1976) ile ölçüldü. Analiz sonucunda *C. tetani* toksoidi ile aşılama deney gruplarındaki protein konsantrasyonunun kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu görüldü. Bentes vd. (2022)'nin Rotavirüslerine karşı yapmış olduğu IgY çalışmasında; üç immünojenik doz alan tavukların, iki immünojenik doz ve immünojenik olmayan doz alanlardan daha yüksek bir protein konsantrasyonuna sahip olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Kesmen (2014)'in antijen olarak *Salmonella Pullorum* ve *Salmonella Gallinarum* kullanarak yapmış olduğu IgY konulu tez çalışmasında, her iki antijenin birlikte verildiği deney grubunda en yüksek, tek antijenin (*S. Pullorum*) verildiği deney grubunda daha düşük ve antijen verilmeyen kontrol grubunda ise en düşük protein miktarına sahip olduğu bulunmuştur. Yapılan tez çalışmasında bulunan protein konsantrasyonları da bu çalışmaların bulguları ile benzerdir. Ayrıca elde edilen bu bulgular bağışıklama sonrası kan serumundaki total antikor miktarlarının tespit edildiği ELISA testinde elde edilen sonuçları destekler nitelikteydi.

Standart bir yumurta sarısı antikorunun moleküler ağırlığı 180 kDa'dır. Bu ağırlık, her biri yaklaşık 25 kDa olan iki hafif zincirden ve her biri yaklaşık 65 kDa olan iki ağır zincirden oluşur. Tez çalışmasında yapılan SDS-PAGE sonrasında moleküler ağırlığı yaklaşık 60 kDa (IgY ağır zincir) ve 25 kDa (IgY hafif zincir) arasında olan bantlar görüntülendi. 60 kDa bandı jel üzerinde tam olarak olması beklenen konumda olmaması, yaptığı IgY konulu tez çalışmasında benzer bir bant görüntüsü alan Groves (2017)'in bildirdiği gibi; bazı proteinlerin akışı karışımın diğer bileşenlerinden etkilenebilir ve 60 kDa bandında yer alan ağır zincir, saf bir proteinden biraz daha uzağa ilerlemiş olabilir. Bununla birlikte jel üzerinde yaklaşık 40 kDa ağırlığında ortaya çıkan başka bir bant gözlemlendi. Bu bant molekül ağırlığı 44 kDa olan tavuk serum albümini ile yumurta sarısının granüler fraksiyonunda bol miktarda bulunan bir protein olan yumurta sarısı plazma glikoproteinlerinin kombinasyonu olabilir. Yine yumurta beyazında bol miktarda bulunan 42 kDa'lık bir protein olan ovalbumin'in de bu bandın oluşumuna bir miktar katkısı olması muhtemeldir (Mann ve Mann, 2008). Li vd. (2020)'nin periodontitis ile ilişkili patojenlere karşı IgY üretimi konulu çalışmasında yapmış oldukları jel elektroforezinde tez çalışmamızda ki sonuçlara benzer şekilde yaklaşık 35-40 kDa moleküler ağırlığa karşılık gelen küçük safsızlıklar gözlemlenmişler ve bu bantları vitellogenin II'nin C-terminal fragmanı olarak açıklamışlardır.

SDS-PAGE testini doğrulamak amacı ile Western blot analizi yapıldı ve nitroselüloz membrana aktarılan jel, kemilüminesans görüntüleme sisteminde imagER Eyes programı yardımı ile görüntülendi. Western blot analizi sonucunda doğrulama antikor olarak kullanılan Rabbit anti-Chicken IgY (H+L) Secondary Antibody ile izole edilen anti-*C. tetani* IgY antikorlarının anahtar kilit şeklinde birleştiği jel üzerinde görüntülendi. Bu görüntü saf olarak üretilen IgY'nin varlığını doğruladı.

Varlığı doğrulanan IgY antikorların anti-*C. tetani* IgY olduklarını ispatlayabilmek adına, agar ile oluşturulan yarı katı ortamda antijen ve antikorun birleştiği alanlarda çökelti (presipitasyon) oluşması esasına dayanan AGID testi yapıldı. IgY antikorların katlanma bölgesinin olmaması bu moleküllerin esnekliklerinin sınırlı olmasına neden olmaktadır. Bu sebeple yüksek tuz konsantrasyonlarında çökelmeye veya aglütinasyona neden olurlar (Tizard, 2017). Bu yüzden agar jel immunodifüzyon testinde kullanılacak agar farklı (%8, %12, %16 ve %20) NaCl konsantrasyonlarda Office International des Epizooties (OIE) (2000) tarafından bildirilen yöntemle göre hazırlandı. Hazırlanan farklı tuz konsantrasyonlara sahip agarlardan en iyi presipitasyon %12'lik NaCl konsantrasyonu ile hazırlanan agarda görüldü ve bu tuz yoğunluğunda ki agar test için kullanıldı.

AGID testi sonucunda deney grubundan izole edilen *C. tetani* spesifik IgY'ler ile tetanoz toksoidi arasında oluşan presipitat görüntüsü, elde edilen yumurta sarısı antikorlarının *C. tetani* toksoidine spesifik olarak üretildiğini kanıtladı. Parrilla-Alvarez vd. (2008), Sudjarwo vd. (2017) ve Susilowati vd. (2019) yapmış oldukları IgY çalışmalarında, tez çalışmamızda elde edilen sonuçlara benzer şekilde, ürettikleri IgY antikorların spesifikliğini AGID testi ile ispatlamışlardır. AGID testi sonrasında antijenlerin özgül antikorlarla birleşmesi ve çapraz bağlar oluşturarak kümeleşme esasına dayanan çabuk lam aglütinasyon testi yapıldı. Birkaç dakika içinde deney grubundan izole edilen IgY'ler ile antijen arasında tipik kümeleşmelerin oluştuğu gözlemlendi ve izole edilen yumurta sarısı antikorlarının *C. tetani* toksoidine spesifik olarak üretildiği birkez daha gösterilmiş oldu.

Yapılan bu çalışma sonrasında tavukların tetanoz toksini ile aşılacak kan serumu ve yumurta sarısına taşınan spesifik immüoglobulinlerini, yumurta sarısından non-invaziv olarak üretilebileceği gösterilmiş oldu. Antijen olarak kullanılan 'Cloteid 4 inj' ticari aşısı, spesifik antikorun başarılı bir şekilde üretilmesini sağladı. IgY'nin özellikleri ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemlerinden önemli ölçüde etkilenir. Tez çalışmasında kullanılan PEG (6000) ekstraksiyon protokolünün IgY'yi ayırmada etkili, uygun maliyetli ve stabil titreye sahip oldukça spesifik antikorlarla sonuçlandığı gösterildi. Ayrıca *C. tetani*'ye atıfta bulunularak tetanoz dışında bir çok antijene karşı spesifik antikor üretilebileceği gösterildi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında aldığımız sonuçlar, IgY teknolojisi kullanılarak hayvan refahı, etik değerler, 3R kuralı gözetilerek tetanoz hastalığının tanı ve tedavisinde kullanılan uygulamalara alternatif olarak; bağışıklanan tavukların yumurtalarından non-invaziv şekilde spesifik IgY antikorları üretmenin mümkün olduğunu göstermektedir.

- İzolasyon aşamasında kullanılan PEG (6000) ekstraksiyon protokolünün yumurta sarısından antikorların izole edilmesinde başarılı olduğu gösterildi. Elde edilen IgY antikorlarının saflıkları ve moleküler ağırlıkları SDS-PAGE analizi ile varlıklarının doğrulanması ise western blot analizi ile gösterildi.
- Varlığı doğrulanan IgY'lerin AGID ve çabuk lam aglütinasyon testleri ile *C. tetani* toksoidine spesifik olarak üretilebileceği gösterilmiş oldu.
- Antijen olarak kullanılan 'Cloteid 4 inj' ticari aşısı, spesifik antikorun başarılı bir şekilde üretilmesini sağladı.
- Yapılan bu çalışma sonrasında yumurta sarısından non-invaziv olarak herhangi bir etkene ve/veya toksinine spesifik antikorların üretilebileceği ortaya kondu.
- Bu tez çalışması ile alınan sonuçlar gelecekte *in vivo* araştırmalar neticesinde tetanoz başta olmak üzere birçok etkene karşı immünoterapi, teşhis ve IgY araştırmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Tavukların immünizasyonu için immünojenlerin ve adjuvantların seçimine ilişkin daha fazla araştırma yapılması, optimum immün sistemi uyarıcı etkinin sağlanması ve spesifik IgY antikorlarının veriminin artırılması amacıyla avantajlı olacaktır (Lévesque vd., 2007). Saf DNA gibi yeni immünojenler, hiperimmün yumurta antikorlarının miktarını artırmak için düşünülmelidir. Çünkü bu emek ve zaman yoğun olan protein ekspresyonu ve saflaştırma prosedürlerine olan ihtiyacı ortadan kaldıracaktır (Cova, 2005; Romito vd., 2001). Aynı anda birden fazla patojene yönelik yumurta antikorları üretmek ve bunun sonucunda aynı anda farklı antijenleri nötralizasyonun sağlayabilmek amacıyla daha fazla araştırma yapılması gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca IgY'nin doğal matriksi (yumurta) bir miktar koruyucu etki sağlasa da, araştırmacılara göre IgY'nin ısı ve proteolitik stabilitesi konusu halen tartışmalıdır (Jaradat vd., 2000). IgY'nin ticari olarak daha yaygın kullanılabilmesi için ısı ve bağırsak stabilitesini artıracak önlemlerin, maliyetini büyük ölçüde artırmadan üretim aşamasından önce alınması faydalı olacaktır.

Bu çalışmadan elde edilen çıktılar, daha sonra yapılacak olan saflaştırılabilen ve pasif bağışıklama ile diğer hayvanları koruyabilen, tespit edilebilir, koruyucu miktarlarda üretebilir IgY çalışmalarına olanak sağlayacaktır. IgY antikorlarının kümes hayvanlarında görülen enfeksiyonlarına karşı yararlı etkileri iyi belirlenmiş olmasına rağmen, IgY teknolojisinin bir takım kısıtlamaları bulunmaktadır. Yapay pasif bağışıklıkla sunulan korumanın kısa süreli olması, antikorların uygun dozlarda devamlı olarak kullanılmasını gerektirmektedir. Bu durum yüksek maliyet gerektirebilecek önemli miktarda antikor üretilmesini doğurur. Bu nedenle, yüksek kaliteli antikorların büyük ölçekte verimli ve ekonomik üretimi için alternatif yöntemler geliştirilmelidir.

Sonuç olarak, antijen enjeksiyonu ile tam bir bağışıklama döneminin ardından tavuk kanındaki IgY antikorları maternal bağışıklığı uyararak yumurta sarısına aktarılır ve bu spesifik antikorlar yumurta sarısından izole edilebilir. Bu durum tavuk yumurtasının memelilerin kullanımına uygun, alternatif bir antikor kaynağı olduğunu göstermektedir. Gelecekte IgY teknolojisinin faydalarının, hem araştırma alanında hem de tıptaki evrensel uygulamalarda büyük ölçüde artması beklenmektedir. Yapılan bu çalışma ile elde edilen spesifik tetanoz toksin antikorlarının, insanlarda ve evcil hayvanlarda tetanoz hastalığının mevcut tedavilerine alternatif değerli bir terapötik araç olabileceği düşünmekteyiz. Aynı zamanda, olası teşhis araçları olarak da kullanılacak çeşitli doğal toksinlere karşı panzehirlerin üretimi amacıyla bir alan oluşturması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Afshar, M., Raju, M., Ansell, D. & Bleck, T.P. (2011). Narrative review: tetanus a health threat after natural disasters in developing countries. *Annals of Internal Medicine*, 154(5), 329-335. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-154-5-201103010-00007>
- Agunos, A., Gow, S.P., Léger, D.F., Carson, C.A., Deckert, A.E., Bosman, A.L. & Reid-Smith, R.J. (2019). Antimicrobial use and antimicrobial resistance Indicators—Integration of Farm-Level surveillance data from broiler chickens and turkeys in British Columbia, Canada. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 131. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00131>
- Aizenshtein, E., Yosipovich, R., Kvint, M., Shadmon, R., Krispel, S., Shuster, E. & Shahar, E. (2016). Practical aspects in the use of passive immunization as an alternative to attenuated viral vaccines. *Vaccine*, 34(22), 2513-2518. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.051>
- Akerström, B., Brodin, T., Reis, K. & Björck, L. (1985). Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 135(4), 2589-2592. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.135.4.2589>
- Amaresan, N., Kumar, M.S., Annapurna, K., Kumar, K. & Sankaranaryanan, N. (2020). *Beneficial microbes in agro-ecology: bacteria and fungi*. chapter 22: *Clostridium*, (ss:477). United Kingdom:Elsevier.
- Araújo, A., Lobato, Z., Chávez-Olórtegui, C. & Velarde, D. (2010). Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. *Toxicon*, 55(4), 739-744. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.004>
- Ataro, P., Mushatt, D. & Ahsan, S. (2011). Tetanus: a review. *Southern Medical Journal*, 104(8), 613-617. <https://doi.org/10.1097/smj.0b013e318224006d>
- Atkinson, W. (2006). *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases*. 9nd Ed. Chapter 6. University of California, ABD: Department of health and human services centers for disease control and prevention.
- Bachtiar, E., Bachtiar, B., Soejoedono, R., Wibawan, I. & Afdhal, A. (2016). Biological and immunogenicity property of IgY Anti *S. mutans* ComD. *The Open Dentistry Journal*, 10, 308. <https://doi.org/10.2174/1874210601610010308>
- Bachtiar, E.W., Soejoedono, R.D., Bachtiar, B.M., Henrietta, A., Farhana, N. & Yuniastuti, M. (2015). Effects of soybean milk, chitosan, and anti-*Streptococcus mutans* IgY in malnourished rats'

- dental biofilm and the IgY persistency in saliva. *Interventional Medicine and Applied Science*, 7(3), 118-123. <https://doi.org/10.1556/1646.7.2015.3.6>
- Barnett, C., Brumbaugh, G., Holland, R., Lunn, P., Vaala, W., Voss, E. & Wilson, W.D. (2001). Guidelines for vaccination of horses. Lexington, Kentucky, USA: *American Association of Equine Practitioners*, 3-4.
- Baxter, D. (2007). Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occupational Medicine*, 57(8), 552-556. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqm110>
- Behn, I., Erhard, M., Staak, C. & Schade, R. (2000). *Chicken egg yolk antibodies, production and application: IgY-technology. Chapter 3: Immunisation*. Berlin Heidelberg: Springer.
- Bennett, J.E, Dolin, R. & Blaser, M.J. (2019). *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 19nd Ed. Chapter 244*. New York: Springer.
- Bentes, G.A., Lanzarini, N.M., Guimarães, J.R., Heinemann, M.B., Volotão, E., Silva, A. & Pinto, M.A. (2022). Production and Evaluation of Chicken Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) against Human and Simian Rotaviruses. *Viruses*, 14(9), 1995. <https://doi.org/10.3390/v14091995>
- Berghman, L., Abi-Ghanem, D., Waghela, S. & Ricke, S. (2005). Antibodies: an alternative for antibiotics? *Poultry Science*, 84(4), 660-666. <https://doi.org/10.1093/ps/84.4.660>
- Bollen, L.S., Crowley, A., Stodulski, G. & Hau, J. (1996). Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *Journal of Immunological Methods*, 191(2), 113-120. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00010-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00010-5)
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Carlander, D., Kollberg, H., Wejåker, P.E. & Larsson, A. (2000). Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunologic Research*, 21, 1-6. <https://doi:10.1385/ir:21:1:1>
- Carlander, D., Stålberg, J. & Larsson, A. (1999). Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 104(3), 179-189. <https://doi.org/10.3109/03009739909178961>
- Chalghoumi, R., Beckers, Y., Portetelle, D. & Théwis, A. (2009). Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a

review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(3).
<https://hdl.handle.net/2268/117115>

Coleman, M. (1999). *Using egg antibodies to treat diseases. Egg nutrition and biotechnology*, (ss.351-370). Wallingford: CABI Publishing.

Cova, L. (2005). DNA-designed avian IgY antibodies: novel tools for research, diagnostics and therapy. *Journal of Clinical Virology*, 34, S70-S74. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(05\)80013-7](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(05)80013-7)

Demain, A., George, S., Kole, M., Gerson, D. & Fang, A. (2007). Tetanus toxin production in soy-based medium: nutritional studies and scale-up into small fermentors. *Letters in Applied Microbiology*, 45(6), 635-638. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02238.x>

Ebisawa, I., Takayanagi, M., Kurata, M. & Kigawa, M. (1986). Density and distribution of *Clostridium tetani* in the soil. *The Japanese Journal of Experimental Medicine*, 56(2), 69-74. PMID: 3525907

Fathi, J., Ebrahimi, F., Nazarian, S., Hajizade, A., Malekzadegan, Y. & Abdi, A.(2020). Production of egg yolk antibody (IgY) against shiga-like toxin (stx) and evaluation of its prophylaxis potency in mice. *Microbial pathogenesis*, 145, 104199. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104199>

Fellah, J.S., Kerfourn, F., Wiles, M.V., Schwager, J. & Charlemagne, J. (1993). Phylogeny of immunoglobulin heavy chain isotypes: structure of the constant region of *Ambystoma mexicanum* ν chain deduced from cDNA sequence. *Immunogenetics*, 38, 311-317. <https://doi:10.1007/bf00210471>

Finkelstein, P., Teisch, L., Allen, C.J. & Ruiz, G. (2017). Tetanus: A potential public health threat in times of disaster. *Prehospital and Disaster Medicine*, 32(3), 339-342. <https://doi.org/10.1017/S1049023X17000012>

Gadde, U., Rathinam, T. & Lillehoj, H.S. (2015). Passive immunization with hyperimmune egg-yolk IgY as prophylaxis and therapy for poultry diseases-a review. *Animal Health Research Reviews*, 16(2), 163. <https://doi.org/10.1017/S1466252315000195>

Gao, X., Zhang, X., Lin, L., Yao, D., Sun, J., Du, X. & Zhang, Y. (2016). Passive immune-protection of *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* infections with anti-*Vibrio* egg yolk (IgY)-encapsulated feed. *International Journal Of Molecular Sciences*, 17(5), 723. <https://doi.org/10.3390/ijms17050723>

- Garrigues, L., Do, T.D., Bideaux, C., Guillouet, S.E. & Meynal-Salles, I. (2022). Insights into *Clostridium tetani*: From genome to bioreactors. *Biotechnology Advances*, 54, 107781. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107781>
- Gassmann, M., Thömmes, P., Weiser, T. & Hübscher, U. (1990). Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *The FASEB Journal*, 4(8), 2528-2532. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.8.1970792>
- Gillespie, S.H. and Hawkey, P.M. (2006). *Principles and practice of clinical bacteriology* (ss:568-573). İngiltere: British Library.
- Girard, F., Batisson, I., Martinez, G., Breton, C., Harel, J. & Fairbrother, J.M. (2006). Use of virulence factor-specific egg yolk-derived immunoglobulins as a promising alternative to antibiotics for prevention of attaching and effacing *Escherichia coli* infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 46(3), 340-350. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2005.00030.x>
- Gottstein, B. and Hemmeler, E. (1985). Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 71(2), 273-276. <https://doi:10.1007/bf00926279>
- Groves, N. (2017). *Curli fimbriae of Salmonella Typhimurium induce an immune response in chickens producing IgY detectable in serum and yolk*. [Yüksek Lisans tezi]. New South Wales Üniversitesi.
- Grzywa, R., Łupicka-Słowik, A., Walczak, M., Idzi, M., Bobrek, K., Boivin, S. & Sieńczyk, M. (2014). Highly sensitive detection of cancer antigen 15-3 using novel avian IgY antibodies. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation*, 31(1), 43-52. <https://doi.org/10.14573/altex.1309181>
- Han, S., Wen, Y., Yang, F. & He, P. (2021). Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Protects Mice Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection Through Improving Intestinal Health and Immune Response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 662710. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.662710>
- Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M., Yamamoto, T. & Ebina, T. (1993). Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(7), 1077-1081. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.1077>
- Hlinak, A. and Schade, R. (2000). *Chicken egg yolk antibodies, production and application: IgY-technology* (ss. 9-24). Berlin-Almanya: Springer

- Hou, Y.Y., Zhen, Y.H., Wang, D., Zhu, J., Sun, D.X., Liu, X.T. & Shu, X.H. (2014). Protective effect of an egg yolk-derived immunoglobulin (IgY) against *Prevotella intermedia*-mediated gingivitis. *Journal of Applied Microbiology*, 116(4), 1020-1027. <https://doi.org/10.1111/jam.12419>
- Ikemori, Y., Kuroki, M., Peralta, R., Yokoyama, H. & Kodama, Y. (1992). Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *American Journal of Veterinary Research*, 53(11), 2005-2008. [PMID: 1466492](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1466492/)
- Imberechts, H., Deprez, P., Van, Driessche, E. & Pohl, P. (1997). Chicken egg yolk antibodies against F18ab fimbriae of *Escherichia coli* inhibit shedding of F18 positive *E. coli* by experimentally infected pigs. *Veterinary Microbiology*, 54(3-4), 329-341. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01293-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01293-X)
- Jaradat, Z.W. and Marquardt, R.R. (2000). Studies on the stability of chicken IgY in different sugars, complex carbohydrates and food materials. *Food and Agricultural Immunology*, 12(4), 263-272. <https://doi.org/10.1080/09540100020008137>
- Jin, L., Baidoo, S.K., Marquardt, R.R. & Frohlich, A.A. (1998). In vitro inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet intestinal mucus by egg-yolk antibodies. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 21(4), 313-321. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1998.tb01179.x>
- Karlsson, M., Kollberg, H. & Larsson, A. (2004). Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. *World's Poultry Science Journal*, 60(3), 341-348. <https://doi.org/10.1079/WPS200422>
- Kesmen, M. (2014) *Tavuk yumurtasından immunoglobulin Y (IgY) eldesi ve etkinliğinin gösterilmesi* [Yüksek Lisans tezi]. Marmara Üniversitesi.
- Keyel, P.A., Heid, M.E. & Salter, R.D. (2011). Macrophage responses to bacterial toxins: a balance between activation and suppression. *Immunologic Research*, 50, 118-123. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8212-3>
- Klemperer, F. (1893). Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisirungstherapie. *Archiv Für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 31(4-5), 356-382. <https://doi.org/10.1007/bf01832882>
- Kovacs-Nolan, J. and Mine, Y. (2012). Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 163-182. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101137>

- Larsson, A., Bålów, R.M., Lindahl, T.L. & Forsberg, P.O. (1993). Chicken antibodies: taking advantage of evolution a review. *Poultry Science*, 72(10), 1807-1812. <https://doi.org/10.3382/ps.0721807>
- Larsson, A., Wejåker, P.E., Forsberg, P.O. & Lindahl, T. (1992). Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *Journal of Immunological Methods*, 156(1), 79-83. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(92\)90013-J](https://doi.org/10.1016/0022-1759(92)90013-J)
- Lee, K., Chang, S.K., Lee, Y.J., Lee, J.H. & Koo, N.S. (2002). Acid Stability of Anti-*Helicobacter pylori* IgY in in Aqueous Polyol Solution. *BMB Reports*, 35(5), 488-493. Accession Number WOS:000178274400008
- Lee, W., Atif, A.S., Tan, S.C. & Leow, C.H. (2017). Insights into the chicken IgY with emphasis on the generation and applications of chicken recombinant monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 447, 71-85. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.05.001>
- Leslie, G.A. and Clem, L. (1969). Phylogeny of immunoglobulin structure and function: III. Immunoglobulins of the chicken. *The Journal of Experimental Medicine*, 130(6), 1337-1352. <https://doi.org/10.1084/jem.130.6.1337>
- Lévesque, S., Martinez, G. & Fairbrother, J. (2007). Improvement of adjuvant systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY. *Poultry Science*, 86(4), 630- 635. <https://doi.org/10.1093/ps/86.4.630>
- Li, X., He, P., Yu, L., He, Q., Jia, C., Yang, H. & Zhao, S. (2020). Production and characteristics of a novel chicken egg yolk antibody (IgY) against periodontitis-associated pathogens. *Journal of oral microbiology*, 12(1), 1831374. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1831374>
- Lösch, U., Schraner, I., Wanke, R. & Jürgens, L. (1986). The chicken egg, an antibody source. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 33(1-10), 609-619. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1986.tb00076.x>
- Łupicka Słowk A., Walczak, M., Grzywa, R., Bobrek, K., Łęcka, M., Boivin, S. & Sieńczyk, M. (2014). Generation and application of polyclonal IgY antibodies specific for full-length and nicked prostate-specific antigen. *Bioanalysis*, 6(23), 3197-3213. <https://doi.org/10.4155/bio.14.172>
- Lyu, J., Bao, L., Shen, X., Yan, C., Zhang, C., Wei, W. & Xiao, L. (2021). The preparation of N-IgY targeting SARS-CoV-2 and its immunomodulation to IFN- γ production in vitro. *International Immunopharmacology*, 96, 107797. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107797>

- Magor, K.E., Higgins, D.A., Middleton, D.L. & Warr, G.W. (1994). One gene encodes the heavy chains for three different forms of IgY in the duck. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 153(12), 5549-5555. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.153.12.5549>
- Malekshahi, Z.V., Gargari, S.L.M., Rasooli, I. & Ebrahimizadeh, W. (2011). Treatment of *Helicobacter pylori* infection in mice with oral administration of egg yolk-driven anti-UreC immunoglobulin. *Microbial Pathogenesis*, 51(5), 366-372. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.06.002>
- Malinovská, Z., Čonková, E. & Váczi, P. (2020). Tetanus in Animals—Summary of Knowledge. *Folia Veterinaria*, 64(3), 54-60. <https://doi.org/10.2478/fv-2020-0027>
- Mann, K. and Mann, M. (2008). The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics*, 8(1), 178-191. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700790>
- Masuyer, G., Conrad, J. & Stenmark, P. (2017). The structure of the tetanus toxin reveals pH-mediated domain dynamics. *EMBO Reports*, 18(8), 1306-1317. <https://doi.org/10.15252/embr.201744198>
- Meenatchisundaram, S., Shanmugam, V. & Anjali, V. (2011). Development of chicken egg yolk antibodies against *Streptococcus mitis*—purification and neutralizing efficacy. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 2(2), 109. PMID: 24826009
- Megighian, A., Pirazzini, M., Fabris, F., Rossetto, O. & Montecucco, C. (2021). Tetanus and tetanus neurotoxin: From peripheral uptake to central nervous tissue targets. *Journal of Neurochemistry*, 158(6), 1244-1253. <https://doi.org/10.1111/jnc.15330>
- Mendoza, J.C., Vivas, D., Rodriguez, E., Inga, R., Sandoval, G., Lazo, F. & Yarlequé, A. (2012). Eficacia experimental de anticuerpos IgY producidos en huevos, contra el veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 29, 69-75.
- Michael, A., Meenatchisundaram, S., Parameswari, G., Subbraj, T., Selvakumaran, R. & Ramalingam, S. (2010). Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. *Indian J. Sci. Technol*, 3(4), 468-474.
- Mine, Y. and Kovacs N.J. (2002). Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *Journal of Medicinal Food*, 5(3), 159-169. <https://doi.org/10.1089/10966200260398198>
- Murray, C.J., Lopez, A.D. & Mathers, C.D. (2004). *The global epidemiology of infectious diseases. 4th Ed. Chapter 6: Tetanus* (ss.151-188). Cenevre: World Health Organization.

- Nguyen, H.H., Tumpey, T.M., Park, H.J., Byun, Y.H., Tran, L.D., Nguyen, V.D. & Seong, B.L. (2010). Prophylactic and therapeutic efficacy of avian antibodies against influenza virus H5N1 and H1N1 in mice. *PLoS One*, 5(4), e10152. <https://doi:10.1371/journal.pone.0010152>
- Nilsson, E., Ståhlberg, J. & Larsson, A. (2012). IgY stability in eggs stored at room temperature or at +4°C. *British Poultry Science*, 53(1), 42-46. <https://doi.org/10.1080/00071668.2011.646951>
- Novus Biologicals A Biotechne Brand (2023, 12 Şubat).
<https://www.novusbio.com/application/western-blotting>.
- Olbrich, C., Müller, R.H., Tabatt, K., Kayser, O., Schulze, C. & Schade, R. (2002). Stable biocompatible adjuvants—a new type of adjuvant based on solid lipid nanoparticles: a study on cytotoxicity, compatibility and efficacy in chicken. *Alternatives to Laboratory Animals*, 30(4), 443-458. <https://doi.org/10.1177/0261192902030004>
- Orellana, C.A., Zaragoza, N.E., Licona, C.C., Palfreyman, R.W., Cowie, N., Moonen, G. & Marcellin, E. (2020). Time-course transcriptomics reveals that amino acids catabolism plays a key role in toxinogenesis and morphology in *Clostridium tetani*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology: Official Journal of the Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(12), 1059-1073. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02330-3>
- Otani, H., Matsumoto, K., Saeki, A. & Hosono, A. (1991). Comparative studies on properties of hen egg yolk IgY and rabbit serum IgG antibodies. *Lebensmittel-Wissenschaft+ Technologie*, 24(2), 152-158. [INIST identifier19638917](https://doi.org/10.1007/BF01101963)
- Parrilla-Alvarez, P., Navarrete, L.F., Girón, M.E., Aguilar, .I & Rodriguez-Acosta, A. (2008). Use of hen egg derived immunoglobulin against scolopendra (*Scolopendra gigantea*) venom. *Revista Científica*, 18(4), 385-392.
- Parvari, R., Avivi, A., Lentner, F., Ziv, E., Tel-Or, S., Burstein, Y. & Schechter, I. (1988). Chicken immunoglobulin gamma-heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *The EMBO Journal*, 7(3), 739-744. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb02870.x>
- Peralta, R., Yokoyama, H., Ikemori, Y., Kuroki, M. & Kodama, Y. (1994). Passive immunisation against experimental salmonellosis in mice by orally administered hen egg-yolk antibodies specific for 14-kDa fimbriae of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Medical Microbiology*, 41(1), 29-35. <https://doi.org/10.1099/00222615-41-1-29>
- Pereira, E., Van, T.M., Florean, E. & Guedes, M. (2019). Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *International Immunopharmacology*, 73, 293-303. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.015>

- Pizarro-Guajardo, M., Díaz-González, F., Álvarez-Lobos, M. & Paredes-Sabja, D. (2017). Characterization of chicken IgY specific to *Clostridium difficile* R20291 spores and the effect of oral administration in mouse models of initiation and recurrent disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 365. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00365>
- Polson, A.V., Von-Wechmar, M.B. & Fazakerley, G. (1980). Antibodies to proteins from yolk of immunized hens. *Immunological Communications*, 9(5), 495-514. <https://doi.org/10.3109/08820138009066011>
- Popoff, M.R. (2020). Tetanus in animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(2), 184-191. <https://doi.org/10.1177/1040638720906814>
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., Hartigan, P., Fanning, S. & Fitzpatrick, E. (2Ed.) (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease* (ss.233-249). ABD: Wiley-Blackwell.
- Rahman, S., Van-Nguyen, S., Icatlo, Jr.F.C., Umeda, K. & Kodama, Y. (2013). Oral passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(5), 1039-1048. <https://doi.org/10.4161/hv.23383>
- Reddy, P.K., Shekar, A., Kingston, J.J., Sripathy, M.H. & Batra, H. (2013). Evaluation of IgY capture ELISA for sensitive detection of Alpha hemolysin of *Staphylococcus aureus* without staphylococcal protein A interference. *Journal of Immunological Methods*, 391(1-2), 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.02.004>
- Reilly, R.M., Domingo, R. & Sandhu, J. (1997). Oral delivery of antibodies: future pharmacokinetic trends. *Clinical Pharmacokinetics*, 32, 313-323. <https://doi.org/10.2165/00003088-199732040-00004>
- Revathy, J., Karthika, S., Sentila, R. & Michael, A. (2014). In vitro evaluation of the efficacy of chicken egg yolk antibodies (IgY) generated against *P. ropionibacterium acnes*. *International Journal of Cosmetic Science*, 36(1), 68-73. <https://doi.org/10.1111/ics.12097>
- Rodrigo, C., Fernando, D. & Rajapakse, S. (2014). Pharmacological management of tetanus: an evidence-based review. *Critical Care*, 18, 1-10. <https://doi.org/10.1186/cc13797>
- Romito, M., Viljoen, G.J. & Du-Plessis, D.H. (2001). Eliciting antigen-specific egg-yolk IgY with naked DNA. *Biotechniques*, 31(3), 670-675. <https://doi.org/10.2144/01313dd05>
- Russell, W.M.S. and Burch, R.L. (1959). *The principles of humane experimental technique: methuen*. İngiltere, Londra: Butler & Tanner.

- Schade, R., Behn, I., Erhard, M., Hlinak, A. & Staak, C. (2000). *Chicken egg yolk antibodies, production and application: IgY-technology* (ss.65-107). Heidelberg, Almany: Springer.
- Schade, R., Calzado, E.G., Sarmiento, R., Chacana, P.A., Porankiewicz-Asplund, J. & Terzolo, H.R. (2005). Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Alternatives to Laboratory Animals*, 33(2), 129-154. <https://doi.org/10.1177/02611929050330020>
- Schade, R. and Hlinak, A. (1996). Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation*, 13(Supp1), 5-9.
- Schmidt, P., Wiedemann, V., Kühlmann, R., Wanke, R., Linckh, E. & Lösch, U. (1989). Chicken Egg Antibodies for Prophylaxis and Therapy of Infectious Intestinal Diseases: II. In vitro studies on gastric and enteric digestion of egg yolk antibodies specific against pathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 36(1-10), 619-628. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1989.tb00653.x>
- Schniering, A., Schade, R. & Hiepe, T. (1996). Development of an IgY-based assay for the detection of *Ascaris suum*-antigens. Article in German. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 13(Supp. 1), 62-65.
- Sea, B.S., Lillehoj, H.S., Donovan, D.M. & Gay, C.G. (2013). Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. *Animal Health Research Reviews*, 14(1), 78-87. <https://doi:10.1017/s1466252313000030>
- Shi, H., Zhu, J., Zou, B., Shi, L., Du, L., Long, Y. & Sun, L. (2017). Effects of specific egg yolk immunoglobulin on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1734-1742. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.112>
- Shimizu, M., Fitzsimmons, R.C. & Nakai, S. (1988). Anti-*E. coli* Immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *Journal of Food Science*, 53(5), 1360-1368. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb09277.x>
- Shimizu, M., Nagashima, H. & Hashimoto, K. (1993). Comparative studies in molecular stability of immunoglobulin G from different species. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative Biochemistry*, 106(2), 255-261. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90297-i](https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90297-i)
- Shimizu, M., Nagashima, H., Hashimoto, K. & Suzuki, T. (1994). Egg yolk antibody (Ig Y) stability in aqueous solution with high sugar concentrations. *Journal of Food Science*, 59(4), 763-765. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08122.x>


- Shimizu, M., Nagashima, H., Sano, K., Hashimoto, K., Ozeki, M., Tsuda, K. & Hatta, H. (1992). Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(2), 270-274. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.270>
- Srivastava, J., Talton, C., Vandeberg, P., Woznichak, M., Merritt, W.K. & Jose, M. (2022). Caprylate/chromatography process to produce highly purified tetanus immune globulin from human plasma. *Epidemiology & Infection*, 150, e172. <https://doi.org/10.1017/S095026882200142X>
- Sudjarwo, S.A., Eraiko, K. & Sudjarwo, G.W. (2017). The activity of immunoglobulin Y anti-*Mycobacterium tuberculosis* on proliferation and cytokine expression of rat peripheral blood mononuclear cells. *Pharmacognosy Research*, 9(Suppl 1), S5. <https://doi.org/10.4103/pr.pr.66.17>
- Sugita-Konishi, Y., Ogawa, M., Arai, S., Kumagai, S., Igimi, S. & Shimizu, M. (2000). Blockade of *Salmonella* Enteritidis passage across the basolateral barriers of human intestinal epithelial cells by specific antibody. *Microbiology and Immunology*, 44(6), 473-479.
- Sugita-Konishi, Y., Shibata, K., Yun, S.S., Hara-Kudo, Y., Yamaguchi, K. & Kumagai, S. (1996). Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(5), 886-888. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.886>
- Sui, J., Cao, L. & Lin, H. (2011). Antibacterial activity of egg yolk antibody (IgY) against *Listeria monocytogenes* and preliminary evaluation of its potential for food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(11), 1946-1950. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4381>
- Sunwoo, H., Lee, E., Menninen, K., Suresh, M. & Sim, J. (2002). Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Science*, 67(4), 1486-1494. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10310.x>
- Susilowati, H., Artanto, S., Yulianto, H.D.K., Sosroseno, W. & Hutomo, S. (2019). The protective effects of antigen-specific IgY on pyocyanin-treated human lymphoma Raji cells. *F1000Research*, 8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19327.2>
- Şen, A. (2011). Seroloji Carlı K (Ed.). *Temel veteriner mikrobiyoloji ve immünoloji*. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Yayınları.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı (2009). <https://www.saglik.gov.tr/TR,84930/saglik-istatistikleri-yilliklari.html/2023/02/20>

- Thibodeau, A., Fravallo, P., Perron, A., Lewandowski, S.L. & Letellier, A. (2017). Production and characterization of anti-*Campylobacter jejuni* IgY derived from egg yolks. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0346-4>
- Thomsen, K., Christophersen, L., Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., Moser, C. & Høiby, N. (2016). Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies promote bacterial opsonization and augment the phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophils. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12(7), 1690-1699. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1145848>
- Tini, M., Jewell, U., Camenisch, G., Chilov, D. & Gassmann, M. (2002). Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 131(3), 569-574. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00508-6](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00508-6)
- Tizard, I.R. (10Ed.) (2017). *Veterinary immunology.-e-book* (ss. 1482). Texas, ABD: Elsevier.
- Tizard, I.R. (2019). *Vaccines for veterinarians e-book* (ss. 141). Texas, ABD: Elsevier.
- Tsubokura, K., Berndtson, E., Bogstedt, A., Kaijser, B., Kim, M., Ozeki, M. & Hammarström, L. (1997). Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni*-infected chickens. *Clinical & Experimental Immunology*, 108(3), 451- 455. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1997.3901288.x>
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A. & Whitman, W.B. (2Ed.) (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (ss.736-855). Georgia Üniversitesi, ABD: Springer.
- Wang, L.H., Li, X.-Y., Jin, L.-J., You, J.-S., Zhou, Y., Li, S.Y. & Xu, Y.-P. (2011). Characterization of chicken egg yolk immunoglobulins (IgYs) specific for the most prevalent capsular serotypes of mastitis-causing *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*, 149(3-4), 415-421. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.029>
- Wanke, R., Schmidt, P., Erhard, M., Stangassinger, M., Schmahl, W. & Hermanns, W. (1996). Freund's complete adjuvant in the chicken: efficient immunostimulation with severe local inflammatory reaction. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A*, 43(4), 243-253.
- Warr, G.W., Magor, K.E. & Higgins, D.A. (1995). IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*, 16(8), 392-398. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)8008-5](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)8008-5)
- Wen, J., Zhao, S., He, D., Yang, Y., Li, Y. & Zhu, S. (2012). Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B virus. *Antiviral Research*, 93(1), 154-159. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.11.005>


- WHO (World Health Organization) (2018). <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/tetanus/2023/01/25>.
- Xu, F., Xu, Y., Jin, L., Liu, H., Wang, L., You, J. & Li, X. (2012). Effectiveness of egg yolk immunoglobulin (IgY) against periodontal disease-causing *Fusobacterium nucleatum*. *Journal of Applied Microbiology*, 113(4), 983-991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05396.x>
- Xu, Y., Li, X., Jin, L., Zhen, Y., Lu, Y., Li S. & Wang L (2011). Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. *Biotechnology Advances*, 29(6), 860-868. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.003>
- Yakhkeshi, S., Wu, R., Chelliappan, B. & Zhang, X. (2022). Trends in industrialization and commercialization of IgY technology. *Frontiers in Immunology*, 13, 991931. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.991931>
- Yokoyama, H., Peralta, R.C., Diaz, R., Sendo, S., Ikemori, Y. & Kodama, Y. (1992). Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infection and Immunity*, 60(3), 998-1007. <https://doi.org/10.1128/iai.60.3.998-1007.1992>
- Yokoyama, H., Umeda, K., Peralta, R.C., Hashi, T., Icatlo Jr, F.C., Kuroki, M. & Kodama, Y. (1998). Oral passive immunization against experimental salmonellosis in mice using chicken egg yolk antibodies specific for *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium*. *Vaccine*, 16(4), 388-393. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)80916-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(97)80916-4)
- Yolken, R.H., Leister, F., Wee, S.B., Miskuff, R. & Vonderfecht, S. (1988). Antibodies to rotaviruses in chickens' eggs: a potential source of antiviral immunoglobulins suitable for human consumption. *Pediatrics*, 81(2), 291-295. <https://doi.org/10.1542/peds.81.2.291>
- Zhang, M., Zhang, L., Yang, J., Zhao, D., Han, K., Huang, X. & Li, Y. (2022). An IgY Effectively Prevents Goslings from Virulent GAsV Infection. *Vaccines*, 10(12), 2090. <https://doi.org/10.3390/vaccines10122090>
- Zhang, X.Y., Vieira-Pires, R.S., Morgan, P.M. & Schade, R. (2021). *IgY-technology: production and application of egg yolk antibodies* (ss. 61-62). Berlin, Almany: Springer.
- Zorriehzahra, M.J., Ruchi, T., Swati, S., Kumaragurubaran, K., Malik, Y.S., Dadar, M. & Kuldeep, D. (2016). Avian egg yolk antibodies (IgY) and their potential therapeutic applications for countering infectious diseases of fish and aquatic animals. *International Journal of Pharmacology*, 12(8), 760-768. <https://doi :10.3923/ijp.2016.760.76>

EKLER

Ek-1. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 05.06.2021 tarih ve 843 sayılı kararı

	T.C. ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI	
TOPLANTI TARİHİ	: 06.05. 2021
TOPLANTI SAYISI	: 154
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 843
KARAR NUMARASI	: 843
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Barış SAREYÜPOĞLU
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Vet. Hek. Kürşat TETEK
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: Tavuk- Anafolu-T (25 adet Dişi)
<p>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler (Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Barış SAREYÜPOĞLU'nun başkanlığında yürütüldüğü 843/2021 kayıt numaralı ve "Clostridium tetani Toksikine Karşı Tavuk Yumurtasından İmmünglobulin-Y (IgY) Üretimi, Safleştirilmesi ve ELESa Yöntemi ile Etkinliğinin Belirlenmesi" konulu çalışmaya; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönetmeliğine göre değerlendirilmiş ve sonuçları belirtilen şekilde varlığını uygun bulmuştur.</p>	
<p>Adres: Meşelik Kampüsü/ŞK. 26100Odaşar/ Eskişehir Telefon: 0 222 239 2979 / (45 63) E-posta: http://hadyek.ogu.edu.tr</p>	

**Ek-2. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'nun
07.03.2023 Tarih ve 843-1 Sayılı Kararı**



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEPLERİ YEREL ETİK KURULU

HAYVAN DENEPLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 07.03.2023
TOPLANTI SAYISI	: 171
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 843-1
KARAR NUMARASI	: 843-1
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Barış SAREYÜPOĞLU
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Vet. Hek. Kürşat TETİK
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: Tavuk- Anadolu-T (25 adet Dişi)

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler (Mikrobiyoloji) Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Barış SAREYÜPOĞLU'nun araştırması yürütüldüğü oluda 843-1/2023 kayıt numarası ve "Clostridium botulinum Toksikojen Karşı Tavuk Yavruyasından İmmünglobulin-Y (IgY) Üretimi, Sıflaşdırılması ve Serolojik Olarak Spesifikliğini Belirlemek" konulu çalışması, Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilerek ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılan uygun bulunmuştur.

Adres: Meşelik Kampüsü/ÖK-24-8000/Ankara/Eskişehir
Telefon: 0 222 239 2979 / (45 65)
E-posta: <http://udyek.ogu.edu.tr>

Ek-3. Toksoid Olarak Kullanılan 'Cloteid 4 inj' Ticari Tetanoz Aşısının Prospektüsü

341/PI/TR/2

PROSPEKTÜS (Package leaflet)

Sadece Hayvan Sağlığında Kullanılır

CLOTEID 4 inj.
Vet. Kullanım için
Tetanoza karşı aşı

BİLEŞİMİ
(1 ml içerisinde)

Aktif ajan
Purifiye Tetanoz Anatoksini 30 IU

Adjuvant ve prezervatifler
Alüminyum Hidroksit Jel. 0.1 ml
Tiyomersal 0.15 mg
Tamponlu Saline çözeltisi ad. 1 ml

KULLANIM
SAHASI/ENDİKASYONLARI
3 aylık veya daha büyük At, Tay, Sığır, Buzağı, Koyun, Kuzu, Keçi, Oğlak, Köpek ve Yavru Köpeklerin Tetanoza karşı aktif bağışıklığı.

KULLANIM ŞEKLİ VE DOZU
Uygulama Yolu:
Kas içi (intramuscular) olarak gluteal kasa uygulanır.
Atlarda, aşı kuru iğne metoduyla uygulanabilir, tercihen gluteal kasına. Sakin olmayan atlar için boyun veya göğüs kasına uygulanabilir.
Dozu: 1 ml, kas içi olarak gluteal kasa uygulanır. 3 hafta sonra aynı şekilde tekrar aşılama yapılır. Sonraki takviye aşısı iki yıl sonra yapılır (atlarda dört yıldan sonra).

ÖZEL KLİNİK BİLGİLER VE HEDEF TÜRLER İÇİN ÖZEL UYARILAR
Atlarda, aşı kuru iğne metoduyla uygulanabilir, tercihen gluteal kasına. Sakin olmayan atlar için boyun veya göğüs kasına uygulanabilir. Yarış, spor ve yük çekme atlarının ağır çalışma dönemlerinde aşılanmaması önerilir.

Köpekler ise av sezonu, yarışma ve otel ortamları gibi vücut direncinin zayıfladığı zamanlarda aşılanmamalıdır. Belirtilen dönemlerden önce, fiziki kondisyonlarının güçlü olduğu dönemlerde aşılanmalıdır.

KONTRENDİKASYONLARI
Hasta, zayıf ve nekahet dönemindeki hayvanlara aşı uygulanmamalıdır.

Gebelikte kullanım:
Aşının hamilelik ve laktasyonda negatif etkisi bulunmamaktadır.

İSTENMEYEN/YAN ETKİLER
Yoktur.

İLAÇ ETKİLEŞİMLERİ
Yoktur.

DOZ AŞIMINDA BELİRTİLER, TEDBİRLER VE ANTİDOT
Çift doz, hedef türlerin hepsinde tehlikesizdir.

GIDALARDA İLAÇ KALINTI UYARILARI
İlaç Kalıntı Arınma Süresi (i.k.a.s.): İlaç kalıntı arınma süresi sıfır ("0") gündür.

GENEL UYARILAR
Flakonlar kullanmadan önce çalkalanmalıdır. Uygulama esnasında aşı vücut ısısında olmalıdır.

UYGULAYICININ ALMASI GEREKEN ÖNLEMLER
Yoktur.

MUHAFAZA ŞEKLİ VE RAF ÖMRÜ

Açtıktan sonra 10 saat içinde tüketilmelidir.

Kuru ve karanlık ortamda 2 – 8 °C'de muhafaza ediniz. Raf ömrü üretim tarihinden itibaren 3 yıldır.

Son kullanma tarihi geçen ürünü kullanmayınız.

Aşı dondurulmamalıdır.

SATIŞ YERİ VE ŞARTLARI

Veteriner hekim reçetesiyle veteriner hekim muayenehaneleri, poliklinikleri, hayvan hastaneleri ve eczanelerde satılır (VHR).

TİCARİ TAKDİM ŞEKLİ

1 ml lik flakonlar: 2, 10 veya 20 flakonun sığacağı plastik kutularda, flakonların gireceği uygun deliklere yerleştirilmiş ve plastik kapakla kapatılmış kutu ile satışa sunulmuştur.

5 ml lik flakonlar: 10 flakonun sığacağı plastik kutularda, flakonların gireceği uygun deliklere yerleştirilmiş ve plastik kapakla kapatılmış kutu ile satışa sunulduğu gibi, flakonlar ayrı karton kutularda paketlenmiş olarak da satışa sunulmuştur.

10 ml ve 20 ml lik flakonlar: Ayrı ayrı karton kutularda paketlenmiş olarak satışa sunulmuştur.

Önceden doldurulmuş kullanıma hazır şırıngalar:

Aşı, cam şırıngalara 1 ml hacminde önceden doldurulmuştur. Aşığı barındıran şırınga için, koruyucu önlemler alınmış ve steril şartlar yerine getirilmiş olarak satışa sunulmuştur.

KULLANIM SONU İMHA VE HEDEF OLMAYAN TÜRLER İÇİN UYARILAR:

Müstahzara ait ambalajın ve atıkların imhası, geçerli düzenlemelere göre yapılmalıdır. Aşı başka amaçla kullanılmamalıdır.

**** SADECE HAYVAN SAĞLIĞINDA KULLANILIR**

Kullanmadan önce Veteriner hekime Danışınız.

Çocukların Ulaşamayacağı yerde bulundurunuz.

Beklenmeyen bir etki görüldüğünde Veteriner hekime danışınız.

PROSPEKTÜS ONAY TARİHİ: 31.01.2012

G.T.H.B. PAZARLAMA İZİN TARİHİ VE NO: 14.11.2011 / 38313

PAZARLAMA İZİN SAHİBİNİN ADI VE ADRESİ:

İNTERMED Ecza Deposu İthalat, İhracat, Ticaret ve Taahhüt Ltd. Şti.

Sağlık 1 Sok. No:32/4 Yenişehir-Çankaya/ANKARA

Tel: (312) 435 95 60

Faks: (312) 435 73 51

intermed@interhas.com

ÜRETİCİ FIRMA:

BIOVETA a.s.,

Komenskeho 212,

683 23 Ivanovice na Hane,

Çek Cumhuriyeti

bioveta