

T.C. EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

**POLIVALAN AŞIDA IN VITRO OLARAK
BETA TOKSİN ETKİNLİĞİNİN SAPTANMASI**

Aslı ADIYAMAN

Danışman: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir

2022

Aslı Adıyaman tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Polivalan Aşıda İn Vitro Olarak Beta Toksin Etkinliğinin Saptanması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

:

Raportör Üye

:

Üye

:

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Polivalan Aşıda İn Vitro Olarak Beta Toksin Etkinliğinin Saptanması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / / 2022

Aslı ADIYAMAN

ÖZET**POLİVALAN AŞIDA İN VİTRO OLARAK BETA TOKSİN
ETKİNLİĞİNİN SAPTANMASI**

ADİYAMAN, Aslı

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

Haziran 2022, 57 sayfa

Clostridium perfringens tip C tarafından salgılanan beta toksin başta koyun keçi ve sığırlarda enteroroksemiye neden olan bir enfeksiyon çeşididir. Hastalığın mücadelesinde en etkili yol aşılama değildir. Çeşitli klostridial etmenlerin bir araya gelmesiyle polivalan olarak hazırlanmış aşuların potens testleri, deney hayvanlarının kullanımını esas alan toksin nötralizasyon testi ile yapılmaktadır. Tnt'nin hem hayvan refahı ve temini açısından hem de hayvan test sonuçlarının tutarsız olabileceği göz önüne alınarak, alternatif metotların geliştirilmesi ve uygulanması gerektiği sürekli vurgulanmaktadır. Serolojik tabanlı bir test olan ELISA, polivalan klostridial aşuların potens testlerinde uygulanması daha mümkün olan ihtimaller içinde görülmektedir.

Bahsedilen bu ihtimaller gözetilerek beta toksoid içeren polivalan aşıyla immunize edilen tavşan serumları ile beta antitoksin Elisa yöntemi uygulamalar yapılmıştır. Uygulamalar sonucunda platelelerde görülen renk gradientleri ile sayısal sonuçlar birbiriyle uyum göstermektedir. Çalışma sonuçlarında immunize tavşan serumlarının OD'sinin sırasıyla 9,72 ve 9,98 olması serumu geçerli kılmıştır. Ardından uygulanan aşının referans serum OD'lerine oranı sırasıyla 1,45 ve 1,83 olması ile yöntemin geçerli olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar beta toksin içeren polivalan aşuların potens testlerinde Tnt yerine, beta antitoksin ELISA testinin validasyonlarının da yapıldıktan sonra kullanılabilmesini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Beta toksin, Potens, Polivalan aşı, TNT, ELISA

ABSTRACT**DETERMINATION OF BETA TOXIN ACTIVITY IN VITRO IN
POLYVALENT VACCINE**

ADIYAMAN, Asli

MSc in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

June 2022, 57 Pages

Beta toxin secreted by *Clostridium perfringens type C* is a type of infection that causes enteroroxemia in sheep, goats and cattle. The most effective way to control the disease is vaccination. Potency tests of vaccines prepared as polyvalent by combining various clostridial factors are performed by toxin neutralization test based on the use of experimental animals. It is constantly emphasized that alternative methods should be developed and applied, both in terms of animal welfare and supply of Tnt and considering that animal test results may be inconsistent. ELISA, a serological-based test, seems to be more likely to be applied in potency tests of polyvalent clostridial vaccines.

Considering these possibilities, rabbit sera immunized with beta toxoid containing polyvalent vaccine and beta antitoxin Elisa method were applied. As a result of the applications, the color gradients seen on the plates and the numerical results are in harmony with each other. In the results of the study, the OD of immunized rabbit sera was 9.72 and 9.98, respectively, which made the serum valid. It was seen that the method was valid, with the ratio of the administered vaccine to the reference serum ODs being 1.45 and 1.83, respectively. These results show that polyvalent vaccines containing beta toxin can be used instead of Tnt in potency tests after the validation of beta antitoxin ELISA test.

Keywords: Beta toxin, Potency, Polyvalent vaccine, TNT, ELISA

ÖNSÖZ

Enterotoksemi, koyunlarda, keçilerde ve sığırlarda hızlı gelişen ve öldürücü bir hastalıktır. Hastalığın tek tedavi yöntemi aşılama değildir. Veteriner kullanımı için ticari olarak satışı yapılan *C. perfringens* tip C aşılı, toksinin artık tip C suşlarının toksoidi olarak anıldığı veya tip A, B veya D suşları ile kombinasyon halinde kimyasal olarak inaktive edilmiş kültürler içerir.

Aşının üretildiği firmalarda aşı etkinlik testleri toksin nötralizasyon testi ile deney hayvanları üzerinde yapılmaktadır. Bu süreç laboratuvar hayvanlarında ağrıya, acıya ve ölüme neden olmaktadır. Bir yandan sürü hayvanlarını bu hastalıktan korumak için çeşitli aşılar geliştirilirken bir yandan da bu aşı testleri için yine deney hayvanlarının kullanılması etik olarak doğru bir yaklaşım değildir. Daha fazla deney hayvanlarına zarar verilmemesi adına hem kendim hem de çalışmakta olduğum ATA-FEN A.Ş. olarak Avrupa Farmakopesi'nin yönlendirmesi dahilinde bizlerde bu testler için serolojik yöntemlerden biri olan Elisa'ya yöneldik.

Bu çalışmada, polivalan bir aşının potensini ölçmek için deney hayvanlarının kullanılmasının azaltılarak ortadan kaldırılması amaçlanmıştır. Polivalan aşılarda potensleri toksin nötralizasyon testi ile yapılmaktadır ve bu testte deney hayvanları kullanımı oldukça fazladır. Geliştirilecek in vitro bir test ile deney hayvanlarına bağlılık azalacak ve test sonucu daha kısa sürede alınacaktır. Ayrıca serolojik yöntemlerin kullanılmaya başlanması etkili aşılarda ticarileştirilmesini destekleyecektir.

İZMİR

.../.../2022

Aslı ADIYAMAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
TABLolar DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Tarihçe	5
2.2. <i>Clostridium perfringens</i> 'in Özellikleri	5
2.2.1. Patojenite	6
2.3. <i>Clostridium perfringens</i> Türleri	7
2.3.1. <i>Clostridium perfringens</i> tip a	7
2.3.2. <i>Clostridium perfringens</i> tip b	8
2.3.3. <i>Clostridium perfringens</i> tip c	8
2.3.4. <i>Clostridium perfringens</i> tip d	9
2.3.5. <i>Clostridium perfringens</i> tip e	10
2.4. <i>Clostridium perfringens</i> Toksinleri	10

İÇİNDEKİLER (devam)

2.4.1. Alfa toksin (cpa)	10
2.4.2. Beta toksin (cpb)	11
2.4.3. Epsilon toksin (etx)	15
2.4.4. Iota toksin (itx)	15
2.5. Toksin Tayin Yöntemleri	16
2.6. Toksin Genlerinin Tespiti	16
2.6.1. Moleküler testler	16
2.6.2. Serolojik ve biyolojik nötralizasyon testleri	17
3. AŞILAR	21
3.1. Veteriner Clostridial Aşılar	22
4. GEREÇ VE YÖNTEM	25
4.1. Gereç	25
4.1.1. Kullanılan bakteriler	25
4.1.2. Kullanılan besiyerleri	25
4.1.3. Kullanılan boyalar	26
4.1.4. Kullanılan çözeltiler	26
4.2. Yöntem	29
4.2.1. Protein tayin yöntemi (Bradford yöntemi)	29
4.2.2. Suşların büyütülmesi ve saklanması	31
4.2.3. Kullanılan besiyeri bileşenleri ve hazırlanışı	31

İÇİNDEKİLER (devam)

4.2.4. Fermentasyon süreci	33
4.2.5. Filtrasyon & konsantrasyon	34
4.2.6. Formulasyon	35
4.2.7. Toksin etkinliği için çalışma serumunun eldesi.....	35
4.2.8. İnaktif <i>C. perfringens</i> tip C antijeninin elisa yöntemi için hazırlanması...37	
4.2.9. Beta antitoksin elisa yöntemi ile testlerin uygulanması.....	38
5. BULGULAR.....	41
5.1. Fermentasyon Süreci Sonunda Gözlemlenen Bulgular	41
5.2. İnaktif Kültürde Total Protein Ölçümü.....	41
5.3. Serum Eldesi için Deney Hayvanları Uygulamaları.....	43
5.4. Beta Antitoksin Elisa Uygulama Detayları.....	43
5.5. Beta Antitoksin Elisa Uygulama Sonuçları	47
6. TARTIŞMA	48
7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	53
TEŞEKKÜR	57
ÖZGEÇMİŞ.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 <i>C. perfringens</i> beta-toksininin (Cpb) hücre içine dahil olduğu yollar....	14
Şekil 4.1 Boya solüsyonu ile oluşturulan örnek standart grafik	30
Şekil 5.1 Sonikasyon öncesi Cpc inaktif kültürü.....	42
Şekil 5.2 Sonikasyon sonrası Cpc inaktif kültürü.....	42
Şekil 5.3 Çalışma 1’de substrat eklendikten sonra oluşan plate görüntüsü	44
Şekil 5.4 Çalışma 1’de stop solüsyonu sonucu oluşan plate görüntüsü	44
Şekil 5.5 Çalışma 2’de substrat eklendikten sonra oluşan plate görüntüsü.....	45
Şekil 5.6 Çalışma 2’de stop solüsyonu sonucu oluşan plate görüntüsü	46

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 Dört ana toksin sınıfının varlığına veya yokluğuna dayalı olarak <i>C. perfringens</i> toksinotip sınıflandırması	6
Tablo 4.1 Besiyerinin A kısmı komponent miktarları	25
Tablo 4.2 Besiyerinin B kısmı komponent miktarları	25
Tablo 4.3 Bradford Yöntemi için oluşturulan grafikteki BSA seyreltmeleri	29
Tablo 4.4 595 nm’de standart solüsyonlara karşı okunan OD değerleri.	30
Tablo 4.5 Standart toksinin deney hayvanları uygulaması.....	36
Tablo 4.6 Standart Toksin+Standart Antitoksin İnkubasyon ve Deney Hayvanları Uygulamaları	36
Tablo 4.7 Çalışma 1 için plate dizaynı	38
Tablo 4.8 Çalışma 2 için plate dizaynı	39
Tablo 5.1 Çalışma 1’de stop solüsyonu sonucu oluşan OD değerleri	45
Tablo 5.2 Çalışma 2’de stop solüsyonu sonucu oluşan OD değerleri	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
<i>Ng</i>	Nanogram
<i>μg</i>	Mikrogram
<i>Mg</i>	Miligram
<i>G</i>	Gram
<i>Kg</i>	Kilogram
<i>μl</i>	Mikrolitre
<i>ml</i>	Mililitre
<i>L</i>	Litre
<i>Nm</i>	Nanometre
<i>μm</i>	Mikrometre
<i>Kb</i>	Kilobaz
<i>kDa</i>	Kilodalton
<i>M</i>	Molar
<i>°C</i>	Santigrat derece

Kısaltmalar**Açıklamalar**

ATP	Adenozin trifosfat
BPFT	Beta pore forming toxin
BSA	Bovine serum albumin
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
CFR	Amerika Birleşik Devletleri Federal Yönetmelikleri (Code of Federal Regulations)
Cpa	<i>Clostridium perfringens</i> alfa toksin
Cpb	<i>Clostridium perfringens</i> beta toksin
Cpb2	β 2 toksin
Cpc	<i>Clostridium perfringens</i> tip C
CPE	Enterotoksin
ÇK	Çalışma kültürü
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EN	Enteritis nekrotikans
EP	European Pharmacopoeia – Avrupa Farmakopesi
ETX	<i>Clostridium perfringens</i> epsilon toksin
FTS	Fizyolojik tuzlu su

GM1a	Gangliosid
H ₂ SO ₄	Sülfirik asit
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
I.M	İntramüsküler enjeksiyon
I.V	İntervenöz enjeksiyon
IgG	İmmüoglobülin G
ITX	<i>Clostridium perfringens</i> iota toksin
IU	International Unit
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Dihidrojen fosfat
Kob	Koloni oluşturan birim
L+1	Lethal dozun bir üst dilüsyonu
LAT	Lateks aglütinasyon testi
LC-MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi
LD50	Toksinin %50 Öldürücü Dozu
Log faz	Logaritmik faz
MALDI-TOF	Tandem kütle spektrometrisi
MNT	Fare nötralizasyon testi

N ⁺	Sodyum
Na ₂ HPO ₄	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO ₃	Karbonat
NaOH	Sodyum hidroksit
OD	Optik densite
PBS	Phosphate buffered saline
Pcr	Polimeraz zincir reaksiyonu
PFO	Perfringolisin O
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
Tnt	Toksin nötralizasyon testi
UPLC-MS	Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi
USDA APHIS	Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı, Hayvan ve Bitki Sağlığı Kontrol Merkezi

1. GİRİŞ

Clostridium genusu *Firmicutes* filumuna ait, insan ve hayvanlarda görülen, patojenik, çubuk şeklinde, anaerob, bazı genuslarda spor oluşturan Gram (+) bakterileri içerir. Toprak, su ve kanalizasyon atıkları başta olmak üzere doğada yaygın bir dağılım gösteren *Clostridia*'lar, hayvanların ve insanların gastrointestinal mikrobiyotasında da bulunmaktadır. Genusun tanımlanmış 200'den fazla türü bulunmaktadır ve bunların bir kısmı hayvan sağlığı açısından önemli patojenik etken olduğu bilinmektedir. Genusun üyelerinin bazıları dokularda lokal birikim ya da aktif invazyon yoluyla hastalık sürecinin oluşmasından sorumlu iken, diğer bir grubu bakteriyel toksinler yoluyla etki göstermektedir. (Arslan, 2019)

Clostridium perfringens anaerobik, gram pozitif çubuk şekilli bir bakteridir ve bu bakteri genusun en toksik türlerinden kabul edilir, farklı etki yollarına sahip 15'den fazla toksin tabiatında protein veya enzim üretmektedir. (Nagahama et al., 2015) *C. perfringens* suşları, diğerleri arasında öldürücü, nekrotik ve sitotoksik aktivitelere sahip alfa, beta, epsilon ve iota-toksinler olarak adlandırılan dört ana toksini detaylandırır ve beş gruba ayrılır. (Nagahama et al., 2015) Bunlar *Clostridium perfringens* tip A, B, C, D ve E'dir. Bu toksinler hedef hücreler üzerinde ya hücre membranlarında yapısal değişiklikler ile hücre geçirgenliğinin artması, iyon dengesizlikleri ve sıvı kaybının ortaya çıkması (alfa, beta ve epsilon toksinler) ya da aktin hücre iskeletinin tahrip etmesi (iota toksini) gibi farklı mekanizmalarla etki etmektedirler. Toksinlerin emilimi sistemik intoksikasyon ile beraber kardiyovasküler şok ve ölüme giden enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Hastalığın oluşması için gereken toksin miktarları genellikle çok düşüktür, özellikle genç hayvanlarda akut ya da perakut seyirli, yüksek ölüm gösteren ve hızlı gelişmesi nedeniyle tedavisi güç enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır. (Arslan, 2019)

C. perfringens'in farklı biyotipleri insanlarda ve hayvanlarda farklı hastalıklara neden olur. *Tip A* suşları genellikle kuzuların normal bağırsak mikrobiyotasının bir parçası olarak bulunur ve insanlarda gazlı kangren ve gıda zehirlenmesi ile ilişkilendirilmiştir. *C tipi* suşlar koyun, kuzu, buzağı, domuz yavruları ve kümes hayvanlarında enterotoksemi ve nekrotik enterite neden olur.

D tipi suşların koyun ve kuzularda dizanteri ve etli böbrek hastalığına neden olduğu düşünülmektedir. (Erganiş,2011)

C. perfringens tip C tarafından üretilen beta toksin, koyun, oğlak ve sığırlarda görülen, çok hızlı ilerleyen ve öldürücü bir hastalık grubu olan hemorajik ülserasyona, ince bağırsakta enterotoksemiye neden olur. Hayvanın rutin yaşamında hastalık oluşturmazlar. Bağırsak hareketlerinin azalmasına neden olan durumlarda hızla çoğalıp toksin oluştururlar. (Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Md, 2013) Hayvanların besi durumunun iyi olması, fazla süt verme, protein açısından zengin yemlerin tüketilmesi, ani yem değişikliği, kötü bakım, besleme gibi etkenler hastalığın hazırlayıcı sebeplerini oluştururlar. Bahsedilen etkenlerde değişiklik olması durumlarında rumende yer alan bakteri biyotasının yapısı kısa sürede bu değişikliğe ayak uyduramaz, fazla miktardaki yem veya sindirime uğramış olan yemler ince bağırsaklara geçer ve bu alanlarda *C. perfringens tip C* üreyerek toksinlerini oluşturur. (Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Md, 2013) Oluşan toksinler bağırsakların yapısını bozar. *C tipi* enfeksiyon dönemlerinde, nekro-hemorajik enterit, ince bağırsaktan sistemik dolaşıma beta-toksinin dahil edilmesini takiben yaygın olabilir. Bu hayvanlarda ölümden önce tetanik kasılma ve opistotonus gibi nörolojik semptomlar tespit edilmiş olup, ilgili nörolojik semptomların bağırsaklarda işlenen ancak daha sonra beyin gibi iç organları etkilemek için dolaşıma alınan toksinlere atfedildiğini düşündürmektedir.

Çiftlik hayvanlarında oluşan en önemli hastalıklar arasında olan enterotoksemilerin, ülkemiz de dahil olmak üzere dünya çapında et ve süt endüstrisinde ağır ekonomik kayıplar oluşturması ve doğum öncesi yavru ölümlerine neden olduğu bilinmektedir. Enfeksiyonun hızlı ve zorlu seyretmesi, hastalıkla mücadelede tedavi edici uygulamalar yerine koruyucu tedbirlerin ön plana çıkmasına neden olmaktadır. Enfeksiyondan korunmada antikora bağlı immunité rol oynar ve bu cevap serum antitoksin düzeyleri ile oldukça yakından ilişkilidir. Bu bakımdan hastalığın kontrolünde aşılamaya bağlı aktif bağışıklık önem kazanmaktadır. (Nagahama et al., 2015)

Hedef hayvanların aşılmasında bakterin-toksoid içeren inaktif veteriner biyolojik ürünler kullanılır. Toksoidler, hedef hayvanlarda immunojenik yanıt

oluşturan, fakat hastalık yapma yeteneğini kaybetmiş inaktif toksinlerdir. İmmünizasyon amacıyla kullanılan inaktif toksoidlerin; toksik olmayan (toksinin zararlı etkileri kaldırılmış), canlı mikroorganizma barındırmayan (toksin üretimine neden olabilecek hücresel etmenler bulunmayan) ve aşılınmış hayvanlarda koruyucu bağışık yanıtı oluşturma yeteneğine sahip olması gerekir. (Arslan,2019)

Geleneksel açıdan enterotoksemi aşılarının potens testi genellikle canlı hayvan kullanılarak test edilir. Bu nedenle tavşanların aşılınması ile elde edilen serum örneklerindeki serolojik yanıt, in vivo yöntem olan toksin nötralizasyon testi (tnt) ile ölçülür. Tnt bu tip aşılarda potensinin belirlenmesinde standart prosedürler arasında kabul edilmekle birlikte, immunize edilen hayvanlarda toksoide karşı oluşan fonksiyonel ve nötralize edici antikor düzeyinin, test hayvanlarına uygulanan referans bir toksinin varlığında, gücü bilinen standart bir antitoksinle karşılaştırılarak belirlenmesi ilkesini esas alan hayvansal tes yöntemleridir. (Arslan,2019). Şu anda, potens testi için mevcut olan in vivo yöntemler, laboratuvar hayvanlarında acı, ıstırap ve ölüme sebep olmaktadır. (Wilmes M.L., 2018)

Bu tür testlerin kesin sonuç olarak ölüm ya da paraliz gibi şiddetli klinik bulgulara dayalı devam etmesi, gelişmekte olan hayvan refahının iyileştirilmesi, laboratuvar hayvanlarına acı veren uygulamalardan uzaklaşılması ve testlerde kullanılan hayvan sayısının azaltılması yönündeki etik yaklaşımlara uygunluk göstermemektedir. Ayrıca zaman, maliyet ve işgücü gibi dezavantajlara da sahip olduğu bilinmektedir. Her bir bileşen için ayrı bir in vivo test ihtiyacının olması, polivalan bir aşıda potensin ortaya konmasında kullanılan hayvan sayısını, iş yükünü ve test maliyetini daha da arttıracak ortadadır.

Araştırmacılar tarafından farklı aşılarda potens testlerinde alternatif yöntemler arasında; immunize edilmiş hayvanların serum örneklerinde monoklonal ya da poliklonal antikorlara dayalı ELISA yöntemleri, aşıdaki hücresel antijen miktarının ölçülmesi ve relatif potensinin belirlenmesine yönelik immunokimyasal metotlar ile hücre kültürleri üzerinde yürütülen serolojik yöntemlerin geçerli olduğu toksite testleri denenmiştir. Özellikle antikor tabanlı ELISA metotları; testlerde kullanılan hayvan sayısının azaltılması, referans yöntemin sonuçlarına benzer bir benzerlik göstermesi, güvenli tekrarlanabilir sonuçlara ulaşılması, hızlı ve kolay

uygulanabilmesi bakımından alternatif metotlar içinde önem kazanmıştır.
(Arslan,2019)

Bu çalışmada çeşitli *Clostridium* türlerinin hastalık etmenlerini barındıran polivalan bir aşıda, enterotoksemi etkeni olan beta toksininin varlığının alternatif bir test yöntemi olan ELISA yöntemi ile çalışılarak validasyonunun yapılarak geçerliliğinin kılınması hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Clostridium perfringens çevremizde görülme olasılığı yüksek, patojen sporlu bakterilerden biridir. Amerikalı Dr. Welch ve ekip arkadaşları tarafından 1892 senesinde insan otopsisinden izole edilmiştir. Dr. Welch, enfekte olan kan damarlarında oluşan gaz kabarcıklarını gözlemlemiştir ve bu hastalık etkenini buradan izole ve tanımlamıştır. (Lucey & Grover, 2004) Başlangıçta *Bacillus aerogenes capsulatus* olarak isimlendirilen mikroorganizma için sırasıyla *Bacillus welchii*, *Bacillus perfringens*, *Bacterium welchii* veya *Clostridium welchii* isimleri kullanılmıştır ve günümüz literatüründe *Clostridium perfringens* olarak tanımlanmıştır. (Skerman V., McGowan V., Sneath P.,1980).

2.2. *Clostridium perfringens*'in Özellikleri

Clostridium, *Clostridia* sınıfındaki bir cins ve Firmicutes filumuna ait bir bakteridir. Toprakta, dışkıda, insan ve hayvan sindirim sistemlerinde bulunur. *Clostridium* spp. hareketsiz, anaerobik olarak büyüyen ve sporlar oluşturan Gram pozitif çubuklardır. (Wilmes M.L., 2018)

Tek bir *Clostridium perfringens* bakterisi ortalama 0,6-2 µm çapında ve 1,3-6 µm uzunluğundadır ve çift halde, tek çubuklar ve küçük kümeler halinde bulunabilir. Anaerobik koşullar altında 24 saatlik büyümeden sonra, *Clostridium perfringens* kolonileri pürüzsüz, dairesel, yarı saydam ve yaklaşık 2-5 mm çapındadır. (Wilmes M.L., 2018)

Clostridium perfringens, 15 °C ile 50 °C arasında büyüebilir ve birçok suş için optimum sıcaklık 37 °C 'dir. Çoğu suş için 33 °C ile 49 °C arasındaki sıcaklıklarda üreme süresi 8 dakika olarak rapor edilmiştir. (Labbe, 2000)

Anaerob olarak sınıflandırılan bakteriler, oksijen varlığında çoğalamazlar ve ayrıca katı anaeroblar veya aerotolerant anaeroblar olarak sınıflandırılabilirler. Katı anaeroblar oksijene maruz kaldıklarında yaşamazlar, aerotolerant anaeroblar ise anaerobik olarak büyürler ancak oksijene maruz kaldıklarında hayatta kalabilirler.

Clostridium perfringens mikro aerobik koşullarda hayatta kalma yeteneğine sahiptir, bu nedenle aerotolerant anaerob olarak sınıflandırılır. (Wilmes M.L., 2018)

Clostridium perfringens 'in genomu yaklaşık 3,6 milyar baz çiftidir. *Clostridium perfringens* 'teki DNA tek bir halkadır ve yaklaşık 45 enzimi kodlar. Bu bakterinin yeterli amino asit içermeyen bir ortamda büyümesine izin vermez. Bakterilerin tek kromozomu, %24 ila %55 arasında bir G-C konsantrasyonu içerebilir. Genom, birkaç taşıyıcı için kodlama ile 10 tane rRNA geni ve 96 tane tRNA geni içerir (Johansson A, 2009).

Clostridium perfringens, 4 ana toksinin üretimine göre (Alfa toksin, Beta toksin, Epsilon Toksini, Iota toksini) 5 toksinotipe ayrılır. Bunlar tip A, tip B, tip C, tip D ve tip E olarak isimlendirilir. Bununla birlikte, bu mikroorganizma perfringolisin O (PFO), enterotoksin (CPE) ve beta2toksini gibi öldürücü toksinler dahil olmak üzere çeşitli kombinasyonlarda 16'ya kadar toksin üretebilir. (Uzal ve diğerleri, 2014) Pek çok *Clostridial* türde olduğu gibi, *Clostridium perfringens* 'in virülansının etkisi toksinlerin üretimine bağlıdır.

Tablo 2.1 Dört ana toksin sınıfının varlığına veya yokluğuna dayalı olarak *C. perfringens* toksinotip sınıflandırması. (Wilmes M.L., 2018)

Tip	Alfa	Beta	Epsilon	Iota
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

2.2.1. Patojenite

Clostridial bakteriler tarafından üretilen pek çok toksin mukozal nekrozla ilişkilidir. (Nagahama M., 2015) *Tip C* izolatının neden olduğu nekrotizan enterokolit, proksimal jejunumun çeşitli bölgelerini etkileyen mukozal nekroz ile kendini gösterir ve bu, birkaç vakada gözlenen endoskopik incelemelerle doğrulanmıştır. (Nagahama M., 2015) Toksinlerin emilimi sistemik zehirlenme ile birlikte kardiyovasküler şok ve ölümle sonuçlanan enfeksiyonlara neden olmaktadır. Virulans faktörü olarak kabul edilen toksinin hastalığı oluşturma için

gereken miktarları genellikle çok düşüktür, özellikle genç hayvanlarda akut veya perakut oluşan, yüksek ölüm oranı barındıran ve hızlı seyretmesi nedeniyle tedavisi güç enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır (Arslan A., 2019). Yeni doğanlarda enfeksiyonların meydana gelmesi için *C. perfringens*'in önce konakçı sindirim sistemine girmesi gerekir. Normal bağırsak mikrobiyotasının yeni doğanlarda stabil bir topluluk geliştirmesi zaman alır, bu da onları *tip C* suşları tarafından kolonizasyona karşı oldukça duyarlı hale getirerek genç hayvanlarda hastalığa neden olur. (Wilmes M.L., 2018) Bulaşma, kontamine olmuş meme başlarını emerek, bakteriyi taşıyan annelerden emzirme sırasında kolostrum yutarak, etraftaki kontamine nesnelere yalayıp veya enfekte hayvanlardan kontamine dışkı materyali ile yakın temas yoluyla fekal oral yolla oluşur. Duyarlılığın yeni doğanda düşük veya eksik proteinaz aktivitesine bağlı olduğuna inanılmaktadır ve kolostrumdaki tripsin inhibitörleri bu soruna katkıda bulunabilir. (Wilmes M.L., 2018) Genç hayvanlarda normal mikrobiyotanın gelişimi sağlandıktan sonra, toksinotip C bakterilerinin neden olduğu fırsatçı enfeksiyonlar büyük ölçüde azalır. Beta-toksin, transmural bağırsak nekrozuna neden olur. *C tipi* suş enfeksiyonları öncelikle bebek hayvanlarda görülürken, yetişkin hayvanlar da enfeksiyonlara karşı hassastır. Bu muhtemelen, bağırsakta büyüme, kolonizasyon ve toksin üretimini destekleyen mide pH'ındaki bir artışı etkileyen gastrointestinal faktörlerden kaynaklanmaktadır. Bu hastalığın ilerlemesi için gerekli görülen risk faktörlerinden bazıları, yetersiz proteinli gıda veya pankreas hastalığından sorumlu olan tripsin üretiminin azalması olarak gösterilebilir.

2.3. *Clostridium perfringens* Türleri

2.3.1. *Clostridium perfringens* tip a

Clostridium perfringens tip A, tüm *C. perfringens* türleri arasında en yaygın olanıdır ve toksijenik özelliklerde en değişken olanıdır. (Niilo L., 1980) Esas olarak alfa toksin üretimi ile karakterize edilir ve *Clostridium perfringens* 'in neden olduğu çoğu hastalığın başlıca virülans aracısıdır. İnsanlarda dahil olmak üzere koyun, sığır, keçi ve atlar dahil diğer memelilerin gazlı kangren (clostridial miyonekroz) oluşumunda esas sebeptir. Ayrıca travmatik enfeksiyonlar, nekrotik enterit ve normal bağırsak yolu iltihabı oluşturabilir. (Johnston et al., 1962)

Tip A, alfa toksinden başka, enterotoksin (CPE) ve β 2 toksin (Cpb2) de üretebilir (Songer, 1996). Cpb2 üreten *C. perfringens tip A* da yakın zamanda koyun ve keçiler de dahil olmak üzere birçok hayvan türünde hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Dray T, 2004); (Bueschel D.M. ve diğerleri, 2003)

Clostridial enfeksiyonlar, dünya genelinde görülen ve ani ölümle sonuçlanan birçok hastalığa neden olur. *Clostridium perfringens tip A* gibi yeni etkenlerin yaygınlığının artmasıyla, hayvancılık sektöründe önemli ekonomik kayıplar ortaya çıkar. Bu hastalıklar toksikasyonla seyrettikleri için tedavi edilmeleri mümkün değildir ve çok hızlı gelişerek yüksek oranda ölüme neden olurlar. Hayvancılık sektöründe *Clostridial* hastalıklardan korunmanın en etkili ve tek yöntemi aşılamaştır.

2.3.2. *Clostridium perfringens tip b*

C. perfringens tip b, hayvanların sindirim sisteminde düşük miktarda ($<10^3$ kob/g) bulunur ve alfa, beta ve epsilon toksinlerini üretir. (Niilo., 1980). Bu bakteriler koyunların önemli patojenleri olmakla birlikte keçi, buzağı ve taylarda da hastalığa neden olmaktadır. *C. perfringens tip b* enterotoksemisi, bu bakterilerin toksin üretmesi ile birlikte bağırsakta çoğaldığında başlar. Bu toksinler başlangıçta bağırsakları etkiler, ancak daha sonra emilir ve sistemik olarak hareket eder. (Nagahama M., Kobayashi K., Ochi S., Sakurai J., 1991) Sonuç olarak hayvanda, geniş nekroz ve ince bağırsakta kanama ve enterotoksemi ile sonuçlanan enterite sebep olur. Çoğunlukla akut nörolojik belirtilere veya ani ölüme sebep olur.

2.3.3. *Clostridium perfringens tip c*

Hem insanlarda hem de çeşitli hayvan türlerinde (atlar, koyunlar, sığırlar ve domuzlar) ortaya çıkan *C. perfringens tip c* enfeksiyonları, enterotoksemisinin eşlik edebileceği nekrotik enterit olarak görülür. C tipi hastalığının çoğunluğu, akut veya perakut formda ortaya çıkan ve şiddetli karın ağrısı, kanlı ishal ile nitelendirilir ve yenidoğan hayvanlarda gözlenir.

Clostridium perfringens beta toksini, tip C enfeksiyonlarında ana virülans faktörü olarak kabul edilir (Fisher DJ et al., 2006). İnsanlarda C tipi hastalık,

Darmbrand veya Pigbel olarak da adlandırılan enteritis nekrotikans (EN) olarak ortaya çıkar. EN vakalarının çoğu, diyetlerin ve tatlı patates gibi tripsin inhibitörleri açısından zengin temel gıdaların tüketildiği gelişmekte olan ülkelerde görülür.

C. perfringens toksinotip C bakterileri bağırsağa ulaştığında, ince bağırsağın epiteline yapışarak nekroza neden olan alfa ve beta toksinleri salgırlar. Beta toksinin neden olduğu hasar, diğer toksinlerin (alfa toksin gibi) konakçının dolaşım sistemine girmesine izin verir. Dolaşan diğer toksinler, epitel hücrelerinin yıkımını şiddetlendirir ve bakteri istilasına izin verir. Tüm bunlar, artan toksin üretimine, hücrenel nekroza, kanamaya ve ölüme yol açan kademeli bir etkiye neden olur. Tüm bu gözlemler, Cpb' nin virülans için en önemli toksin olduğu inancına katkıda bulunur.

2.3.4. *Clostridium perfringens* tip d

Clostridium perfringens tip d, koyun ve keçilerde enterotoksemisinin en yaygın şeklidir. *C. perfringens* tip D'nin neden olduğu hastalığın patogenezi çoğunlukla epsilon toksin oluşturur. *C. perfringens* tip d en iyi bilinen *C. perfringens* tipidir, ayrıca epsilon toksin üretir. Koyunlarda D tipi enterotoksemi vakalarının çoğu, diyetdeki ani değişikliklerle, yüksek oranda fermente olabilen karbonhidratlar açısından zengin yemlerle ilgilidir. Sonuç olarak, büyük miktarlarda sindirilmemiş karbonhidrat ince bağırsağa giriş yapar. Bu genellikle, hayvanların tahıllara aşamalı olarak adapte edilmeden beslenmeye başlanması ve ilkbahar ve sonbaharda yağmurlardan sonra yeşil çimenlere erişim olmadan besi alanlarına getirilmesi ile ilişkilidir (Bullen and Cushnie., 1963). Sindirim enzimlerine karşı oldukça dirençli olan epsilon toksin bağırsakta fazla miktarda üretildiğinde, sistemik dolaşım ile birlikte absorbe olarak organ ve dokulardaki kılcal damarlarda geçirgenlik artışı oluşturur.

Koyunları ve keçileri enterotoksemiden korumanın en etkin yolu aşılamaadır. Aşılar, dünya çapında koyun ve keçilerde en sık kullanılan biyolojikler arasındadır. Bu nedenle, çiftlik sahipleri ve veteriner hekimler, D tipi enfeksiyonlarını ortadan kaldırmak için sıklıkla aşı kullanırlar.

2.3.5. *Clostridium perfringens* tip e

Iota toksini *Clostridium perfringens* tip E'nin temel toksinidir. Toksin proteolitik enzimler ile aktive olur. Bu toksin kapillar arasındaki geçirgenliği artırır ve doku ölümlerine sebep olur.

2.4. *Clostridium perfringens* Toksinleri

2.4.1. Alfa toksin (cpa)

Clostridium perfringens 'in tip a suşlarının insanlarda gazlı gangrene ve yumuşak seyirli ishale sebep olduğu kaydedilmiştir. Cpa, enzimatik aktivite ile hücre zarlarını değiştiren bir toksinin klasik bir örneğidir. Toksinotip A suşları sadece majör toksin alfa toksin üretir ve bu toksini cpa genine sahip diğer toksinotiplere göre daha yüksek konsantrasyonlarda üretirler. (Johnston et al.,1962) Cpa'yı kodlayan gen, bakteri kromozomu içinde stabil bir bölgede bulunur ve tüm *C. perfringens* izolatlarında bulunur. Cpa, kalsiyum iyonlarının varlığında hücre zarlarına bağlanan 370 amino asitten oluşan bir çinko metalloenzimdir. Katalitik N alanı ve zar bağlayıcı C alanı olmak üzere iki ana alana ayrılır. Sadece zar bağlayıcı C alanı immün koruyucudur. Cpa ayrıca gangliosid (GM1a) bağlama bölgesi içeren merkezi bir döngü alanına sahiptir. Ek olarak, Perfringolysin O (PFO) olarak adlandırılan gözenek oluşturucu toksinlerin kolesterol bağımlı sitolizin ailesinin bir üyesinin, gazlı kangrende gözlenen patolojik etkileri üretmek için Cpa ile sinerjistik olarak hareket ettiği gösterilmiştir. Ancak hastalıkta PFO'nun tek başına rolü önemsiz görünmektedir. (Uzal et al., 2018)

Alfa toksin, fosfatidilkolini parçalayan çinko bağımlı bir fosfolipaz C'dir ve ökaryotik hücre zarlarının her iki bileşeni olan sfingomyelin, eritrositlerin zarında ve hepatositler ve miyositler dahil olmak üzere birçok hücre tipine zarar verir. (Uzal et al., 2014; Wilmes M.L., 2018) Bu aktivite sonucunda, fosforilkolin baş gruplarının bölünmesiyle hücre yüzeyinde bulunan fosfolipid çift katmanlarını bozar, bu da hücre zarını bozarak nekroz ve hücre lizisine neden olur. Hücre membranı lesitin içerdiğinden dolayı alfa toksin yapısı ile yıkıma uğrar. Cpa ayrıca hemolize yol açan diğer bazı membran ve iç hücre mekanizmalarını da aktive eder. (Wilmes M.L., 2018; Uzal et al., 2014)

Koyunlarda alfa toksin sarı kuzu hastalığına ve yine kuzularda nadir görülen bir akut enterotoksemi şekline sebep olur. Bu hastalığın patogenezi hakkındaki bilgiler minimaldir ve çoğu zaman çelişkilidir, ancak genellikle çoğu klinik belirti ve lezyonlar alfa toksinin etkilerinden kaynaklanmaktadır. (Uzal et al., 2014)

2.4.2. Beta toksin (cpb)

Clostridium perfringens tip c tarafından üretilen beta-toksin, ince bağırsaktaki mikroorganizmanın neden olduğu nekrotizan ve inflamatuvar bir hastalık olan nekrotik enteritin önemli bir ajanıdır. Beta-toksin, *Staphylococcus aureus* alfa-toksin, lökositin ve gama-toksin içeren bir β -gözenek oluşturucu toksin ailesine aittir. Bu toksine duyarlı hücre dizileri bulunmuştur. (Nagahama M., 2015) Cpb, plazmit kodlu gen cpb tarafından kodlanır ve “beta pore forming toxins” olarak bilinen heptamerik proteinler ailesi üyesi olarak bilinir (BPFT). (Gurjar A., Li J., 2010)

Beta toksin, insanlarda enteritis nekrotikans (pigbel) ile ilişkilidir. Enteritis nekrotikans; *Clostridium perfringens* tip c ürettiği β 2 toksininin (Cpb2) hem hayvanlarda hem de insanlarda oluşturduğu bağırsak enfeksiyonu etkenidir. Bununla birlikte, patojen rolleri ve fonksiyonel mekanizmaları ile ilgili çalışmalar, toksin saflaştırmanın zorluğu ve bu toksine karşı spesifik antikorların olmaması sebebiyle engellenmiştir. *C. perfringens* tip c tarafından üretilen β -toksinin neden olduğu enteritis nekrotikans kontamine gıdaların tüketilmesiyle, abdominal kramplar, kanlı ishal, kusma gibi semptomlarla karakterize edilir. Bağırsakta bulunan Cpb2-pozitif *C. perfringens* suşlarının varlığı insanlardaki bağırsak hastalıklarıyla ilişkilendirilmiştir. Bağırsakta oluşan nekrotik yangının, ileri safhalarda bağırsak tıkanıklıklarına ve sistemik toksemi sonucu ölümlere neden olduğu bilinmektedir. Koyunlarda ölümcül hemorajik dizanteriden sorumludur, bağırsak mukozasının hemorajik nekrozunu indükler (Johnston et al., 1962; Pasman et al., 2010). Cpb ayrıca sığır, keçi ve koyun dahil olmak üzere birçok evcil hayvan türünde nekrotik enterit veya enterotoksemide rol oynar. (Johnston et al., 1962) Bu hastalık en çok bu türlerin genç hayvanlarında görülür ve genel olarak hem hayvanların hem de insanların bağırsak epitelinde ciddi hasara neden olabilir. (Saadh ve diğerleri, 2020) Yenidoğan hayvanlarda enfeksiyonların meydana

gelmesi için *C. perfringens*'in önce konakçı sindirim sistemine girmesi gerekir. Normal bağırsak mikrobiyotasının yenidoğanlarda stabil bir topluluk geliştirmesi zaman alır, bu da onları tip C suşları tarafından kolonizasyona karşı oldukça duyarlı hale getirerek genç hayvanlarda hastalığa neden olur. Ayrıca bu toksin, hayvanların baş, boyun ve omurganın geriye doğru kavis gösterdiği opisthotonos olarak da bilinen sert felç içeren nörolojik bir hastalığa neden olabilir. Bu nörolojik tutulum, toksinin dolaşıma girebilmesi ve kan beyin bariyerini geçebilmesi nedeniyledir. (Wilmes M. L., 2018)

Beta-toksinin öldürücü ve dermonekrotik aktiviteleri olduğu bilinmektedir ancak hemolitik değildir. Yetişkin fareler için toksinin %50 öldürücü dozu (LD50), intravenöz (damar içi) ve intraperitoneal olarak enjekte edildiğinde sırasıyla 310 ng/kg ve 4.5 µg/kg'dır. (Martin et al., 1988) Kobaylar için minimum nekrotik doz yaklaşık olarak 2 ng'dır. Beta-toksinin öldürücü ve dermonekrotik aktiviteleri, N-etilmaleimid, 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic asit) ve iyodoasetat gibi tiyol grubu reaktifleri ve o-iyodosobenzoat ve oksitlenmiş glutatyon gibi oksitleyici maddeler tarafından inhibe edilebilir. (Nagahama et al., 2015)

2.4.2.1. Beta toksinin gen regülasyonu

C. perfringens tip c suş izolatları, Cpb genini taşıyan bir virülans plazmidi aracılığıyla kodlanmaktadır ve olgun beta toksin proteinini oluşturmak üzere bölünen 27 amino asitlik bir lider diziyi içeren 336 amino asitlik bir proteini kodlar. (Wilmes M. L., 2018) Beta-toksin geni, IS1151 ekleme dizisini de içeren *C. perfringens*'teki büyük plazmit DNA'larında bulunur. C tipi suşların, ~65 ila ~110 kb arasında değişen bazı plazmitlerde beta toksin kodlayan geni taşıdığı bilinmektedir. (Nagahama et al., 2015) Cpb'nin çıkarılan amino asit dizisi, *S. aureus*'un delta toksini ve beta-gözenek oluşturucu toksinleri (BPFT'ler) ile önemli bir benzerlik paylaşır. Cpb, a-hemolizin ailesinin klostridial β-PFT'si olarak sınıflandırılır. (Uzal et al., 2018)

2.4.2.2. Beta toksin karakterizasyonu

Bakteriyel toksinler genellikle endotoksinler veya ekzotoksinler olarak sınıflandırılır. Endotoksinler, dış zarla bağlantılı bir lipopolisakkarit kompleksine

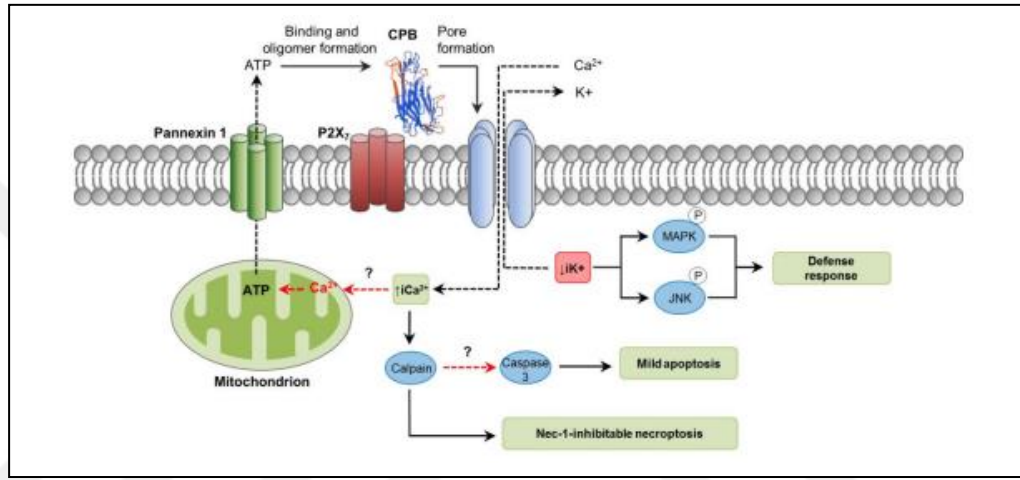
sahip gram negatif bakterilerin hücre zarfıyla ilişkilidir. Ekzotoksinler proteinlerdir ve çoğu gram pozitif ve gram negatif bakteri tarafından salgılanır. Ekzotoksinin bir alt sınıfı, bağırsağı hedef alan ve genellikle hücre zarlarını bozan gözenek oluşturan toksinler olan enterotoksinlerdir. Cpb, bir monomer veya oligomer olarak bulunur ve gözenekleri oluşturan bir ekzotoksin olarak tanımlanır. Toksin (monomerik form) kolayca oligomerik forma dönüşür. Monomerik form toksiktir, ancak oligomerik form, monomere ayrışması zor olan formdur, toksik değildir ve toksinin aktif formdan aktif olmayan forma kolayca değiştiğini gösterir. Tüm bu bulgular, beta-toksinin, membranlarda fonksiyonel bir oligomer oluşturan alfa-toksin ile aynı aileye ait olduğunu göstermektedir. (Nagahama et al., 2015) Saflaştırılmış Cpb 50°C'de 1 saat (veya 100°C'de 10 dakika) inkübasyonla öldürücü aktivitesinin >%90'ı inaktive olan termolabildir. (Uzal et al., 2014) Beta toksin ayrıca ve diğer proteazlara karşı aşırı duyarlı olmasıyla karakterize edilir. Bu tripsin duyarlılığı nedeniyle, Cpb yalnızca hem hücre içi hem de laboratuvar koşullarında tripsin inhibitörlerinin varlığında aktiftir. (Uzal et al., 2018)

Bu toksin düşük pH'da toksin aktivitesinden etkilenmez (Uzal et al., 2014). Ayrıca proteinazlara ve ısıya karşı oldukça hassastır, kolay etkilenir. Sakurai ve Duncan'ın yaptığı bir çalışmada toksin, 50°C'de 0.01 M fosfat tamponu (pH 7.0) içinde inkübe edildiğinde, 5 dakika içinde toksin aktivitesinde %75'lik bir azalma olduğu, 60 dakikalık inkübasyondan sonra, ilk aktivitenin %95'inden fazlası kaybedildiğini gördüler. Bu veriler, beta-toksinin ısıya dayanıksız olduğunu gösterir. Yine Sakurai ve ark. beta-toksin aktivitesinin sülfidril grubu reaktif reaktifler tarafından inhibe edildiğini gösterdi.

2.4.2.3. Beta toksin mekanizması

Beta toksini, HUVEC hücre zarlarında multimerik kompleksler oluşturan gözenek oluşturuvcu bir toksindir ve fosfolipid çift katmanlarında katyon seçici gözenekler oluşturur. Bir hipotez, Cpb monomerlerinin (35 kDa) duyarlı membranlara dahil edilmesi ve bir transmembran gözenek oluşturmak üzere ~228 kDa heksamerlere veya heptamerlere oligomerize edilmesidir. Daha yakın zamanlarda, Cpb monomerlerinin hücre yüzeyinde tanımlanamayan bir reseptörü tanıdığı, daha sonra bir ön gözenek oluşturmak üzere oligomerize olduğu ve ön

gözenek bir gözenek oluşturmak için lipid çift tabakasına yerleştirildiği varsayılmıştır. Mekanizmadan bağımsız olarak, Cpb'nin neden olduğu hücre ölümü, hücre lizisine neden olan Na^+ ve Cl^- iyonlarının eş zamanlı akışı ile K^+ ve Ca^{2+} akışına neden olan gözeneklerin oluşumuyla başlatılır. Şekil 2.1'de *C. perfringens* beta-toksininin (Cpb) hücre içine dahil olduğu yollar görülmektedir. Hayvanlarda gözenek oluşturan Cpb'nin neden olduğu enfeksiyonları önlemek için, profilaktik aşılanmanın C tipi hastalığın önlenmesinde çoğunlukla etkili olduğu kanıtlanmıştır.



Şekil 2.1 *C. perfringens* beta-toksininin (Cpb) hücre içine dahil olduğu yollar. (Uzal et al., 2018)

Cpb yapısı, standart ayarlar kullanılarak SwissModel çevrimiçi yazılımı (Genbank ID: L13198) tarafından tahmin edildi. İlk Cpb'nin potansiyel reseptörüne, ATP kapılı P2X7 reseptörüne bağlanması, hedef hücrelerden hızlı bir ATP salınımı zirvesine neden olur. Bu ATP kaybı, hücre lizisi ile ilişkili değildir ve ATP salma kanalı panneksin 1 yoluyla meydana gelir. Serbest kalan ATP, toksinin gözenek oluşturucu aktivitesini kolaylaştırarak, daha fazla Cpb bağlanmasını ve oligomer oluşumunu uyaracaktır. Gözenek oluşumu Ca^{2+} akışına ve intrasitoplazmik K^+ (iK^+) kaybına neden olur. iCa^{2+} artışı kalpain aktivasyonu ve Nec-1 tarafından inhibe edilen nekroptoz ile ilişkilidir; sadece düşük seviyelerde kaspaz-3 aktivasyonu meydana gelir, bu da apoptozun önemli bir hücre ölümü mekanizması olmadığını gösterir. iK^+ azalması, konak hücrenin hayatta kalmasını ve savunma yollarını aktive eden MAPK ve JNK'nin aktivasyonu ile ilişkilidir. Kesikli kırmızı oklar, mevcut yazarlar tarafından varılan ve/veya önerilenleri temsil eder. Kesikli siyah ok yönü gösterir. (Uzal et al., 2018)

2.4.3. Epsilon toksin (etx)

Bu toksin potansiyel biyolojik silah (biyoterörist ajan) olarak tanımlanmıştır. Epsilon toksini spesifik membran reseptörlerini tanır, bağlanır ve duyarlı hücrelerin hücrel membranında gözenekler oluşturarak hücrel geçirgenlikte hızlı ve çarpıcı bir artış yaratır. Etx bağırsakta üretilir, ancak toksin esas olarak beyni, düz kas hücreleri, akciğerler, kalp ve sinir sistemi gibi uzak organları hedefler ve gözenek oluşturuu bir toksindir. Epsilon toksini, *C. perfringens* toksinotipleri B ve D'nin başlıca virülans faktörü olarak kabul edilir ve birçok hayvan türünde kan basıncının yükselmesine, düz kasın kontraktilesinin artmasına, vasküler geçirgenliğin artmasına ve akciğerlerde ve beynin ödemeine neden olur. Toksinotip B evcilleştirilmiş hayvanlarda çok nadir görülürken, çoğu vaka Birleşik Krallık ve Orta Doğu'dan rapor edilirken, toksinotip D koyun ve keçilerde enterotokseminin en yaygın nedenidir. (Johnston et al., 1962) Etx ayrıca beyni, akciğeri ve düz kas hücrelerini etkileyen gözenek oluşturuu bir toksindir. Etx'in dikkate değer bir özelliği, astrositleri, mikrogliaları veya merkezi sinir sistemi nöronlarını öldürmeden seçici olarak oligodendrositlerin ölümüne neden olma yeteneğidir. Bireysel olarak, iki bileşen aktif değildir, ancak birlikte G-aktinin ADP-ribosilasyonu yoluyla bağırsak hücre geçirgenliğini ve hücre yuvarlanmasını artırarak enterotoksemiye ve ölüme neden olur. (Wilmes M.L., 2018)

2.4.4. Iota toksin (itx)

Iota toksini, Ia (enzimatik bileşen) ve Ib (bağlayıcı bileşen) olmak üzere iki proteini kodlayan bir ikili gen toksinidir. Her iki protein de bir konak hücrenin hücrel membranında gözenek oluşumu için gereklidir ve tripsin veya kimotripsin tarafından proteolitik olarak aktive edilir. Itx'in hastalığıdaki spesifik rolü şu anda belirsizliğini koruyor. Iota toksini düz kas kasılmasının inhibisyonuna ve endositoz, ekzositoz ve sitokinezin bozulmasına neden olur. Yalnızca toksinotip E suşları iota toksin üretir ve iota toksini ile ilişkili bildirilen enfeksiyonlar nadirdir, ancak sığır, at, koyun, domuz ve tavşanlarda belgelenmiştir. (Johnston et al., 1962)

2.5. Toksin Tayin Yöntemleri

Clostridium perfringens'in toksinleri stabil değildir ve protein yapısında olduğundan hızlı bir şekilde yapısı bozulabilir. Analiz için gerekli numuneler kısa sürede analiz edilmezse veya analize kadar uygun olmayan laboratuvar koşullarında muhafaza edilmez ise yanlış negatif sonuçlara neden olur. (Duracova ve diğerleri, 2018). Ayrıca Sakurai & Duncan (1975) ve Pivnick ve ark. (1965) tarafından yapılan başka bir çalışmada kültür süpernatantındaki beta ve epsilon toksinlerinin öldürücü aktivitelerinin durağan fazın başlamasından sonraki 1-2 saat içinde keskin bir şekilde azaldığını bildirmiştir. Toksinleri saptanması ve tanımlanmasında son yıllarda pek çok yöntem ortaya çıkmıştır.

Enterotokseminin kesin tanısı, serolojik testler ve ELISA, Pcr, real time Pcr, immünohistokimya vb. moleküler teknikler yardımıyla bağırsak sıvısında, dokuda, kültür süpernatantlarında ve diğer vücut sıvılarında toksininin saptanması temelinde konulabilir.

2.6. Toksin Genlerinin Tespiti

2.6.1. Moleküler testler

2.6.1.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (pcr)

Başlangıçta, 1990'larda, ilgili toksinleri kodlayan genlere dayalı olarak *C. perfringens* toksinlerinin üretimi için bakteri genlerinin varlığını saptamak için polimeraz zincir reaksiyonu testi geliştirildi. Polimeraz zincir reaksiyonu (Pcr), *C. perfringens*'in tiplendirilmesi için in vivo toksin nötralizasyon testlerine faydalı bir alternatif sağlar. Bu nedenle, toksin kodlayan genin saptanması enterotoksemi tanısında çok önemli ve yardımcıdır. Koyun ve keçilerin bağırsak içeriğinde veya dışkıında ve bağırsak dokusunda bulunan *C. perfringens* suşlarının multipleks Pcr tabanlı toksinotiplendirilmesi artık hastalıkların teşhisi için yaygın olarak kullanılmaktadır. (Pawaia S.R. et al., 2020)

2.6.1.2. Gerçek zamanlı (Real Time) pcr

Real time Pcr tekniği, birçok yazar tarafından *C. perfringens*'in toksin genlerinin saptanması için kullanılmıştır. Enterokolitten etkilenen atlarda *C. perfringens*'in saptanması için kullanılmış ve sonuçlar 30 dışkı örneğinde *C. perfringens* tip C enfeksiyon prevalansının %40 (12/30) olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, sığır ve koyun dışkı örneklerinin %40 ve %70'inde alfa toksin geni saptanmıştır. *C. perfringens* alfa, beta, β 2, epsilon, enteroksin ve iota toksinin tespiti için gerçek zamanlı florojenik PCR'ler geliştirilmiştir. Çift etiketli floresan hidroliz probu (TaqMan[®]) tabanlı gerçek zamanlı multipleks Pcr testi, toksin genleri alfa (cpa), beta (cpb), iota (itx), epsilon (etx), beta2 (Cpb2) ve *C. perfringens*'in enterotoksin (CPE) doğrudan sığır dışkısından izole edilip çalışılmıştır. (Pawaia S.R. et al., 2020)

2.6.2. Serolojik ve biyolojik nötralizasyon testleri

Enterotoksemiden etkilenen hayvanlardan bağırsak içeriğinde toksin tespiti, enterotoksemi için en iyi tanısal test olarak kabul edilir. Diğer vücut sıvıları ve kültür süpernatantlarının yanı sıra bağırsak içeriğinden toksin tespiti için çeşitli testler mevcuttur. Teknikler, ELISA'lar, karşı immünoelektroforez ve fare nötralizasyon testi dahil olmak üzere birkaç tanedir. (Pawaia S.R. et al., 2020)

2.6.2.1. Fare nötralizasyon testi (mnt) / toksin nötralizasyon testi (tnt)

Biyolojik ve biyolojik olmayan örneklerde toksin saptamak için yaygın olarak kullanılan bir biyolojik nötralizasyon testidir. Diğer serolojik testler geliştirildikçe kullanımı azaltılmıştır. MNT yaygın olarak diğer serolojik testlerin tanısal etkinliğini doğrulamak veya karşılaştırmak için karşılaştırmalı bir test olarak kullanılır ve ayrıca klostridiyal aşuların potens testi için kullanılır. MNT, bağırsak içeriğinde ve vücut sıvılarında toksini saptamada sırasıyla %54,54 ve %100 mutlak duyarlılığa ve özgüllüğe sahiptir. (Pawaia S.R. et al., 2020)

Potens testi, toksinin gücünü ölçmek için kullanılan bir test çeşididir. Bu amaç gözetilerek tavşanların aşılması sonucu elde edilen serumlardaki antikor yanıt, fare toksin nötralizasyon testi (tnt) ile ölçülür. (Arslan A., 2019) Tnt, Toksin

nötralizasyonu testi, toksinler baz alınarak yapılan tiplendirme çeşididir. Toksin nötralizasyon testi, toksine spesifik antiserum kullanılarak gerçekleştirilir. Tnt için, genellikle standart toksin kullanılır ve aranan üniteye göre test serum dilüsyonları hazırlanır. Hazırlanan serum dilüsyonları farelere intravenöz/intramuskuler yolla enjekte edilir. Fareler belirli gün ve belirli süreyle gözlenir ve ölüm durumuna göre serumlarda bulunan antikor değeri IU olarak belirlenir. Artık bu ve benzeri testlerde deney hayvanları yerine, alternatif metotların kullanılması çeşitli sebeplerle yaygınlaşmıştır. Tnt; enterotoksemi aşılarının potensinin ölçülmesi açısından standart prosedürler içinde kabul edilmektedir ve immunize edilen hayvanlarda toksoide karşı oluşan işlevsel ve nötralize edici antikor seviyesinin, test hayvanlarına (farelere) uygulanan referans bir toksinin varlığında, gücü bilinen standart bir antitoksinle karşılaştırılarak saptanması esasına dayanan hayvansal modeller olarak bilinir. Toksinin test hayvanlarında oluşturduğu ölümcül etkisinin nötralizasyon derecesine bakılarak oluşan antitoksin seviyesi hesaplanabilmektedir. Testin dizaynı, çalışılan serumda, beklenen seviyede antitoksin oluşup oluşmadığının değerlendirilmesi prensibi ile ilişkili olduğundan, test için geçer bir limit değeri oluşturulur, sonuçta bu limit değere eşdeğer, altında ya da üzerinde antikor var olup olmaması kararı verilir. (Arslan A., 2019)

Çeşitli uluslararası yayınlar ve çeşitli incelemelerde (CFR, EP gibi) veya yetkin otoriteler tarafından onaylanan aşı protokol dosyalarında klostridial komponentlerle ilgili olarak birim hacim başına kabul edilebilir antitoksin düzeyleri tanımlanmış olup, bu seviyeler dikkate alınarak aşuların potensi hesaplanmaktadır. (Arslan A., 2019) Ancak TNT oluşum açısından çokça deney hayvanı kullanımına ihtiyaç gösteren bir test olduğu için birçok problemle karşı karşıya kalınabilir. Tüm in vivo yöntemlerinin uygulanması sırasında, yöntemin yapısı ile alakalı çeşitli belirsizlik bileşenleri (canlının bireysel bağışıklığı, bakım ve besleme şartları, hijyenik şartlar, çevresel faktörler, uygulama yapan kişinin manipülasyon yeteneği gibi) yöntemlerin tekrarlanabilirliği ve validasyonlarını güçleştirmektedir. Özellikle uygulama yapılan hayvanların bireysel şartlarına bağlı test sonuçlarının değişkenlik göstermesi veya geçersiz test sonuçlarının oluşması mümkündür. Bu da testlerin tekrarlanmasına ve kullanılan hayvan sayılarının daha da artmasına sebep olabilmektedir. (Arslan A., 2019) Bu tür testlerin sonuç olarak letalite ya da paraliz gibi şiddetli bulgulara dayalı devam edilebilmesi, gelişmekte olan hayvan refahının

iyileştirilmesi ve geliştirilmesi, hayvanlarda acı veren uygulamalardan uzak durulması ve testlerde kullanılan hayvan sayısının mümkün olduğunca azaltılması yönündeki etik yaklaşımlara uygun değildir. Ayrıca zaman, test giderleri ve işgücü açısından da dezavantajlara sahip bir yöntem olduğu ortadadır. (Arslan A., 2019) Her bir komponent için ayrı bir *in vivo* test ihtiyacının varlığı, polivalan bir aşıda potensin belirlenmesinde kullanılan hayvan sayısını, iş yükünü ve test giderlerini daha da arttıracığı görülmektedir.

2.6.2.2. Enzim bağlantılı immünosorbent deneyi (Elisa)

ELISA, bağırsak içeriğindeki toksin tespiti için tatmin edici bir test olarak kabul edilir. (Pawaia S.R. et al., 2020) Bilhassa antikor ile ilişkili ELISA metotları; testlerde kullanılan hayvan sayısının azaltılması, referans yöntemin sonuçları ile uyum göstermesi, güvenli tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesi, hızlı ve kolay uygulanabilmesi açısından alternatif metotlar içinde öne sahiptir. (Arslan A., 2019) Ek olarak, klostridial toksinlerin tespiti için enzime bağlı immünosorbent tahlili (ELISA) kiti kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (Pcr) gibi DNA tabanlı teknikler, *C. perfringens* genotiplemesi için geliştirilmiştir ve laboratuvar hayvanlarında test etmeye güvenilir bir alternatif yöntemdir. (Erganiş O. ve diğerleri, 2011)

ELISA testinin diğer avantajları, *C. perfringens*'in tanısal testleri için laboratuvar hayvanlarının kullanılmasını önlemesidir. Ek olarak, prosedür, fare koruma testi ile karşılaştırıldığında, teşhis testinin hızlı bir şekilde belirlenmesi için faydalı görünmektedir.

ELISA, reaktiflerin stabilitesi, manipülasyon kolaylığı ve yüksek duyarlılık nedeniyle *C. perfringens*'in toksinotiplendirmesinde etkili bulunmuştur. ELISA, biraz uzmanlık ve özel ekipman gerektirmesine rağmen hassas ve kendine özgü olmasıyla bazı ELISA yöntemleri çapraz reaksiyon veren antikorlardan etkilenerek düşük seviyede antikorları tespit etmede yetersiz kalabilmektedir (Sesardic D. vd, 1992).

Özetle ELISA yöntemi, otomatize edilebilen, pratik ve çok sayıda örneğin aynı anda çalışılabileceği yöntemdir (Pelczar M. vd., 1986). Ancak bu yöntemler

toksini etkinliğini belirlenememektedir. Bunun için toksin nötralizasyon deneylerine ihtiyaç vardır. ELISA teknolojisi hassas ve nicel olup toksin nötralizasyon testi ile uyum sağlar ve bu nedenle farelerdeki zehirlenmeyi doğrulamanın en iyi yollarından biridir.

2.6.2.3. Lateks Aglutinasyon testi (lat)

Lateks aglutinasyon testi (Lat), enterotoksemiden öldüğünden şüphelenilen hayvanların bağırsak içeriklerinde toksin saptamak için kalitatif bir test olarak geliştirilmiştir. ELISA'nıkinden biraz daha az bulunan %96,5'lik bir duyarlılık ve %95,2'lik bir özgüllük göstermiştir. Başka bir çalışmada, enterotoksemiden şüphelenilen koyunların bağırsak içeriklerinde *C. perfringens* toksinlerinin saptanmasında ELISA'nın Lat'a göre önemli ölçüde daha duyarlı olduğu bulunmuştur. ELISA ve Lat, bağırsak içeriğinin sırasıyla %84,61 ve %58,46'sında toksin tespit etmiştir. Ancak, LAT'ın ELISA'ya göre bazı ek avantajları vardır. Nispeten basit, ucuz ve uygulanması hızlıdır ve bu nedenle enterotoksemi teşhisi için potansiyel bir saha testi olarak hizmet edebilir. (Pawaia S.R. et al., 2020)

2.6.2.4. Kütle -spektrometrisi- teknikleri

Yeni MS teknikleri artık bazı özel laboratuvarlarda farklı biyolojik ve biyolojik olmayan numunelerde toksin saptamak ve miktarını belirlemek için kullanılmaktadır. Buna sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi (LC-MS), ultra performans sıvı kromatografi tandem kütle spektrometrisi (UPLC-MS) ve tandem kütle spektrometrisi (MALDI-TOF) dahildir. (Pawaia S.R. et al., 2020)

3. AŞILAR

Aşı; belli bir hastalığa karşı bağışıklık sağlamak için, o hastalığın mikrobuyla hazırlanıp, kas, damar ya da ağız yoluyla vücuda verilen karışım olarak tanımlanır. Bir aşı tipik olarak, hastalığa neden olan bir mikroorganizmaya benzeyen ve genellikle mikrobun zayıflatılmış veya öldürülmüş şekillerinden, toksinlerinden veya yüzey proteinlerinden en az birinden yapılan bir ajan barındırır. Bu ajan vücudun bağışıklık sisteminde , ajanı bir tehdit olarak algılaması, yok etmesi ve o ajanla ilişkili gelecek zamanda karşılaşılabileceği herhangi bir mikrobu daha fazla tanınması ve yok etmesi için uyarıp harekete geçirmeyi amaçlar. Aşılar , doğal veya yabancı bir patojen tarafından gelecekteki bir enfeksiyonun etkilerini önlemek, yok etmek veya iyileştirmek için profilaktik etkiye veya kanser gibi süreç içinde oluşmuş bir hastalıkla savaşmak için tedavi edici olabilir. Bazı aşılar da enfeksiyonun tamamen önlendiği tam bağışıklık sunar.

Aşılar, monovalent (tek bileşenli) veya polyvalent (polivalan) (çok bileşenli) olarak da adlandırılır. Monovalent aşı tanımı, tek bir antijene veya tek bir mikroorganizmaya karşı bağışıklık kazandırmak için oluşturulan aşıdır. Polivalan bir aşı, aynı mikroorganizmanın iki ya da daha fazla suşuna veya iki ya da daha fazla mikroorganizmaya karşı bağışıklık oluştururlar.

Aşılar tipik olarak atenüe (canlı), inaktive veya ölü organizmalar veya bunlardan saflaştırılmış ürünleri barındırır. Günümüzde kullanımda olan birkaç çeşit aşı vardır. Bunlar, pozitif yönde bir bağışıklık oluşturma yeteneğini korurken hastalık riskini azaltıp minimuma indirmek için kullanılan değişik yolları temsil eder. Atenüe aşılar; canlı, fakat zayıflatılmış mikroorganizmalar içerir. Genel olarak bu aşıların çoğu, virülans özelliklerini saf dışı bırakan veya geniş bir bağışıklık elde etmek için oluşturulmuş aşılar fakat daha az tehlikeli olan mikroorganizmaları kullanan koşullar altında yetiştirilir ve canlı virüsler veya bakteriyel içerikli olmaları daha olasıdır. Atenüe aşıların bazı avantajları ve dezavantajları vardır. Zayıflatılmış veya atenüe aşılar genellikle daha dayanıklı immünolojik durumları oluşturur. Ancak bağışıklığı baskılanmış kişilerde kullanım açısından güvenli olmayabilirler ve nadir durumlarda hastalık yapıcı mutasyona uğrayarak hastalığa sebebiyet oluşturabilirler. İnaktive edilmiş aşılar, ölü aşılar

olarak da isimlendirilirler ve bu aşılar, fiziksel ya da kimyasal yöntemlerle antijenik karakterleri yüksek olan mikroorganizmaların inaktif aşı hale getirilmesi ile elde edilirler. İnaktif aşılar ekzojen antijenler olarak algılanıp antikorların önderliğinde bir immün yanıt oluşmasını sağlarlar. Vücutta üreyemezler ve hücre içine giremezler. Bu nedenle kısa süreli immün yanıt oluşturdıklarından daha fazla miktarda, belli sıklıkla ve aralıklarda tekrarlanarak uygulanırlar. Bu aşılar tüm *Clostridial* türler ile oluşturulabilir. Toksoid aşılar, atenüe mikroorganizma barındırmayan fakat hastalığa neden olan inaktive edilmiş toksik metabolitlerden yapılır. Toksoid bazlı aşı örnekleri olarak difteri ve tetanoz örnek gösterilebilir.

3.1. Veteriner Clostridial Aşılar

Clostridial hastalıklardan olan enterotoksemiye karşı korunmanın en iyi yolu aşılamaştır. Aşılar inaktif veya aktif ürünler olarak tanımlanmıştır. İnaktif aşılar; Formaldehit ile inaktive edilmiş mikroorganizma kültürü ile hazırlanan bakterin aşıları olarak tanımlanırlar. Aynı zamanda inaktif toksinler ile hazırlanan toksoid aşıları olabilirler veya bakteri kültüründen elde edilmiş mikroorganizmaya ait antijenik yapıyı içerebilir. Günümüzde tekli veya kombine halde, ticari olarak üretimi gerçekleştirilen çeşitli clostridial aşılar bulunur. Clostridial aşı üretiminde en önemli aşama, toksisitesi yüksek seviyede antijenin üretilmesidir.

Enterotoksemi aşıları gibi polyvalent aşıların potens testleri canlı deney hayvanları kullanılarak test edilir.

Bağışıklık açısından güçlü bir Clostridial aşı üretebilmenin ön koşullarından en önemlisi yüksek titrelerde toksin üretebilmeye dayanır. Toksin üretiminin ise kullanılan üretim suşunun genetik olarak toksin üretebilme yeteneğine sahip oluşuna, üretim sırasındaki durumun kompozisyonuna, pH' nın kontrolüne ve inkubasyon süresine bağlı olduğu gibi etmenler birçok literatürde bildirilmiştir. (Pawaia S.R., et all 2020)

Çoğu clostridial aşı, polivalan aşılardır. *C.septicum*, *C. haemolyticum*, *C. chauvoei* ve *C. novyi* diğer bakteriyel antijenler gibi birkaç başka clostridial antijen içerir. (Clifford J., 2015)

C. perfringens tip C enfeksiyonlarının önlenmesi, büyük ölçüde inaktive edilmiş bütün bakterilerle aşılama dayandır. Veteriner kullanımı için ticari olarak temin edilebilen *C. perfringens* tip C aşıları, toksinin artık tip C suşlarının toksoidi olarak anıldığı veya tip A, B veya D suşları ile kombinasyon halinde kimyasal olarak inaktive edilmiş kültürler içerir. Toksoidlerle aktif bağışıklamanın enfeksiyonları önlemede etkili olduğu kanıtlanmıştır. (Cussler K, et al., 1999) Etkisizleştirilmiş kültürler, antijenin detoksifikasyonuna rağmen tip C'nin ürettiği beta toksinine karşı bir antijenik yanıt üretir. Yabancı proteinlerinde üretimi ile birlikte saf veya karışık kültürlerin kullanılması, aşılamanın etkinliğinin oldukça değişken olduğu bir durum yaratmış ve rekombinant proteinler gibi daha tekrarlanabilir ve ölçülebilir antijenlere olan talebi artırmıştır. (Wilmes M.L., 2018)

Aşıların etkili olması için, konakçı hayvanda koruyucu bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarabilmeleri gerekir. Ticari olarak temin edilebilen *C. perfringens* tip C aşıları, klostridial toksinlere karşı nötralize edici antikorlar üretir. Nihai aşı gücü için mevcut gerekli test, farelerin ve tavşanların kullanımını içerir ve CFR USDA kılavuzlarında ve EP monografında zorunludur (Birleşik Devletler Tarım Bakanlığı, 2017a). USDA yönergelerine göre, in vivo test, hedef konak türlerine göre önerilen en büyük dozun yarısı veya daha azı ile deri altından uygulanan en az sekiz tavşan gerektirir. İlk uygulamadan 20-23 gün sonra ikinci bir enjeksiyon yapılır. Aşılamadan 14-17 gün sonra hayatta kalan tüm tavşanlardan kan alınır, serum toplanır ve serum, antitoksin seviyeleri için test edilir.

Antitoksin nötralize edici antikor seviyesi, bir antitoksin standardı kullanılarak bir seyreltme serisi yoluyla belirlenir. Nötralize edici antikor seviyeleri, *C. perfringens*'e beta toksin karşı değerlendirilir ve bir fare nötralizasyon testi kullanılarak in vivo tahmin edilir. Öngörülen standardı karşılamak için, aşılamanın mililitre tavşan serumu başına en az 10 IU standart beta antitoksin içermesi gerekir. Bu onaylanmış deneylerde hayvanların kullanılması, gerekli hayvan sayısını azaltan yeni deneyler geliştirme arzusuna yol açmıştır. In vitro tahlillerin geliştirilmesi, her yıl kullanılan hayvan sayısını büyük ölçüde azaltarak uygun maliyetli olacaktır.

Toksin doğrulaması için gerekli hayvan sayısını azaltmaya yönelik çabalar, farelerin kullanımının ortadan kaldırılmasına yol açmıştır; bununla birlikte, serum üretimi için hala tavşanlar gereklidir. Yalnızca in vitro testlerin kullanılması arzu edilirken, bu testler in vivo testlerle karşılaştırılabilir olmalı ve bugüne kadar yalnızca prensip kanıtı çalışmaları yapılmıştır ve bu testler USDA ve EP tarafından doğrulanmalı ve kabul edilmelidir. (Wilmes M.L., 2018) C. perfringens veteriner aşılarının kalite kontrolüne ilişkin gereksinimler Avrupa Farmakopesi'nin (Ph. Eur.) Monograf 363'te de açıklanmıştır. Açıklamada uygunlanması belirtilen yönergeler şu şekildedir, tavşanlar C. perfringens test aşısı ile iki kez aşılanır. Serum numuneleri toplanır ve C. perfringens L- ve O- toksine karşı nötralize edici antikorların seviyeleri, fare nötralizasyon testi (MNT) kullanılarak in vivo olarak tahmin edilir. Geçerli bir testte, farelerin yaklaşık %50'si toksin yüklemesinin bir sonucu olarak ölür. (Cussler K. et al., 1999) Özetle, toksoid üretmek emek gerektiren bir süreçtir, potens testi zaman alıcıdır ve hayvanların kullanılmasını gerektirir. Enterotoksemiye karşı yeni aşılar geliştirmek için çalışmalar yapılırken, potens testlerinde de iyileştirmelere ihtiyaç vardır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Gereç

Yapılan çalışmaların tümü Ata-Fen Veteriner Malzemeleri Hayvancılık Pazarlama Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi bünyesinde yapılmıştır.

4.1.1. Kullanılan bakteriler

Bu çalışma da enterotoksemiye neden olan *Clostridium perfringens* tip C suşu, Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsünden temin edilmiş olup, beta toksin üretiminde kullanılmıştır. Suşlar -80 °C %50 gliserollü ortamda derin dondurucuda muhafaza edilmektedir.

4.1.2. Kullanılan besiyerleri

4.1.2.1. A solüsyonu

Tablo 4.1 Besiyerinin A kısmı komponent miktarları.

Tryptone	7 g
Yeast Extract	5 g
Peptone	5 g
Starch	4 g
NaCl	4 g
Casamino acid	3 g

4.1.2.2. B solüsyonu

Tablo 4.2 Besiyerinin B kısmı komponent miktarları.

L-sistein HCl	1,4 g
Dekstroz	13 g
Distile su	1000 ml

A solüsyonu 121°C’de 20 dakika süre ile otoklavda steril edilir. B solüsyonu 0,22 mikron çapındaki filtre ile steril edilir.

4.1.3. Kullanılan boyalar

4.1.3.1. Gram boyama

Gram boyama, kùltùrlerden alınan örneklerden preparat hazırlanarak mikroskopik muayenelerinin yapılması için kullanılmıştır. Mikroskopik muayene ile saf olarak üretildiklerinin kontrolù yapılmış ve bakteri morfolojisi gözlenmiştir. Gram boyama solüsyonları aşağıdaki gibidir;

Kristal Viole: 1 g / 100 ml şeklinde hazırlanır. 1 g kristal viole 100 ml saf su içinde iyice çözdürölünceye kadar karıştırılır.

İodine: 2 g iodine ve 0,4 g sodyum hidroksit, 100 ml saf su içinde iyice çözdürölünceye kadar karıştırılır.

Ethanol: %70'lik veya saf etanol kullanılır.

Fuksin: 0,05 g / 100 ml şeklinde hazırlanır. 0,05 g fuksin 100 ml saf su içinde iyice çözdürölünceye kadar karıştırılır.

4.1.3.2. Bradford boyası

0,1 g Coomassie Blue G-250, %95 lik 50 ml etanol içerisine ilave edilir. Üzerine 100 ml %85 lik fosforik asit konulur ve 2-3 defa kaba filtre kağıdından süzme işlemi gerçekleştirilerek hazırlanan boya solüsyonu +4 C ye kaldırılır.

4.1.4. Kullanılan çözeltiler

4.1.4.1. %50 Gliserol çözeltisi

%50 Gliserol çözeltisi, çalışma kùltür stok suşlarının stoklanmasında kullanılır. Çözelti hacminin %50 oranına denk gelen hacimde gliserol, mezur veya pipet ile ölçölerek alınır. Gliserol üzerine saf su ilave edilerek istenen hacime tamamlanır. Çözelti, otoklavda, 121 °C'de 20 dakika süre ile steril edilir. (Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, 2014)

4.1.4.2. 7M NaOH çözeltisi

Sodyum hidroksit (NaOH), kültürün ph dengesini sağlamak için kullanılan baz çözeltisidir. Çözelti 1M için 1L 40 g tartılarak hazırlanır. 7M 1L için, 200 g NaOH tartılıp üzerine + 1L H₂O eklenir. Tartımı yapılan NaOH, içinde manyetik balık bulunan çözdürme kabı içerisinde saf su içinde çözdürülür. Tüm içerik çözdürüldükten sonra, çözelti içindeki manyetik balık alınır. Hazırlanan çözelti, otoklavda 121⁰C’de 15 dakika sterilize edilir. Çözelti daha büyük hacimde hazırlanacak ise molariteye uygun olacak şekilde tartım yapılır ve steril 0,2 mikron sıvı filtresinden geçirilerek steril hale getirilir.

4.1.4.3. 2,5 M H₂SO₄ çözeltisi

Sülfirik asit (H₂SO₄), kültürün ph dengesini sağlamak için kullanılan asit çözeltisidir. 1L için 139 mL H₂SO₄ (%95) + 816 mL H₂O kullanılarak çözelti hazırlanır. Hazırlanan sülfirik asit çözeltisini steril etmek için, çözeltinin alındığı şişenin ağzı pamuk ve alüminyum folyo ile kapatılır veya hacmine uygun ısıya dayanıklı cam şişelere konur ve otoklavda 121⁰C’de 20 dakika süre ile steril edilir.

4.1.4.4. %0,85 Fizyolojik tuzlu su (FTS)

Fizyolojik tuzlu su, dilüsyonların hazırlanmasında sulandırma sıvısı olarak kullanılmaktadır. 0,85 g NaCl 1000 ml su tartımı yapılan NaCl, içinde manyetik balık bulunan çözdürme kabı içerisinde bir miktar saf su içinde çözdürülür. Tüm içerik çözdürüldükten sonra, çözelti içindeki manyetik balık alınır.

4.1.4.5. Karbonat çözeltisi

0.21 gr NaHCO₃ 50 ml saf suda çözünür, hazırlanan çözelti ph 9.6’ya ayarlanmıştır. Çözelti 0,05 M olarak hazırlanmıştır. Bu solüsyon antijen kaplama solüsyonu olarak kullanılmıştır. +4⁰C’ de 7 gün süreyle saklanabilir. (Ph. Eur., 10.0, 2017)

4.1.4.6. Phosphate buffered saline (PBS) solüsyonu

16.7 gr NaCl, 0.44 gr KCl, 2.27 gr Na₂HPO₄, 0.408 gr KH₂PO₄ kimyasalları tartılarak 1000 ml saf suda çözündürülür. PH'ı 7,0-7,4 arasında olması beklenir. Dilüsyon solüsyonu, 500 ml PBS çözeltilisine %0.05'lik Tween 20 eklenmiştir. Solüsyon taze olarak hazırlanmalıdır. (Ph. Eur., 10.0, 2017)

4.1.4.7. Plate yıkama solüsyonu

500 ml olarak hazırlanan %0,85 FTS çözeltilisine %0.05'lik Tween 20 eklenir. Hazırlanan çözeltilinin pH'ı 7,0-7,4 arasında olmalıdır. (Ph. Eur., 10.0, 2017)

4.1.4.8. Anti rabbit IgG konjugat

Konjugat olarak Sigma Anti Rabbit IgG kullanılmıştır. 1/1000 olarak hazırlanmış olan ara stok konjugattan 0,5 ml alınarak 14,5 ml dilüsyon solüsyonu ile homojen şekilde karıştırılarak 1/30.000 çalışma konjugat stoğu hazırlanmıştır. (Sigma Aldrich, A0545, Anti Rabbit IgG Product Specification)

4.1.4.9. Substrate solüsyonu

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) sıvı halde satın alınan TMB substratı, kromojenik bir substrattır. Konjugat ile reaksiyona girmeden önce, substrat renksiz veya açık mavimsi-yeşil bir çözeltilidir. Substrat sistemi, peroksidaz ile reaksiyona girdiğinde mavi bir reaksiyon ürün oluşturur. Spektrometrede 450 nm'de ölçüm yapılmaya uygundur. (Sigma Aldrich, 860336, Product Specification)

4.1.4.10. Stop solüsyonu

Hazır olarak temin edilen durdurma solüsyonu kullanılmıştır. (Sigma Aldrich, S5814, Stop Solution Product Specification) Oda sıcaklığında saklamaya uygundur. Ürün toz halde bulunmaktadır. 100 ml distile su ekleyip 5 dakika manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak çözündürülerek kullanıma alınmıştır. Bu solüsyon, TMB substratının aktivitesini durdurmak için kullanılır. Stop solüsyonu kromojenik özelliğinden dolayı substrat kuyucuğuna eklendiğinde kuyucuktaki

rengi maviden sarıya değiştirmek için kullanılmıştır. Maksimum bir saat sonra 450 nm'de okutulabilir.

4.2. Yöntem

4.2.1. Protein tayin yöntemi (Bradford yöntemi)

Protein çözömleme veya protein assay, bir çözeltideki çözönmüş halde bulunan proteinin konsantrasyonunu ölçmek için kullanılan analitik spektroskopik bir metottur. Öznel bir yöntem olarak bilinir, yani örneğin ölçölen protein miktarı amino asidin bileşimine bağımlıdır.

4.2.1.1. Standart grafiğin hazırlanması

Çalışmada, Tablo 4.3'de göröldüğü gibi standart protein olarak miktarı bilinen BSA (Bovin Serum Albumin) kullanılarak seyreltmeler yapılır ve doğrusal bir standart grafiği oluşturulur. (Quick Start™ Bradford Protein Assay User Guide Instruction Manual)

Tablo 4.3 Bradford Yöntemi için oluşturulan grafikteki BSA seyreltmeleri.

Standart Örnekleri	Dilüsyon sıvısı FTS (µl)	BSA (µl)	BSA Konsantrasyonu (µg/ml)
A	0	300 (stoktan)	2000
B	125	375 (stoktan)	1500
C	325	325 (stoktan)	1000
D	175	175 (B dilüsyonundan)	750
E	325	325 (C dilüsyonundan)	500
F	325	325 (E dilüsyonundan)	250
G	325	325 (F dilüsyonundan)	125
H	400	0	Blank

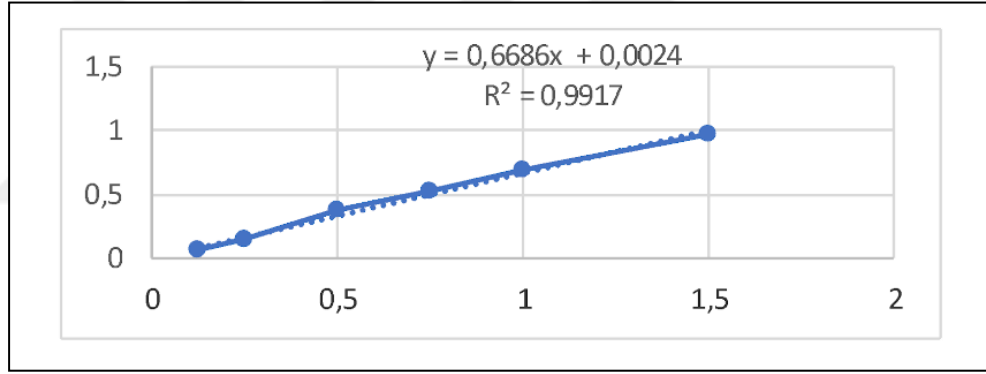
4.2.1.2. Bradford boya solüsyonu ile standart grafik oluşturma

Boya solüsyonu için 0,1 g Coomassie Blue G-250, %95 lik 50 ml etanol içerisine ilave edilir. Üzerine 100 ml %85 lik fosforik asit konulur ve 2-3 defa kaba filtre kağıdından süzme işlemi gerçekteştirilerek hazırlanan boya solüsyonu +4°C ye kaldırılır. Her bir standart örneği için 50 µl standart örneği + 2500 µl Reagent

kariştırılarak 10 dk oda ısısında inkübe edilir. Spektrofotometre ile blank (50 µl dilüsyon sıvısı + 2500 µl reagent) e karşı 595 nm deki absorbans değerleri ölçülür, Tablo 4.4'deki absorbans değerleri baz alınarak şekil 4.1'deki standart grafik oluşturulmuştur.

Tablo 4.4 595 nm'de standart solüsyonlara karşı okunan OD değerleri.

Protein mg /ml	Absorbans (595 nm)
0,125	0,06
0,25	0,146
0,5	0,369
0,75	0,53
1	0,697
1,5	0,97



şekil 4.1 Boya solüsyonu ile oluşturulan örnek standart grafik.

Ölçüm yapılırken oluşturulan standart grafiğindeki denklem hesaplamada kullanılır ve üretim örneklerinin total protein miktarları belirlenir. BSA (Bovin Serum Albumin) standartları (25/ 125/250/500/750/1000 µg/ml) kullanılarak oluşturulan standart grafikte R^2 değeri > 0,98 olmalıdır. Standart grafik, minimum 25 µg/ml maksimum 1000 µg/ml protein miktarları ve bunlara karşılık gelen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanmalıdır. Elde edilen absorbanslarla oluşturulan standart grafik ve denklemini kullanılarak örneklerin protein konsantrasyonları hesaplanır. BSA (Bovin Serum Albumin) standartları (125/250/500/750/1000 µg/ml) kullanılarak oluşturulan standart grafiklere ait

veriler kaydedilir. Standart grafik, hazırlanan her boya solüsyonunda yeniden oluşturulmalıdır.

Falkon tüplerine 50 µl örnek + 2500 µl boya solüsyonu eklenerek vortekslenerek homojenizasyon sağlanır ve karışım 10 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Blank için 50 µl dilüsyon sıvısı (FTS) + 2500 µl boya solüsyonu 10 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Daha sonra blanke karşı tüm örneklerin spektrofotometre ile 595 nm deki absorbans değerleri belirlenmiştir. Alınan absorbanslar ilgili grafikteki denklemde yerine konulmakta ve ürünlerdeki total protein miktarı mg/ml cinsinden hesaplanmıştır. Alınan absorbanslar, güncel tarihli, standart denklemde yerine konularak ürünlerdeki total protein miktarı µg/ml cinsinden hesaplanmıştır. Örnekler için absorbansın 1,0 üzerinde tespit edilmesi durumunda gerekli ek seyreltmeler yapılarak uygulama bilgilerine göre çalışma tekrarlanmalıdır.

4.2.2. Suşların büyütülmesi ve saklanması

Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’ de bileşenleri verilen etli besiyeri, suşları çoğaltmak için kullanılmıştır. Besiyeri 5L’lik cam şişelere 2L olacak şekilde dağıtılıp, pH 7,2’ye ayarlanarak, 121°C’de 20 dakika süre ile steril edilmiştir. Uygulamada, dekstroz ve L-sisteine ayrı olarak filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve inokulasyon öncesi ortama ilave edilmiştir. Daha sonra çalışma suşu, 2L’lik besiyerine %0,1 oranında inokule edilerek, anaerobik koşullarda, 24 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Süreç sonunda kültürlerden, %50 gliserol ile stok suşlar hazırlanmış ve çalışma süresi boyunca -80°C’ de muhafaza edilmiştir. (Ph. Eur. 1986)

4.2.3. Kullanılan besiyeri bileşenleri ve hazırlanışı

4.2.3.1. Çalışma kültürü-1

Etili besiyeri için küçük parçalara ayrılmış 1000 g yağsız sığır eti kullanılır. 1000 g sığır eti 2L saf su içinde 20 dakika kaynatılır. Kaynayan etin suyu, filtre kağıdından süzülerek temiz bir şişe içinde toplanır. Tablo 4.1’de verilen besiyeri komponentleri, 2L ’ye oranlanarak tartılır. Tartılan komponentler et suyu içinde

çözülünceye kadar karıştırılır. Sıvı miktarı kaynama esnasında azaldığından tekrar 2L' ye tamamlanır. Sürekli karışan besiyeri çözeltisinin içine pH probu daldırılır, pH 7,2'den düşük ise 7M sodyum hidroksit, 7,2'den büyük ise 2,5M sülfürik asit çözeltisi yavaşça eklenerek pH 'ı ayarlanır. Otoklav edilebilen cam şişeye konur. Üzerine, besiyeri ilave edilip, otoklavda 121°C'de 20 dk süre ile steril edilir. Sterilizasyon sonrası besiyeri oda sıcaklığında soğumaya bırakılır. İnokulasyon yapılmadan önce, besiyerinin ikinci kısımları (B kısım) olan dekstroz ve L-sistein saf suda çözündürülür. Çözdürülen dekstroz ve L-sistein 0,2 µm por çaplı filtreden süzülerek steril edilir ve aseptik koşullarda besiyerine ilave edilir. Kullanılacak olan 2L ÇK-1 besiyeri içeren şişeye, filtre edilmiş dekstroz ve L-sistein taze olarak eklenir. Otoklavdan çıkan diğer şişeler sonraki denemelerde kullanmak üzere +4°C'de saklanabilir.

4.2.3.2. Çalışma kültürü-2 ve üretim besiyeri

Besiyeri için Tablo 4.1 ve 4.2'de verilen besiyeri komponentleri, L-sistein ve dekstroz dışındaki komponentler 100L e oranlanarak tartılır, saf su içinde karıştırılıp homojenize edilir. Homojenize edilen besiyeri, biyoreaktörün olduğu alana getirilir. Biyoreaktörde besiyeri eklenmeden önce, pH probu kalibrasyonu yapılır. PH probu, besiyerinin pH'ını ölçen ve üretim sırasında kültürün belli bir pH değerinde kalmasını sağlayan bir çeşit ölçüm cihazıdır. Prob kalibrasyonundan sonra besiyeri peristaltik pompa yardımıyla biyoreaktöre aktarılır. Biyoreaktöre 3 yollu port takılır ve diğer tüm girişleri körlenerek kapatılır. Biyoreaktörün ceketinde su olup olmadığı kontrol edilir, gerekli ise cekete su alınarak biyoreaktör ceketi doldurulur. Biyoreaktör içindeki besiyeri 121°C de 25 dakika süre ile steril edilir. Sterilizasyon bitiminde besiyeri sıcaklığı 37°C setlenir. İnokulasyon yapılmadan önce, besiyerinin ikinci kısımları (B kısım) olan dekstroz ve L-sistein saf suda çözündürülür. Çözdürülen dekstroz ve L-sistein 0,2 mikron filtreden süzülerek aseptik koşullarda besiyerine ilave edilir.

Üretim besiyeri hazırlanması için bakteriyel üretim yapılan üretim tankları kullanılır. İstenilen hacimdeki M1-1 besiyeri için, Tablo 4.1 de' verilen besiyeri komponentleri, L-sistein ve dekstroz dışındaki komponentler, minimum 500L maksimum 2000L e oranlanarak tartılır, saf su içinde karıştırılıp homojenize edilir.

Üretim tankına ait pH probu, biyoreaktörde olduğu gibi kalibre edilir ve tanka takılır. Besiyeri peristaltik pompa yardımıyla gönderilir. Besiyeri ilavesi sonrası istenilen hacim saf su ile tamamlanır ve üretim tankındaki besiyeri, 121°C'de, üretim tankının kalifikasyon testlerinden biri olan sterilizasyon testi sonucuna göre belirlenen sürede steril edilir. Sterilizasyon sonrası cekte şebeke suyu gönderilerek besiyeri soğutulur ve sıcaklık 37°C ayarlanır. İnokulasyon yapılmadan önce, besiyerinin ikinci kısımları olan ve Tablo 4.2'de belirtilen dekstroz ve L-sistein saf suda çözülür. Çözdürülen dekstroz ve L-sistein 0,2 mikron filtreden süzülerek aseptik koşullarda besiyerine ilave edilir. (Ph. Eur. 1986)

B kısmı sterilizasyon sırasında sıcaklık ile bozulabilecek komponentleri içerir ve besiyeri ortamına sterilizasyondan sonra eklenmiştir. Bir kap içerisine dekstroz ve L-sistein hassas bir şekilde tartılır. Tartılan bileşenler kaba bir miktar saf su alınarak çözdürülmüş ve vitamin ile karıştırılmıştır. Dekstroz, L-sistein ve vitamin çözeltisinden oluşan besiyerinin ikinci kısmı, 0,2 mikron filtreden süzülerek steril edilmiş ve aseptik koşullarda, biyoreaktör içinde bulunan veya üretim tankı içerisinde bulunan steril besiyeri üzerine inokulasyondan hemen önce ilave edilmiştir.

4.2.4. Fermentasyon süreci

C. perfringens tip C suşu, içerikleri Tablo 4.1 ve 4.2'de verilen besiyerinde kültür üretimi yapılmıştır.

Suşun, ilk olarak küçük parça et içeren besiyerinde ön kültürü yapılmış, anaerobik jarda 37°C' de saat inkübe edildikten sonra, M1-1 ortamına %2 oranında pasajı yapılarak alt kültürü yapılmıştır. Alt kültür, 37°C'de, fermentör sistemine bağlı olan prob ile pH kontrol edilmiştir ve pH 7.2 de olacak şekilde kontrollü modda inkübasyona bırakılmıştır. PH ayarı için 7M NaOH ile 2,5M H₂SO₄ kullanılmıştır. Alt kültür 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, alt kültür, %4 inokulasyon oranında, üretim tankında hazırlanan kültür ortamına inokule edilmiştir. Kültür, 37°C'de, ph 7.2'de kontrollü modda inkübasyona bırakılmıştır. PH ayarı için 7M NaOH ile 2,5M H²SO⁴ kullanılmıştır. PH durumu, üretim tankının prob sistemine bağlı prob ile takip edilmiştir. PH takibi için

başlangıçta pH 4 ve 7 noktalarına kalibre edilmiştir. Böylece pH'ın doğru ölçüm yapması sağlanmıştır. *C. perfringens* tip C üremesi için gerekli anaerobik koşul, alt kültürde fermentöre bağlı azot tüpü ile sağlanmıştır. Kültür ortamındaki oksijen oranı fermentör sistemine bağlı oksijen probu ile takip edilmiştir. Bunun için de yine pH ölçümünde olduğu gibi başlangıçta oksijen probu kalibrasyonu yapılmıştır. İnokulasyon öncesi ortamdaki oksijen oranı azot ile sıfırlanmıştır.

Üretim tankına bağlı bilgisayar sisteminden pH veya baz tüketim takibi yapılarak, üremenin sonlandığı noktada üretim kültüründen örnek alınmıştır. Alınan örnekten OD ölçümü, toksin titrasyon testi ve gram boyama işlemi uygulanarak, mikroskopik muayenesi yapılmıştır. Mikroskopik incelemede bakteriler “gram pozitif basil” olarak gözlemlenmiştir. Üremesi tamamlanan kültür inaktivasyon işlemine alınmıştır. %37'lik formaldehit, kültür hacminin %0,8 oranında steril mezür ile ölçülerek, aseptik koşullarda üretim kültürüne ilave edilmiştir. Formaldehit eklenen üretim kültürü tank karıştırıcısı hızlandırılarak karıştırılmıştır. Üretim kültüründe yer alan inokulasyon port takımı kapalı konuma alınıp, üretim tankının hava giriş filtresi ve egzoz çıkış filtresi sonrasındaki vanalar kapatılmıştır. Kültür bu şekilde 37°C'de inaktivasyona alınmıştır. Toplam inaktivasyon süresi tamamlanana kadar 37°C'de karıştırmalı olarak inaktivasyonuna devam edilmiştir. Süre sonunda inaktivasyon testi için Tryptic Soy Broth ve Tiyoglukolat Broth besiyerine ekimler yapılmıştır ve anaerobik ve aerobik ortamda üreme olmadığı görüldükten sonra, inaktif kültür çalışma için +4°C de muhafaza edilmiştir. Elde edilen inaktif kültür polyvalent aşıda kullanılmak üzere konsantrasyon işlemine alınmıştır.

4.2.5. Filtrasyon & konsantrasyon

Üretim kültürü, ilk olarak 0,2 µm membran filtre kullanılarak fazla besiyerinden ve istenmeyen metabolitlerden uzaklaştırılmıştır. Ardından 10 kDa membran filtre kullanılarak üretim hacminin 20 katı kadar konsantre edilmiştir. Konsantrasyon sistemi cross-flow sistemi ile yapılmıştır. Beta toksin boyutunun 32-34 kDa olmasından dolayı 10 kDa boyutunda filtre kullanılarak toksinlerin filtreden geçişi engellenmiştir. Filtreden süzülerek atılan sıvı ile filtreden süzülerek toplama kabına geri dönen sıvıdan Bradford yöntemi kullanılarak protein analizi

yapılmıştır. Filtreden süzilemeyip geri dönen sıvı (toksoid) istenilen hacme gelince sistem durdurulur ve formulasyonda kullanılmak üzere steril şartlarda +4'e kaldırılır.

4.2.6. Formülasyon

Polivalan bir aşının oluşması için birden fazla komponent gerektiğinden enterotoksemi aşısı etkenlerine ek olarak farklı *Clostridium* çeşitlerini de kapsayacak şekilde formüle edilen aşı için adjuvant hazırlığı yapılmıştır. Adjuvant belirli oranlarda alüminyum potasyum sülfat ve sodyum hidroksit karıştırılmıştır. 121°C de 25 dakika süre ile steril edilmiştir. Karıştır halde olan oda sıcaklığındaki adjuvanta *Clostridium perfringens tip B, tip C ve tip D* konsantre ürünlerinden belirli oranlarda eklenmiştir ve aşı pH'ı ayarlanmıştır. Formüle edilen aşı inkübasyona bırakılmıştır. Aşı sıcaklığı oda sıcaklığındadır.

4.2.7. Toksin etkinliği için çalışma serumunun eldesi

Beta toksin etkinliği için çalışılacak Elisa testi için kullanılacak tavşan serumları için, formüle edilen aşı 3-6 aylık sağlıklı tavşanlara kas içi veya deri altı yol ile etiketinde bildirilen minimum doz olan 1 ml miktarında enjekte edilmiştir. Uygulama tarihinden 21 gün sonra, tavşanlara 1 ml miktarında ikinci doz aşı uygulanmıştır. İkinci doz aşı uygulama tarihinden 14 gün sonra, tavşanların kan örnekleri alınarak, serumları eşit hacimde birleştirilmiştir.

4.2.7.1. Toksin nötralizasyon testi

Toksin Nötralizasyon Testi, aşı ile immunize edilen tavşan serumlarında ve kombine antiserumda *Clostridium perfringens Tip B, C, D*'nin de içinde bulunduğu birçok *Clostridium* türlerine karşı oluşan bağışıklık seviyesini tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Test için, 3-6 aylık yaşta, sağlıklı 10 adet tavşan 21 gün arayla aşının etiketinde önerilen minimum doz miktarındaki aşı ile aşılanır ve hayvanlardan 14 gün sonra kan alınır. Daha sonra serumları ayrılarak serum havuzu oluşturulur. Serum havuzuna ait kalite kontrol testi standart toksin ve standart antitoksinler yardımıyla yapılır.

Standart toksin sulandırması için L+1 için sulandırılır. ‘L+1’ ifadesi Lethal dozun bir üst dilüsyonunu ifade eder. Sulandırma sıvısı olan %0,85’lik Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) ile öncelikle toksinin 1/10 dilüsyon hazırlanır ve daha sonra toksinin ‘L+1’ dilüsyon değerine göre sulandırmalar yapılır. ‘L+1’ değerine göre sulandırılan clostridial toksinler, Tablo 4.5’de belirtildiği şekilde hayvanlara enjekte edilir ve gözlenir.

Tablo 4.5 Standart toksinin deney hayvanları uygulaması.

Komponent	Kullanılan Hayvan Türü ve Hayvan Sayısı	Enjeksiyon Miktarı ve Enjeksiyon Yolu	Gözlem Süresi
Clostridium perfringens Tip C Beta Toksin	En az 2 adet fare	0.1 ml; I.V yolla	3 gün

Standart antitoksinin sulandırılması için International Unite (IU)’si aranacak olan toksinin IU’sine dilue edilir. Standart Toksin + Standart Antitoksin için 10 IU/ml’ye göre dilüsyonları yapılan standart toksin ve standart antitoksinlerden eşit miktarlarda alınarak karışımları yapılır. Tablo 4.6’da belirtildiği şekilde inkübe edilir ve inkübasyon süresi sonunda deney hayvanları uygulamaları gerçekleştirilir.

Tablo 4.6 Standart Toksin+Standart Antitoksin İnkübasyon ve Deney Hayvanları Uygulamaları.

Komponent	İnkübasyon Koşulları ve İnkübasyon Süresi	Kullanılan Hayvan Türü ve Sayısı	Enjeksiyon miktarı ve Enjeksiyon yolu	Gözlem süresi
Clostridium perfringens Tip C Beta Toksin	Oda sıcaklığında 30 dakika	En az 3 adet fare	0.2 ml; I.V yolla	3 gün

Standart toksin + immunize tavşan serumu sulandırmalarında ‘L+1’ standart toksin sulandırmaları 10 IU’e denk gelir. Aranacak olan IU seviyesine göre immunize tavşan serumu miktarı ayarlanır. Tüpe öncelikle standart toksin daha

sonra immunize tavşan serumu ilave edilmelidir. Karışımlar köpürtülmeden çalkalanmalıdır.

10 IU'e göre sulandırılmaları yapılan standart toksin ve antitoksinlerden eşit miktarda alınarak karışımları yapılır.

Nötralizasyon için, oda sıcaklığında *Clostridium perfringens* Tip C Beta toksin 15 dakika bekletilir.

Deney hayvanlarına uygulama aşamasında tüm komponentler için, inkubasyon süresi sonunda, en az 3 adet fareye aranan IU değerine göre talep edilen miktarlarda *C. perfringens* Tip C beta toksinleri, I.M yolla enjekte edilir. Enjeksiyonu yapılan tüm fareler, ölüm meydana gelip gelmemesi yönünden 3 gün süreyle gözlenir.

Testin geçerli olabilmesi için standart toksin enjekte edilmiş olan farelerin 3 gün gözlem süresince ölmesi gereklidir. Standart toksin + Standart Antitoksin karışımı verilen fareler ise hayatta kalmalıdır. Standart Toksin + İmmunize tavşan serumu enjekte edilen fareler hayatta ise, final ürün aranan IU değerini karşılıyor demektir. Aranan IU değeri için farelerin hayatta kalması beklenir.

4.2.8. İnaktif *C. perfringens* tip C antijeninin elisa yöntemi için hazırlanması

Clostridium perfringens tip C inaktif kültür antijeninin ilk olarak Bradford yöntemi ile total proteini ölçülmüştür. Ölçüm yapılırken falkon tüplerine 50 µl örnek + 2500 µl boya solüsyonu eklenip vortekslenerek homojenizasyon sağlanmıştır. Karışım 10 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Blank için 50 µl dilüsyon sıvısı (FTS) + 2500 µl boya solüsyonu 10 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Daha sonra blanke karşı tüm örneklerin spektrofotometre ile 595 nm deki absorbans değerleri belirlenmiştir. Alınan absorbans oluşturulan grafik denkleminde yerine konularak üründeki total protein miktarı mg/ml cinsinden hesaplanmıştır. Sonikasyon süresi olarak cihaz 30 saniye çalışıp 15 saniye dinlenme olacak şekilde 3 çalışma seti olarak tekrarlanmıştır. İşlem sonunda OD ve Bradford

ile total protein bakılmıştır. Bu işlem kaplama sonikasyon sonrası antijen konsantrasyonu 4 µg/ml olasıya kadar devam etmiştir.

4.2.9. Beta antitoksin elisa yöntemi ile testlerin uygulanması

4.2.9.1. Plate dizaynı

Her çalışma için öncelikli olarak yapılan işlem plate üzerinde yapılacak seyreltmeleri belirten bir dizaynı oluşturmak olmuştur. Plate üzerinde referans serum ve seyreltmeleri, çalışılacak aşının tavşanlardan alınan serum havuzu ve seyreltmeleri ve konjugat bilgileri yer alacak şekilde bir plan hazırlanmıştır.

4.2.9.2. Çalışma 1

Çalışmaya başlarken yapılacak ilk iş plate dizaynının oluşturulmasıdır. Tablo 4.7’de olduğu gibi plate üzerinde referans serum ve seyreltmeleri, çalışılacak aşının tavşanlardan alınan serum havuzu ve seyreltmeleri ve konjugat bilgileri yer alacak şekilde bir plan hazırlanmıştır.

Tablo 4.7 Çalışma 1 için plate dizaynı. (U.Y: Uygulama Yok, R.S: Referans Serum, P.A.S: Polyvalent aşı serumu, N.S: Negatif Serum, A.K: Antijen Kontrol)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	SERUM	U.Y	R.S 1/100 10 IU	R.S 1/250 4 IU	R.S 1/500 2 IU	R.S 1/1000 1 IU	U.Y	U.Y	U.Y	U.Y	P.A.S 1/100 + Boş Ant.	P.A.S 1/100 + Boş Ant.	Anti- Rabbit IgG 1/30.000
B	Saf Antijen	P.A.S 1/10	P.A.S 1/100	P.A.S 1/250	P.A.S 1/500	P.A.S 1/1000	N.S 1/100	N.S 1/500	A.K	A.K	Konjugat + Substrat	Konjugat + Substrat	
C		R.S 1/10 SAF 100 IU	R.S 1/100 10 IU	R.S 1/250 4 IU	R.S 1/500 2 IU	R.S 1/1000 1 IU							
D		P.A.S 1/10	P.A.S 1/100	P.A.S 1/250	P.A.S 1/500	P.A.S 1/1000	N.S 1/100	N.S 1/500	A.K	A.K	Konjugat + Substrat	Konjugat + Substrat	Anti- Rabbit IgG 1/60.000
E		R.S 1/10 SAF 100 IU	R.S 1/100 10 IU	R.S 1/250 4 IU	R.S 1/500 2 IU	R.S 1/1000 1 IU							Anti Rabbit IgG 1/100.00 0
F		P.A.S 1/10	P.A.S 1/100	P.A.S 1/250	P.A.S 1/500	P.A.S 1/1000	N.S 1/100	N.S 1/500	A.K	A.K	Konjugat + Substrat	Konjugat + Substrat	

Uygulama için, *Clostridium perfringens* Tip C sonike edilmiş inaktif kültür, bulk antijeni, saf olarak, taze hazırlanmış kaplama solüsyonu (sodyum bikarbonat solüsyonu) ile belirlenen kuyucuklara 100’er µl ilave edilerek kaplanmış ve yaklaşık 15 saat +4 derecede inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda yıkama solüsyonu (FTS+Tween-20) ile 4 defa yıkamanın ardından serumlar

(referans serum ve polyvalent aşı serumu) plate'de belirlenen dilüsyonlarda (Saf, 1/10, 1/100 ve 1/250) hazırlanarak belirlenen kuyucuklara 100 er µl koyulmuş ve 1 saat 22°C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tekrar yıkama solüsyonu (FTS+Tween-20) ile 4 defa yıkamanın ardından Anti-Rabbit IgG Konjugatı 1/30.000 kat sulandırılarak her kuyucuğa 100 er µl koyulmuş 1 saat 22°C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tekrar yıkama solüsyonu (FTS+Tween-20) ile 4 defa yıkamanın ardından 50 µl TMB substratı kuyucuklara koyularak 10 dk karanlıkta bekletilmiş ve renklenme gözlemlenmiştir. 10 dakikanın sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla 50 ul stop solüsyon ilave edilmiş ve 450 nm de absorbanslar okutulmuştur.

4.2.9.3. Çalışma 2

Çalışmaya başlarken yapılacak ilk iş plate dizaynının oluşturulmasıdır. Tablo 4.8'de olduğu gibi plate üzerinde referans serum ve seyreltmeleri, çalışılacak aşının tavşanlardan alınan serum havuzu ve seyreltmeleri ve konjugat bilgileri yer alacak şekilde bir plan hazırlanmıştır.

Tablo 4.8 Çalışma 2 için plate dizaynı.

	1	2	3	4	5	6	7
A	Saf Antijen	Referans serum- saf	Referans serum 1/10	Referans serum 1/100	Referans serum 1/250		
B	Saf Antijen	Polyvalent aşı serumu saf	Polyvalent aşı serumu 1/10	Polyvalent aşı serumu 1/100	Polyvalent aşı serumu 1/250	Negatif 1/10	Negatif 1/100
C							
D	1/10 Antijen	Referans serum saf	Referans serum 1/10	Referans serum 1/100	Referans serum 1/250		
E	1/10 Antijen	Polyvalent aşı serumu saf	Polyvalent aşı serumu 1/10	Polyvalent aşı serumu 1/100	Polyvalent aşı serumu 1/250	Negatif 1/10	Negatif 1/100

Uygulama için, *Clostridium perfringens* Tip C sonike edilmiş inaktif kültür, bulk antijeni, saf olarak, taze hazırlanmış kaplama solüsyonu (sodyum bikarbonat solüsyonu) ile belirlenen kuyucuklara 100'er µl ilave edilerek kaplanmış ve

yaklaşık 15 saat +4 derecede inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda yıkama solüsyonu (FTS+Tween-20) ile 4 defa yıkamanın ardından serumlar (referans serum ve polyvalent aşı serumu) belirlenen dilüsyonlarda (Saf, 1/10, 1/100 ve 1/250) hazırlanarak belirlenen kuyucuklara 100 er µl koyulmuş ve 1 saat 22°C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tekrar yıkama solüsyonu (FTS+Tween-20) ile 4 defa yıkamanın ardından Anti-Rabbit IgG Konjugatı 1/30.000 kat sulandırılarak her kuyucuğa 100 er µl koyulmuş 1 saat 22°C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tekrar yıkama solüsyonu (FTS+Tween-20) ile 4 defa yıkamanın ardından 100 µl TMB substratı kuyucuklara koyularak 10 dk karanlıkta bekletilmiş ve renklenme gözlemlenmiştir. 10 dakikanın sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla 100 ul Stop solüsyon ilave edilmiş ve 450nm de absorbanslar okutulmuştur.

5. BULGULAR

5.1. Fermentasyon Süreci Sonunda Gözlemlenen Bulgular

Beta toksini üretimi, ön kültür üremesi 8 saatte, alt kültür üretimi yaklaşık 18 saatte ve istenilen toksin üretiminin gerçekleştiği üretim kültüründe yaklaşık 5 saatte tamamlamıştır. Üretim kültüründeki *C. perfringens* tip C, üremenin gerçekleştiği log fazına üretim besiyerine pasajından 2 saat sonra geçmiş, 1,5 saat bu evrede kalmış ve daha sonra durağan faza geçmiştir. Bu evreye geçtikten sonra inaktivasyon işlemi başlatılmıştır.

İnaktivasyon süresi tamamlanan kültürden steril şartlarda örnek alınmış ve inaktivasyon testi yapılmıştır. İnaktivasyon testinde, canlılık kontrolü testi edilmiştir. Bakterilerin inaktive edildiğini göstermek amacıyla yapılmıştır. İnaktivasyon testi için bakterinin üretildiği besiyeri kullanılmıştır.

İnaktivasyon işlemi sonrası filtrasyon ve konsantrasyon işlemlerine alınan inaktif *C. perfringens* tip C kültürü, alt takım işlemleri tamamlandıktan sonra, işlemler sırasında oluşabilecek aksi bir durum için sterilite testi yapılmış ve herhangi bir üreme görülmemiştir. Bu sonuçlar ile prototip aşı formulasyonu için konsantre ürünün uygun olduğu görülmüştür.

5.2. İnaktif Kültürde Total Protein Ölçümü

İnaktif *C. perfringens* tip C kültürünün Bradford ile total proteini 1,02 ug/ml olarak ölçülmüştür. İnaktif kültüre sonikasyon işlemi uygulanarak Bradford ile ölçülen total proteini 4 ug/ml olduğunda işlem sonlandırılmış, farmakopede yer alan protein yoğunluğuna uygun hale getirilmiştir. İnaktif kültür bu haliyle ELISA test çalışmasına uygun hale getirilmiş ve sonike edilen hacim çalışma süresi boyunca +4°C de saklanmıştır. İnaktif kültürün sonikasyon öncesi ve sonikasyon sonrası renklenmesi aşağıdaki gibidir;



Şekil 5.1 Sonikasyon öncesi Cpc inaktif kültürü.



Şekil 5.2 Sonikasyon sonrası Cpc inaktif kültürü.

5.3. Serum Eldesi İçin Deney Hayvanları Uygulamaları

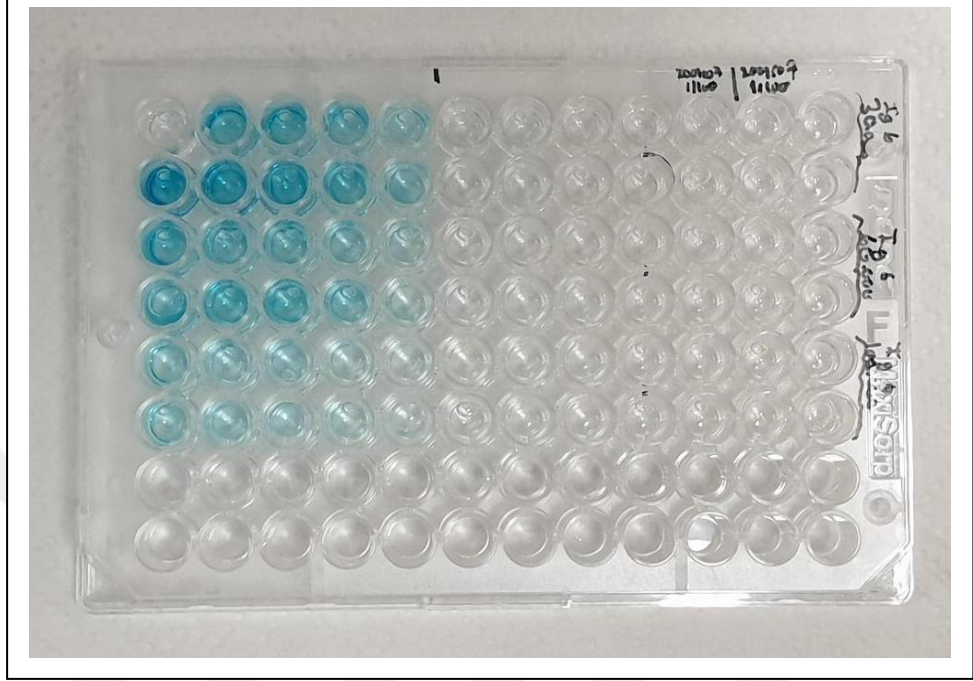
Polyvalent aşı formülasyonu, belirlenen hacimlerde *Clostridium perfringens* B, C, D, C. *haemolyticum*, C. *chauvoei*, C. *sordelli*, C. *novyii* A toksoidleri ile tamamlanmış olup Beta antitoksin ELISA çalışması için belirlenen özellikteki tavşanlara uygulanmıştır. Farmakopede belirtildiği gibi tavşanlara kas içi veya deri altı yol ile etiketinde bildirilen minimum doz olan 1 ml miktarında enjekte edilmiştir. Uygulama tarihinden 21 gün sonra, tavşanlara 1 ml miktarında ikinci doz aşı uygulanmıştır. İkinci doz aşı uygulama tarihinden 14 gün sonra, tavşanların kan örnekleri alınarak, serumları eşit hacimde birleştirilmiştir. Bu serum havuzları Beta antitoksin ELISA için kullanılmıştır.

5.4. Beta Antitoksin Elisa Uygulama Detayları

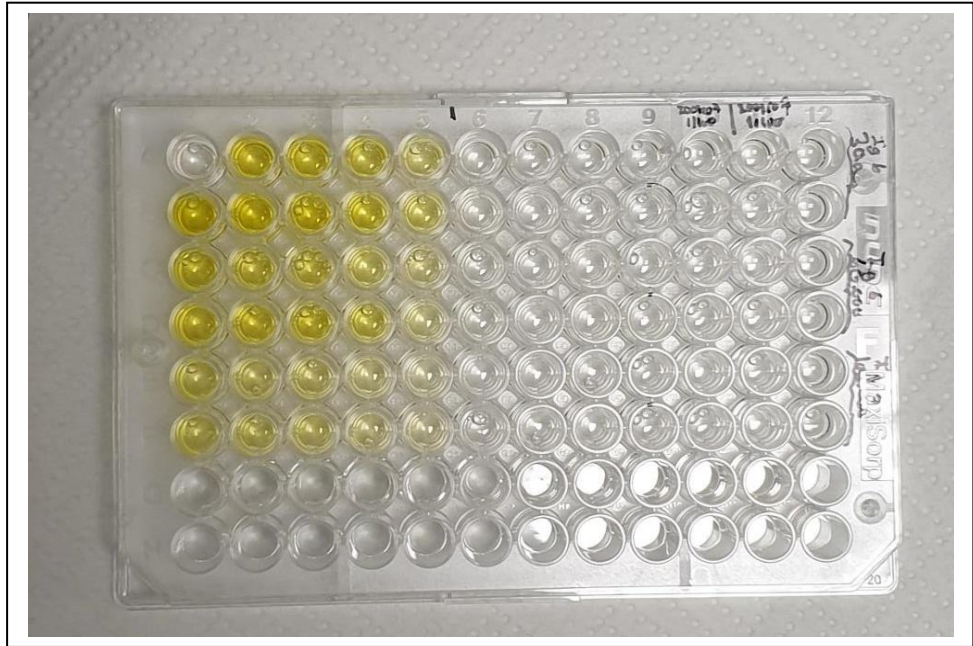
Çalışma için yapılan denemede, negatif serum olarak serum, daha önce bir hastalığa maruz kalmamış 3-6 aylık, sağlıklı tavşandan alınan kanlara ait serum havuzu oluşturularak kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak Referans Serum (*Clostridium perfringens* Tip C Beta Toksin) kullanılmıştır. ‘‘Polyvalent aşı serumu+ Boş Antijen’’ olarak ifade edilen kuyucuk, C. *perfringens* tip C inaktif kültürü ile kaplanmayıp sadece formüle edilen aşıyla aşılanan tavşanların serum havuzu kullanılarak gözlem açısından antijen yokluğunda okunacak OD değerinin yorumlamada katkı sağlaması amaçlanmıştır. ‘‘Konjugat + Substrat’’ olarak ifade edilen kuyucukta, antijen ve serum yokluğunda okunacak OD değerinin yorumlamaya katkı sağlanması amacıyla bu şekilde çalışılmıştır. Şekil 5.3.’de görüldüğü gibi farklı konjugat seyreltmeleri (1/30.000,1/60.000,.1/100.000) kullanılmıştır. Bu durumun sebebi; farmakopede, konjugat olarak kullanılan Anti Rabbit IgG’nin sulandırması 1/1000 olarak kullanılması uygun görülmüş fakat çalışma öncesi yapılan deneme uygulamalarında konjugatın ileri sulandırmaya gidilmesi uygun görülmüştür. Ayrıca konjugatın uygulama prosedürüne göre konjugat sulandırması 1/30000 olacak şekilde çalışması istenmiştir. Çalışma sırasında uygulanan bu sulandırma OD değerlerine istenildiği gibi yansımış ve daha doğru sonuçlar verdiği anlaşılmıştır. Bu yüzden çalışma 2 için oluşturulan platede Şekil 5.5’de de olduğu gibi konjugat sulandırması 1/30000 olarak çalışmaya devam edilmiştir. Konjugat için 1/30000 seyreltmesinin daha doğru sonuç vermesi Tablo 5.1 ve 5.2’deki OD sonuçlarından anlaşılmaktadır.

Yapılan Beta antitoksin ELISA testlerinin görüntüleri ve sonuçları aşağıdadır.

Çalışma 1 sonunda oluşan plate görüntüleri şu şekilde olmuştur;



Şekil 5.3 Çalışma 1’de substrat eklendikten sonra oluşan plate görüntüsü.

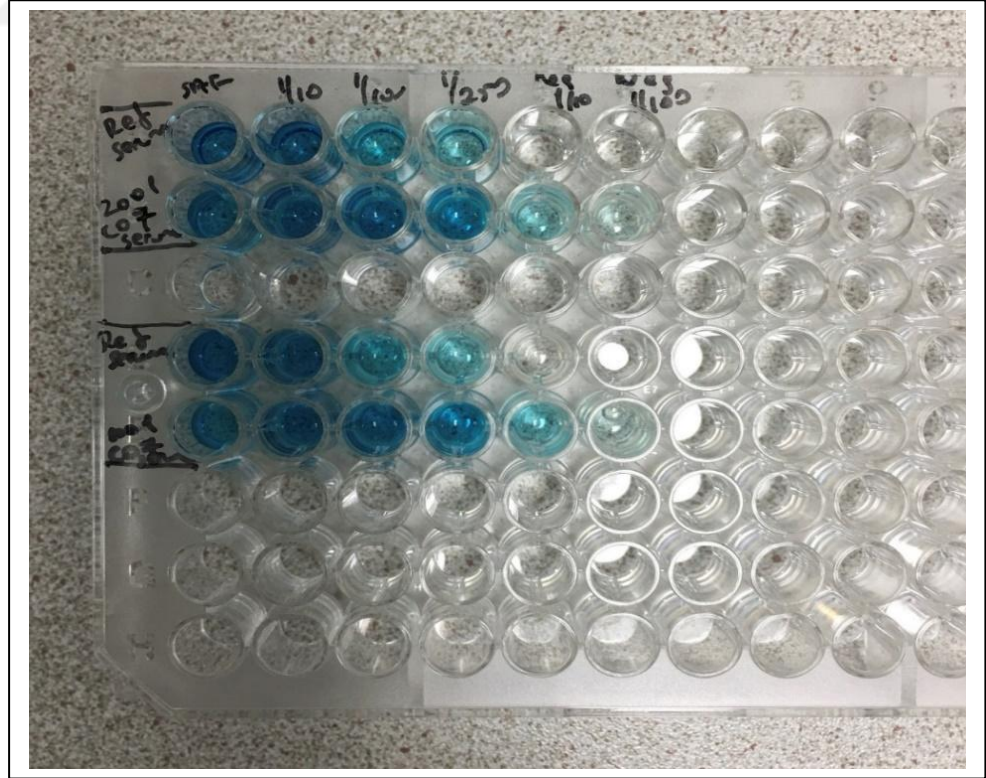


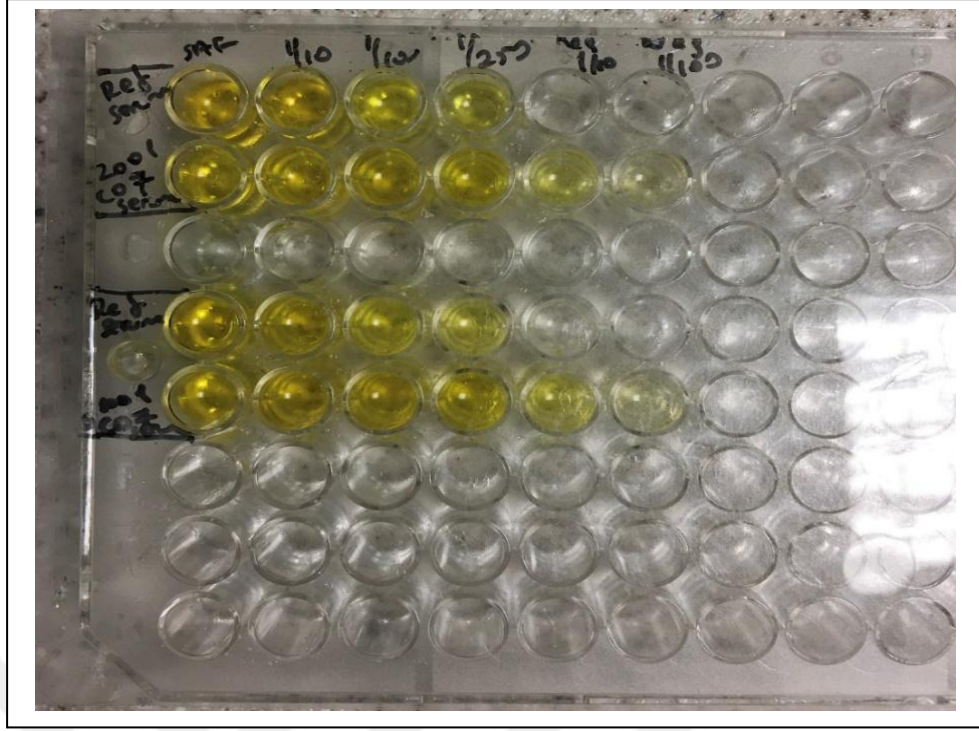
Şekil 5.4 Çalışma 1’de stop solüsyonu sonucu oluşan plate görüntüsü.

Tablo 5.1 Çalışma 1’de stop solüsyonu sonucu oluşan OD değerleri.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,097	1,225	1,115	0,762	0,490	0,105	0,101	0,107	0,111	0,138	0,122	0,124
B	2,027	1,778	1,600	1,031	0,621	0,126	0,111	0,113	0,125	0,199	0,139	0,114
C	1,144	0,844	0,834	0,538	0,387	0,122	0,117	0,140	0,127	0,145	0,133	0,129
D	1,075	1,154	1,048	0,718	0,364	0,135	0,127	0,130	0,136	0,151	0,143	0,161
E	0,630	0,503	0,453	0,331	0,239	0,109	0,110	0,107	0,120	0,153	0,142	0,131
F	0,606	0,559	0,493	0,346	0,269	0,110	0,110	0,111	0,138	0,144	0,110	0,155
G	0,032	0,036	0,041	0,034	0,037	0,038	0,034	0,039	0,034	0,035	0,035	0,032
H	0,034	0,036	0,038	0,037	0,035	0,035	0,037	0,036	0,035	0,037	0,037	0,034

Çalışma 2 sonunda oluşan plate görüntüleri şu şekilde olmuştur;

**Şekil 5.5** Çalışma 2’de substrat eklendikten sonra oluşan plate görüntüsü.



Şekil 5.6 Çalışma 2’de stop solüsyonu sonucu oluşan plate görüntüsü.

Tablo 5.2 Çalışma 2’de stop solüsyonu sonucu oluşan OD değerleri.

	1	2	3	4	5	6
A	2,799	2,934	1,545	0,809	0,023	0,026
B	2,480	2,948	2,835	2,867	0,599	0,284
C	0,100	0,035	0,033	0,034	0,032	0,032
D	2,812	3,011	1,556	0,897	0,108	0,028
E	0,528	3,138	3,068	2,957	0,990	0,290
F	0,034	0,034	0,034	0,036	0,035	0,036
G	0,037	0,034	0,034	0,035	0,035	0,033
H	0,038	0,034	0,034	0,035	0,037	0,036

5.5. Beta Antitoksin Elisa Uygulama Sonuçları

Yapılan ilk çalışma şu şekilde değerlendirilebilir; farmakopede yer alan değerlendirme kriteri ‘‘test serumunun OD değeri/ negatif serum OD değeri>1,0 veya referans serumun OD değeri / negatif serum OD değeri>1,0 ise, söz konusu test serumu geçerlidir’’ şeklindedir. Buna göre; Polyvalent aşı serumu (1/100) / Negatif Serum (1/100) = 1,778 / 0,126 = 14,111 veya Referans serum (1/100) / Negatif Serum (1/100) = 1,225 / 0,126 = 9,722. Bu sonuçlara göre her iki serum değeri> 1,0 olduğundan test serumları geçerli kabul edilmiştir.

Ayrıca ‘‘Test edilen serumun OD değeri / Referans serumun OD değeri \geq 1,0 EU ise, test serumu uygun bulunup, söz konusu aşı serisi ‘‘geçti’’ olarak değerlendirilir.’’ şeklinde ikinci kriter bulunmaktadır. Bu kritere göre hesaplama şu şekildedir; Polyvalent aşı serumu (1/100) / referans serum (1/100) = 1,778 / 1,225 = 1,451. Bu sonuca göre aşı serisi Beta Antitoksin Elisa testini geçmiştir.

Yapılan ikinci çalışma şu şekilde değerlendirilebilir; yapılan serum dilüsyonlarında saftan dilüsyondan, 1/250 dilüsyonundaki seyreltmeye kadar gözle görülen renk farkı gözlemlenmiş ve test sonucu fiziki olarak olumlu yorumlanmıştır. Farmakopede yer alan değerlendirme kriteri’’ test serumunun OD değeri/ Negatif Serum OD değeri>1,0 veya Referans serumun OD değeri / Negatif Serum OD değeri>1,0 ise, söz konusu test sonucu geçerlidir’’ şeklindedir. Buna göre; Polyvalent aşı serumu (1/100) / Negatif Serum (1/100) = 2,835 / 0,284 = 9,982 Sonuç>1,0 olduğundan serumlar geçerli olarak kabul edilmiştir.

Ayrıca test edilen serumun OD değeri / Referans serumun OD değeri \geq 1,0 EU ise, test serumu uygun bulunup, söz konusu aşı serisi ‘‘GEÇTİ’’ olarak değerlendirilmektedir. Buna göre; Polyvalent aşı serumu (1/100) / Referans Serum (1/100) = 2,835 / 1,545 = 1,834 değeri bulunmuştur. Bu sonuca göre aşı serisi geçerli olarak kabul edilmiştir.

6. TARTIŞMA

Enterotoksemi kavramı tanım olarak, *Clostridium perfringens*'in toksinlerinin oluşturduğu, koyun ve sığırlarda görülen, belirtileri çok hızlı gelişen ve öldürücü karakterde bir hastalık grubudur. Bu bakteriler sağlıklı hayvanların bağırsaklarında her zaman bulunurlar fakat hastalık yapmayacak düzeydedirler. Normal koşullarda hastalık oluşturmazlar. Bağırsak hareketlerinin azalmasına neden olan koşullarda bu bakteriler hızlıca çoğalır ve toksin oluştururlar. Ortaya çıkan toksinler bağırsakların yapısını bozar. Damarın iç yapısında, kalp, böbrek, akciğer ve beyinde değişikliklere neden olur. Beyindeki bozulma, su toplanması ve küçük kanamalarla hayvanın kısa zamanda ölmesine yol açar. (Arslan A., 2019)

Clostridium spp. hareketsiz, anaerobik olarak büyüyen ve sporlar oluşturan gram pozitif çubuklardır, bununla birlikte mikro aerobik koşullarda hayatta kalma yeteneğine sahiptir, bu nedenle aerotolerant anaerob olarak sınıflandırılır. *Clostridium perfringens*, virülans faktörü olarak dört ana toksin üretir. Bu dört ana toksin, alfa, beta, epsilon ve iota toksinidir. *Clostridium* bakterileri beş toksinotipe (*A*, *B*, *C*, *D* ve *E*) sınıflandırmak için kullanılır. (Arslan A., 2019)

Toksinler proteinik yapıda olduğundan sıcaklıktan kolayca etkilenebilirler. Sakurai ve Duncan'ın yaptığı bir çalışmada beta toksin, 50°C'de 0.01 M fosfat tamponu (pH 7.0) içinde inkübe edildiğinde, 5 dakika içinde toksin aktivitesinde %75'lik bir azalma olduğu, 60 dakikalık inkübasyondan sonra, ilk aktivitenin %95'inden fazlasının kaybedildiğini görmüşlerdir. Bu veriler, beta-toksininde ısıya dayanıksız olduğunu göstermiştir. (Sakurai J., and Duncan C.L., 1978) Bu veriye de dayanarak *Clostridium perfringens* tip C üretiminin her aşamasında sıcaklığın hayvan vücut sıcaklığı da olan 37°C sınır değerinde kalmasına dikkat edilerek çalışılmıştır.

Nagahama ve ark. (1991) yaptığı bir antijen üretim çalışmasında, ELISA test yöntemi kullanılarak beş standart *Clostridium perfringens* suşu ve oluşturduğu toksin test edilmiştir. Yöntemde; *C. perfringens* tip A için NCTC 8237 suşu, *C. perfringens* tip B için NCTC 8533 suşu; *C. perfringens* tip C için NCTC 3180 suşu; *C. perfringens* tip D için NCTC 8346 suşu ve *C. perfringens* tip E için NCTC 8084

suşları kullanılmıştır. Beta ve iota toksinleri, sırasıyla *C. perfringens* tip C ve tip E'nin 7 saatlik kültürlerinin süpernatanda saptanmış, ancak 24 saatlik kültürlerinde saptanmamıştır. 7 saatlik bir *C. perfringens* tip B kültüründen elde edilen süpernatanttan çalışan ELISA testinde beta ve epsilon toksinleri tespit edilmiş ancak 24 saatlik kültürden yapılan çalışmada her 2 toksinde tespit edilememiştir. Bu sonuçlarda da görüldüğü üzere her toksinin kararlılığının olduğunu ve kısa sürede ve çeşitli etkenlerle kendi kendine yıkıma uğradığını göstermektedir. Antijen üretim aşamasında, toksinlerin bu araştırma makalesinde olduğu gibi kısa sürede yıkıma uğraması göz önünde bulundurularak scale up işlemleri kısa zamanlı bir üretim yapılacak şekilde planlanmıştır. Bu yüzden inkübasyon süreleri ön kültürde 8 saat, alt kültürde 18 saat, üretim kültürde 5 saatte tamamlanmıştır. Ayrıca Sakurai & Duncan (1975) ve Pivnick ve ark (1965) tarafından yapılan başka bir çalışmada kültür süpernatantında bulunan beta ve epsilon toksinlerinin öldürücü aktivitelerinin durağan fazın başlamasından sonraki 1-2 saat içinde keskin bir şekilde azaldığını bildirmiştir. Bulgulara dayanarak, bu toksinler, daha uzun inkübasyon süresine maruz kaldıklarınca kolayca yok olacaklarından dolayı, erken durağan faza kadar ELISA ile ölçülmesi gerektiği vurgulanmıştır. Örneğin ELISA ile *C. perfringens* tip C'nin 7 saatlik veya 24 saatlik bir kültüründen alınan süpernatanda beta veya epsilon toksini tespit edilmemiştir. ELISA ile elde edilen sonuç, TNT ile elde edilen sonuçla uyumlu olduğu söylenmektedir.

Enterotoksemi enfeksiyonun hızlı ve şiddetli seyretmesi, önleyici tedavi tedbirlerinin ön planda olması gerekliliğini vurgulamıştır. Enfeksiyondan korunmak için antikora bağlı bağışıklık (humoral immunité) etkin haldedir ve bu etkin durum serum ve antitoksin seviyeleri ile yakından ilişkilidir. Bu açıdan hastalığın kontrolü için aşılamaya bağlı aktif bağışıklık oldukça önemlidir. *C. perfringens* tip C enfeksiyonlarının önlenmesi, büyük ölçüde inaktif aşılamaya dayanır. Aşıların etkili olması için, konakçı hayvanda koruyucu bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarabilmeleri gerekir. Bu kapsamda tavşanlara, formüle edilen polivalan aşı uygulanmış ve belirlenen süreler sonunda kan alma işlemi gerçekleştirilmiş, santrifüj ile serumlar ayrılarak bir serum havuzu oluşturulmuştur. Bu serum havuzu beta antitoksin ELISA testinde kullanılmıştır. Oluşturulan serum havuzu ELISA yönteminde kullanıldığında formüle edilen aşıda beta toksinin etkinliği açısından başarılı sonuçlar alınmıştır.

Ticari olarak temin edilebilen *C. perfringens* tip C aşuları, clostridial toksinlere karşı nötralize edici antikorlar üretir. Üretim ihtiyaçları ve yasal gereklilikler, antijen üretimi için süreç içi testi gerektirir. Şu anda, *C. perfringens* tip C toksin materyalleri, bir veya birden fazla deney hayvanı kullanılarak test edilmektedir. Bu tür testlerin in vivo olarak test edilen deney hayvanlarında ölüm veya felç kalma gibi şiddetli klinik bulgulara bağlı olarak yürütülmesi, gelişmekte olan hayvan refahının daha iyiye götürülmesi, deney hayvanlarına acı veren uygulamalardan uzaklaşılması ve testlerde kullanılan hayvan sayısının azaltılması yönündeki etik yaklaşımlara uygun olmadığı görülmektedir. (Arslan A., 2019) Ayrıca zaman, test maliyeti ve işgücü açısından da dezavantajlara sahip yöntemler olduğu bilinmektedir. Polivalan olarak hazırlanan aşıda, her bir bileşen için ekstra bir in vivo test gereksiniminin olması, aşının potensininin ortaya konmasında kullanılan hayvan sayısını, iş gücünü ve test maliyetini daha da arttıracığı görülmektedir.

İn vivo testler yerine, özellikle antikor tabanlı ELISA metotları gibi in vitro testlerin daha efektif olarak uygulanmaya başlanması ve bu yönde yapılacak her bir deneme çalışması bile testlerde kullanılacak olan hayvan sayısının azaltılması açısından, referans metodun sonuçlarına benzer bir benzerlik göstermesi ve güvenli ve tekrarlanabilir olması yönüyle de in vitro testlerin geliştirilmesi gerekliliğini bir kez daha ortaya koymaktadır. Avrupa Farmakopesi içinde yakın zamanda canlı bünyesinde gerçekleşen yöntemlerin laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen yöntemlerle nasıl değiştirileceğine dair bir kılavuz yayınlanması, bilimsel önemi olan, mevcut doğrulama gerekliliklerini gerçekleştiren ve in vivo yöntemlere göre uyumu gösterilen farklı in vitro prosedürlerin bu sebeple kullanım beklentilerini giderek arttırmıştır (EP, 2018c).

Deney hayvanları için kullanılması hedeflenen yöntem dönüşümlerinde; işlevsel bir yanıtın (toksin nötralizasyonu gibi) veya antijen içeriğinin in vitro olarak serolojik metotlarla belirlenmesi, toksin bağlama ve moleküler yöntemler kullanılarak ekstra ajan genomlarının bulunması ve canlı organizmaların titrasyonu gibi farklı metotların uygulanabildiği bilinmektedir (Kulpa-Eddy vd., 2011; EP, 2018c). Ancak serolojik bazlı bu testlerde (ELISA gibi) standardize edilmiş antijen, antikor ya da referans standartlara ihtiyaç duyulmaktadır. İn-house yöntemler

olarak geliştirilen bu yöntemlerin tanımlanması, karakterize edilmesi, antijenin saflaştırılması ya da standardizasyonundaki zorluklar bu tip testlerin önemli dezavantajları olarak belirlenmiştir. Ayrıca formülasyonların karmaşıklığı, ürünlerin çeşitliliği ve farklı adjuvanların olduğu veya uygun antijen ekstraksiyon metotlarının eksikliği çoğu kez analizlerin kesinliği üzerinde etki etmektedir (Stokes vd., 2011; Romberg vd., 2012). Bu açıdan in vivo yerine serolojik yöntemlerin kullanılması her ne kadar zor uygulanabilir gibi görünse de in vitro olarak uygulanması şiddetle önerilmektedir. Ancak bu metotlar; çalışma örneklerinin elde edilebilmesi için, deney hayvanlarının (tavşan) aşı ile immunizasyonuna ihtiyaç duyulmasından dolayı, aşısındaki antijen içeriğinin ölçülmesine dayanan yöntemlerde olduğu gibi hayvan gereksinimini ortadan kaldırmamaktadır. Bununla birlikte, immunizasyon ve kan alma süreçlerinin deney hayvanlarında daha az acı ve ızdırap oluşturucu olduğu bilinir.

Giderek artan biyoetik yaklaşımlar ve söz konusu teknik zorluklar; aşı potensinin belirlenmesinde deney hayvanı kullanımının daha az kullanıldığı alternatif metotların uygulanması düşüncesinin ortaya çıkması ve gelişmesinde önemli bir etken olduğu görülmüştür. (Arslan A., 2019)

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada, 10 fareye uygulanan Toksin Nötralizasyon Testi ile birlikte eş zamanlı olarak, aynı seyreltme oranlarının kullanıldığı beta antitoksin ELISA testi de çalışılmıştır. Test sonuçlarına bakıldığında TNT’de beta toksin etkinliğinin uygun seyreltmeler sonucunda çıkan sonuç formüle edilen aşının Avrupa Farmakopesinde yer alan 10 IU değerini karşılması şeklinde olmuştur. Yine aynı aşı Avrupa Farmakopesinde yer alan diğer metot olan Beta Antitoksin ELISA metoduna göre, her iki kritere göre de değer >1 ’i geçtiğinden aşı ‘‘geçti’’ ifadesi ile testin in-house metot olarak geçerliliği olabileceğini göstermiştir.

Uygulaması sırasında, ELISA plate’nin yıkanmasının çoklu pipetle birden çok kez yapılması, uygulamayı manipülasyon kaynaklı hatalara açık hale getirmektedir. Bu hataları elemine edebilmek amacıyla yıkama işlemi otomatik olarak yapan cihazların kullanılması bu durumun daha az hata ile tamamlanabileceğini göstermektedir. Otomatize bir ELISA mikropate yıkayıcı bir cihaz bu sorunu minimum düzeye indirecektir.

TNT ile birlikte ELISA yönteminin birlikte çalışılması gerekliliğinin önemi çalışmada bir kez daha vurgulanmıştır. Yapılan ELISA testi geçerli görünse de validasyon testleri tamamlandıktan sonra yürürlüğe alınması gereklidir. Aynı zamanda testin spesifite ve sensitivite çalışmalarını yapılması, yanlış negatif/pozitif gözlem durumları açısından da fikir oluşturacağından gözardı edilmemesi gerekir. Bu süreç boyunca her iki testin her aşı seri numarası değiştiğinde eş zamanlı olarak uygulanması gerekli olacaktır. İn-house olarak uyarlanan bu metot, kullanılan kimyasallarda meydana gelecek bir problem olmadığı sürece, aşısı yapılan antijenlerdeki üretim süreci devam ettikçe ve Avrupa Farmakopesinde ilgili bölümde bir revizyon gerçekleşmediği sürece validasyonları sonucunda uygulanabilir hale gelecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Arslan A., 2019, Clostridium Perfringens epsilon toksoid içeren aşılarda mdck hücre hatlarında toksisite analizi ile potensin belirlenmesi, Aydın, 60s
- Bueschel D.M., Jost B.H. and Billington S.J.,2003, Prevalence of cpb 2, encoding beta2 toxin, in Clostridium perfringens field isolates: correlation of genotype with phenotype, *Vet Microbiol* 94: 121–129p
- Bullen J.J. and Cushnie G.H., 1963, The failure of antitoxin to protect guinea-pigs against intraperitoneal infection with *Clostridium welchii* type A, *Path. Bac.* Vol 86: 345p
- Clifford, R.J., 2015, Guidelines for Validation of In Vitro Potency Assays, United States Department of Agriculture, *Veterinary Services Memorandum* No. 800.112
- Dray T., 2004, *Clostridium perfringens* type A and beta2 toxin associated with enterotoxemia in a 5-week-old goat. *Can Vet Journal* 45: 251–253p
- Duracova M, Klimentova J, Fucikova A. and Dresler J., 2018, Proteomic methods of detection and quantification of protein toxins. *Toxin*, 10, 99p
- Ebert, E., Oppling, V., Werner, E. and Cussler K., 1999, Development and prevalidation of two different ELISA systems for the potency testing of *Clostridium perfringens* β and ϵ toxoid containing veterinary vaccines, *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 24, 299-311p
- European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM),10th edition.
- Fisher D.J., Fernandez-Miyakawa M.E. and Sayeed S., 2006, Dissecting the lethality contributions of *Clostridium perfringens* type C toxins in the mouse intravenous injection model, *Infect Immun* 74:5200–5210p.
- Gurjar, A., Li, J., and McClane B.A., 2010, Characterization of toxin plasmids in *Clostridium perfringens* type C isolates, *Infect Immun* 78:4860–4869p.
- Hadimli H, H., Erganiş O., Sayın Z., and Aras Z., 2011, Toxinotyping of *Clostridium perfringens* isolates by ELISA and PCR from lambs suspected of enterotoxemia, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Selçuk University, Konya, *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 36(4) : 409-415

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Immerseel V.F., De Buck J., Pasmans F., Gerard H., Freddy H., Ducatelle R., 2004, *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health, *Avian Pathology*, 33(6), 537- 549
- Isparta Valiliği, Gıda Tarm Hayvancılık Müdürlüğü, 2013, Enterotoksemi, Isparta
- Johansson, A. and Aspan., Kaldhusdal M., Engström E.B., 2009, Genetic diversity and prevalence of netB in *Clostridium perfringens* isolated from a broiler flock affected by mild necrotic enteritis, *Vet.Mic.*
- Johnston D.M., Whiteside E.T., Williamson E.M., Kurtz M.D., 1962, Toxigenic Profile of *Clostridium perfringens* Strains Isolated from Natural Ingredient 2 Laboratory Animal Diets, USA.
- Kulpa-Eddy J, Srinivas G, Halder M, Hill R, Brown K, Roth J, Draayer H, Galvin J, Claassen I, Gilford G, Woodland R, Doelling V, Jones B, Stokes WS. Non-Animal Replacement Methods for Veterinary Vaccine Potency Testing: State of the Science and Future Directions, *Procedia in Vaccinology* 2011, 5, 60-83.
- Labbe, R.G., Lund, B.M., Baird-Parker T.C., Gould G.W., 2000, Microbiological safety and quality of food, Vol. II *Aspen Pub.*, Aspen, USA, 1110– 1135p
- Lucey B.P., Grover M.H., William H. and Welch, M.D., 2004, The discovery of *Bacillus welchii*, *Arch Pathol Lab Med*, 128, 1193-5
- Martin P.K., Naylor R.D. and Sharpe R.T., 1988, Detection Of *Clostridium Perfringens* B Toxin By Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Research In Veterinary Science*, 44-2, 270-1
- Nagahama, M., Kobayashi, K., Ochi S., Sakurai, J., 1991, Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins, *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 81, 41- 44p
- Nagahama, M.; Ochi, S.; Oda, M.; Miyamoto, K.; Takeha ra, M.; Kobayashi, K.; 2015, Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin, *Toxins* 7, 396-406p

Niilo L, 1980. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. *Can Vet J* 21, 141-148.

Pawaiwa S.R., Gururaj K., Gangwar N.K., Singh D.D., Kumar R., and Kumar A., 2020, The Challenges of Diagnosis and Control of Enterotoxaemia Caused by *Clostridium perfringens* in Small Ruminants. *Advances in Microbiology*, 10, 238-273

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Pelczar M, Chan E, and Krieg N. *Microbiology Concepts and Applications*. 1st ed. London: Education press, 1986:527-55.

Quick Start™ Bradford Protein Assay User Guide Instruction Manual

Romberr J., Lang S., Balks E., Kamphius E., Duchow K., Loos D., Rau H., Motitschke A., Jungbäck., 2012, Potency Testing of Veterinary Vaccines: The Way From In Vivo to In Vitro, *Biologicals* 40, 100 – 106p

Saadh J.M., Sa'adeh J.I., Dababneh F.M., Almaaytah M.A. and Bayan F.M., 2020. Production, immunogenicity, stability, and safety of a vaccine against *Clostridium perfringens* beta toxins, *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916

Sakurai J. and Duncan L.C., 1977, Purification of Beta-Toxin from *Clostridium perfringens* Type C. *Infection And Immunity*, 741-745p

Sakurai J. And Duncan L.C., 1978, Some properties of Beta-toksin produced by *Clostridium perfringens* type c, *Infection And Immunity*, 678-680p

Sayed S, Uzal F.A., and Fisher D.J., 2008, Beta toxin is essential for the intestinal virulence of *Clostridium perfringens* type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. *Mol Microbiol*, 67, 15–30p

Sesardic D., Khan V., and Cobel M.j., 1992, Targeting of specific domains of diphtheria toxin by site-directed antibodies, *Journal of General Microbiology*, 138, 2197-2203p.

Sigma Aldrich, A0545, Anti Rabbit IgG Product Specification

Skerman V, McGowan V, and Sneath P., 1980, Approved Lists of Approved Bacterial Names, *American Society for Microbiology*, Washington DC, USA.

Songer J.G., 1996, Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev*, 9, 216- 34.

T.C. Sağlık Bakanlığı, Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, 2014, Ankara, 543s

Uzal F., Navarro M.A. and McClane B. A., 2018. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens*, *Toxins* 10, 202, 1 – 21p

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Uzal F. A., Vidal J. E., McClane B. A. and Gurjar A. A., 2014, *Clostridium Perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases, *Open Toxinology J*, 2: 24–42.

Wilmes M.L., 2018, In Vitro Assay Development As An Alternative To The Use Of Laboratory Animals For Measuring *Clostridium Perfringens* Type C Toxoid, University of Nebraska, *Veterinary and Biomedical Sciences*, 68p


TEŞEKKÜR

Tüm üniversite hayatım boyunca ve yüksek lisans eğitimimin her aşamasında tüm bilgi ve tecrübelerini, desteğini, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana her türlü imkânı ve desteğini sağlayan ATA-FEN A.Ő. yöneticileri ile sürekli fikir alışverişinde bulunduğum tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında olduğu gibi bu süreçte de beni yalnız bırakmayan, varlığını ve desteğini bana her an hissettiren, çok değerli eşim Umut ADIYAMAN'a teşekkür ederim.

Maddi manevi her zaman yanımda olan, her koşulda bana desteklerini sürdüren, çok kıymetli canım aileme; annem, babam ve biricik kız kardeşim Ceren'e teşekkür ederim.



ÖZGEÇMİŞ

Aslı ADIYAMAN, 2006 yılında Suphi Koyuncuoğlu İlköğretim Okulundan, 2010 yılında Bornova Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesinden mezun olmuştur. 2010 yılında girdiği Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan 2015 yılında mezun olmuştur. 2019 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda lisansüstü eğitimine başlamıştır.

Mart 2018'den beri Ata-Fen Veteriner Malzemeleri Hayvancılık Pazarlama Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketinde Biyolog olarak çalışmaktadır.

