



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMÜNOLOJİ ANA BİLİM DALI



BRUSELLOZ OLGULARIN TANI VE TAKİBİNDE YENİ BİYOLOJİK MARKERLER

EREN ÇAĞAN

DOKTORA TEZİ
BURSA-2022



**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMÜNOLOJİ ANA BİLİM DALI**



BRUSELLOZ OLGULARIN TANI VE TAKİBİNDE YENİ BİYOLOJİK MARKERLER

EREN ÇAĞAN

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Ferah BUDAK

DDP(T)-2017/14)

BURSA-2022

**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum “**Bruselloz Olguların Tanı ve Takibinde Yeni Biyolojik Markerler**” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Eren ÇAĞAN
Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

...../...../.....

Adı Soyadı: Eren Çağın

Ana Bilim Dalı: Tıp-İmmünoloji

Tez Konusu: Bruselloz Olguların Tanı ve Takibinde Yeni Biyolojik Markerler

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>AÇIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	☒	☐	
Dış Kapak Sayfası	☒	☐	
İç Kapak Sayfası	☒	☐	
Kabul Onay Sayfası	☒	☐	
Sayfa Düzeni	☒	☐	
İçindekiler Sayfası	☒	☐	
Yazı Karakteri	☒	☐	
Satır Aralıkları	☒	☐	
Başlıklar	☒	☐	
Sayfa Numaraları	☒	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	☒	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	☒	☐	
Kaynaklar	☒	☐	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Ferah Budak

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak

İç Kapak

ETİK BEYANI	i
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	ii
TÜRKÇE ÖZET	vi
İNGİLİZCE ÖZET	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Tanım	5
2.2. Tarihçe.....	5
2.3. Mikrobiyoloji	6
2.4. Epidemiyoloji.....	6
2.5. Klinik Bulgular	7
2.5.1. İskelet Sistemi	8
2.5.2. Sinir Sistemi.....	8
2.5.3. Kardiyovasküler Sistem	9
2.5.4. Gastrointestinal Sistem	9
2.5.5. Hematopoetik Sistem	9
2.5.6. Genitoüriner Sistem	9
2.5.7. Solunum Sistemi	10
2.5.8. Diğer Sistemler.....	10
2.6. Tanı	10
2.6.1. Tanıda Kullanılan Yöntemler.....	11
2.6.1.1. Direkt Tanı Yöntemleri	11
2.6.1.1.1. Kültür	11
2.6.1.1.2. Moleküler Tanı (Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri) (NAAT).....	12
2.6.1.2. İndirekt Tanı Yöntemleri (Serolojik Yöntemler)	12
2.6.1.2.1. Hızlı Aglütinasyon Testleri	14
2.6.1.2.1.1. Rose Bengal Testi	14
2.6.1.2.1.2. Mikroaglütinasyon	14
2.6.1.2.2. Tüp Aglütinasyon Testleri.....	14
2.6.1.2.2.1. Standart Tüp Aglütinasyon Testi (Wright Testi)	14
2.6.1.2.2.2. Diamino 6,9 Etoxy Acridin (Rivanol) ve 2-Mercapto Ethanol'lü Aglütinasyon Testi	14
2.6.1.2.2.3. Coombs Testi	15

2.6.1.2.3. ELISA (Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi).....	15
2.6.1.2.4. Kompleman Fiksasyon Testi (KFT)	15
2.6.1.2.5. Brucellacapt Testi.....	15
2.6.1.2.6. Brucella Dipsitik Test	16
2.6.1.2.7. Floresan Polarizasyon Testi	16
2.6.1.2.8. Lateral Flow Assay (LFA)	16
2.7. Tedavi.....	16
2.11. <i>Brucella</i> Patogenezi	17
2.12. <i>Brucella</i> İmmünolojisi	24
2.12.1. Doğal İmmün Sistem ve <i>Brucella</i>	25
2.12.1.1. Makrofajlar ve Dendritik Hücreler.....	25
2.12.1.2. Nötrofiller.....	28
2.12.1.3. Diğer T Lenfosit Alt Grupları ve Doğal Öldürücü Hücreler.....	28
2.12.2. Brusellozda Edinsel İmmün Yanıt	29
2.12.2.1. Spesifik T Hücre Yanıtı	29
2.12.2.2. B Lenfositler ve <i>Brucella</i> Enfeksiyonu.....	30
2.12.2.3. Sitokinler	31
2.13. Kronik Brusellozlu Vakalarda <i>Brucella</i> Anerjisi.....	31
2.14. Yeni Markerler	32
2.14.1. Human ABI Gene Family Member 3 (ABI3)	32
2.14.2. Human C-Type Lectin Domain Family 12, Member B (CLEC12B).....	33
2.14.3. Human DNA Damage Inducible Transcript 4 Like (DDIT4L)	34
2.14.4. Human Zinc Finger Protein 1 (ZFP1)	35
2.14.5. Human Protein Inhibitor of Activated STAT4 (PIAS4)	36
2.14.6. Human Protein Phosphatase 2A Activator Regulatory Subunit 4 (PPP2R4)	37
2.14.7. Human WD Repeat-Containing Protein 33 (WDR33)	39
2.14.8. Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO)	40
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	42
3.1. Hastaların Seçimi ve Çalışma Planı	42
3.2. Protein Düzeylerinin Saptanması	42
3.3. İstatistiksel Değerlendirme.....	46
4. BULGULAR.....	47
4.2. CLEC12B.....	48
4.3. DDIT4L.....	49
4.4. ZFP1	50
4.5. PIAS4	51

4.6. PPP2R4	52
4.7. WDR33	53
4.8. IDO.....	54
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	56
6. KAYNAKLAR	64
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	85
8. TEŞEKKÜR	88
9. ÖZGEÇMİŞ.....	89



TÜRKÇE ÖZET

Bruselloz tüm dünyada özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak görülen zoonotik bir hastalıktır. Hastalık temel olarak akut ve kronik olarak iki fazda görülmektedir. Bruselloz tanısında çok sayıda laboratuvar yöntemi geliştirilmiş olmasına rağmen halen özgüllük ve duyarlılığı yüksek, ucuz ve güvenli kriterlerini karşılayan özel bir test yoktur. Ayrıca tedaviye yanıtı değerlendirecek kronikleşmeyi öngörecektir bir testte henüz bulunamamıştır. Human ABI gene family member 3 (ABI3), Human C-type lectin domain family 12, member B (CLEC12B), Human DNA damage inducible transcript 4 like (DDIT4L), Human zinc finger protein 1 (ZFP1), Human protein inhibitor of activated STAT4 (PIAS4), Human protein phosphatase 2A activator regulatory subunit 4 (PPP2R4), Human WD Repeat-Containing Protein 33 (WDR33) Human Indoleamine 2,3- Dioxygenase (IDO), son dönemlerde keşfedilmiş ve immün sistemin çeşitli aşamalarında görev alan proteinlerdir. Bu çalışma *Brucella* patogenezinin aydınlatılmasına katkı sağlayacak, bruselloz tedavisine yanıtı gösterecek ve kronikleşmeyi öngörebilecek yeni markerler keşfedebilmek amacıyla yapılmıştır.

Çalışma grupları akut, kronik, iyileşen ve kontrol hastalar olmak üzere dört grup olarak oluşturuldu. Tüm gruplardan alınan kan örneklerinden serum ayrılarak Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile çalışmamızda yer alan protein seviyeleri tespit edildi.

ABI3, CLEC12B ve PPP2R4'nin artan seviyeleri akut hastalık tanısında, azalan seviyeleri tedavi yanıtının değerlendirilmesinde, DDIT4L, PIAS4 ve IDO'nun azalan seviyeleri akut hastalık tanısında, artan seviyeleri tedavi yanıtının değerlendirilmesinde bir belirteç olarak kullanılabilir. Ayrıca takip eden titrelerde ABI3, CLEC12B, PIAS4, PPP2R4 ve IDO'nun seviyelerinin aynı düzeyde kalması kronikleşmeyi ön görmede bir belirteç olarak kullanılabilir. Ayrıca elde edilen sonuçlar ile *Brucella* bakterisinin immün sistemden gizlenme stratejisinin anlaşılmasında yeni ipuçları elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bruselloz, akut, kronik, ABI3, CLEC12B, DDIT4L, ZFP1, PIAS4, PPP2R WDR33, IDO

İNGİLİZCE ÖZET

NEW BIOLOGICAL MARKERS in THE DIAGNOSIS and FOLLOW-UP of BRUCELOSIS

Brucellosis is a common zoonotic disease all over the world, especially in developing countries. Brucellosis is mainly seen in two phases, acute and chronic. Numerous laboratory methods have been developed for the diagnosis of brucellosis, but there is still no special test that meets the criteria of high specificity and sensitivity, cheap and safe. In addition, it has not yet been discovered in a test to predict chronicity to evaluate response to treatment. Human ABI gene family member 3 (ABI3), Human C-type lectin domain family 12, member B (CLEC12B), Human DNA damage inducible transcript 4 like (DDIT4L), Human zinc finger protein 1 (ZFP1) Human protein inhibitor of activated STAT4 (PIAS4), Human protein phosphatase 2a activator regulatory subunit 4 (PPP2R4), Human WD Repeat-Containing Protein 33 (WDR33) Human Indoleamine 2,3- Dioxygenase (IDO) are proteins that have recently been discovered and are involved in various stages of the immune system. This study was carried out in order to make important contributions to the illumination of brucellosis pathogenesis, to discover proteins that will show response to brucellosis treatment and that can predict chronicity.

The study groups were formed into four groups as acute, chronic, subacute and recovering patients. Serums were separated from blood samples taken from patients in all groups, and protein levels in our study were determined with the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method.

Increased levels of ABI3, CLEC12B, and PPP2R4 can be used as a marker for diagnosis of acute illness, decreased levels for assessment of treatment response, decreased levels of DDIT4L, PIAS4, and IDO for diagnosis of acute illness, and increased levels as a marker for assessment of treatment response. In addition, keeping the levels of ABI3, CLEC12B, PIAS4, PPP2R4 and IDO at the same level in the following titers can be used as a marker to predict chronicity. Besides, new clues were obtained in understanding the strategy of hiding *Brucella* bacteria from the immune system with the results of the study.

Keywords: Brucellosis, acute, chronic, ABI3, CLEC12B, DDIT4L, ZFP1, PIAS4, PPP2R WDR33, IDO

1. GİRİŞ

Bruselloz koyun, keçi, inek, domuz gibi hayvanlardan insanlara bulaşan tüm dünyada yaygın olarak görülen zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır (Ariza ve ark., 2007). Her yıl yarım milyon yeni vaka görülmekte ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (Pappas, Papadimitriou, Akritidis, Christou, & Tsianos, 2006). Hastalık çoğunlukla iyi pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi ile ortaya çıkmaktadır (Garcell ve ark., 2016).

Brucella türleri gram negatif, küçük, hareketsiz, spor oluşturmeyen, hücre içinde çoğalan, boyu 0,6-1,5 µm eni 0,5-0,7 µm olan aerobik kokobasillerdir. *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* ve *Brucella canis* insanlar için patolojiktir (Franco, Mulder, Gilman, & Smits, 2007). *Brucella* türleri endotoksin üretmezler. Hücre duvarında bulunan lipopolisakkarit (LPS) tabaka endotoksin aktivitesi gösterir. LPS tabaka içinde üzerinde bulunan O polisakkarit bakteriyel virülansda önemli aktiviteye sahiptir. O zincir üzerinde bulunan A, B, C olarak adlandırılan üç epitop türler arasında farklılıklar gösterir. Sitoplazmik, periplazmik ve dış membran üzerinde bulunan yapısal proteinler antijenik özellik taşırlar ve immün sistem tarafından tanınmalarını sağlar (Lapaque, Moriyon, Moreno, & Gorvel, 2005).

Bruselloz insidansı dünyanın değişik yerlerinde 0,03-160/100 000 arasında değişmektedir. Çoğunlukla Akdeniz Ülkeleri, Balkanlar, İran Körfezi, Orta Doğu, Orta ve Güney Afrika'da görülmektedir. Çoğunlukla geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde görülmekte birlikte gelişmiş ülkelerde büyük oranda eradike edilmiştir (Pappas ve ark., 2006).

Bruselloz insan vücudunda birçok organ ve sistemi tutabilmektedir. Klinik spektrum, asemptomatik taşıyıcılıktan ölümcül hastalığa kadar değişmektedir. İnkübasyon periyodu bir-dört hafta kadardır. Ancak aylarca uzun süreler de olabilir (Corbel, 2006). Hastalık akut ateşli hastalık veya kronik hastalık olarak ortaya çıkabilir. Hastaların %75-100'ünde atalji, ateş ve yorgunluk vardır. Bunların yanında terleme, terde kötü koku, iştah kaybı, kas ağrıları, titreme ve sırt ağrıları olabilir (Corbel, 2006). En yaygın klinik bulgu hepatomegali ve ateş olmakla birlikte

splenomegali, periferik artrit, sakroileit, skrotal şişlik, ense sertliği ve lenfadenopati görülebilir. Hastalık klinik semptomların başlangıç zamanına göre akut (<8 hafta), subakut (8-52 hafta) ve kronik (>52 hafta) olarak sınıflandırılmaktadır (Gul, & Erdem, 2019). Kültür pozitif olup olmadığına bakılmaksızın semptom ve bulguların tekrarlaması relaps olarak adlandırılır. Relaps %5-15 oranında görülür ve çoğunlukla kullanılan tedavi rejimi ile alakalıdır. Bakterinin antibiyotik direncinden ziyade hastanın tedaviye uyumunun kötü olması ile ilişkilidir (Gul, & Erdem, 2019).

Bruselloz tanısında direkt ve indirekt tanı yöntemleri vardır. Direkt tanı yöntemleri kültür ve moleküler tanı [Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri), (NAAT)] iken, indirekt tanı yöntemleri ise hızlı aglütinasyon testleri, t p aglütinasyon testleri, Coombs Testi, enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA), kompleman fiksasyon testi (KFT), brucellacapt testi, Brucella dipsitik test, floresan polarizasyon testi, lateral flow assay (LFA) gibi testlerdir. Bu testler içinde en çok kullanılanı standart t p aglütinasyon testidir (SAT). Ancak hiçbir test tek başına yüksek özgüllük ve duyarlılıkta değildir. Bazı testler için ileri laboratuvar yöntemleri gerekirken, bazıları halen standardize edilememiştir (Yagupsky, Morata, & Colmenero, 2019).

 n vitro model çalışmalarda *Brucella* türlerinin konak hücrelerine adezyonu, hücre içine alımı, hücre içi trafiği, yaşam döngüsü ve replikasyonu anlaşılmıştır. *Brucella* türleri epitelyal hücrelere fermuar benzeri fagositoz ile alındıktan sonra epitelyal bariyerleri geçerler. Mukozal fagositik hücreler tarafından fagosit edildikten sonra *Brucella* patojen ilişkili moleküler patern (PAMP)'leri azaltarak, değiştirerek veya saklayarak immün yanıtı zayıflatır. Sadece bazı Toll-benzeri reseptörler (TLR) aracılığı ile çok zayıf bir immün yanıt oluşur. Hücre içine giren *Brucella*, *Brucella* içeren vakuoller (BCV) içinde yaşar, hücre içi trafiği kontrol eder ve replikatif kompartımana dönüşür. Fagosit edilmiş *Brucella* apoptozu engelleyerek, dendritik hücre (DH) olgunlaşmasını engelleyerek, antijen sunumunu azaltarak ve T hücre aktivasyonunu engelleyerek immün yanıttan kaçar ve tropizmi olan dokulara hareket eder (de Figueiredo, Ficht, Rice-Ficht, Rossetti, & Adams, 2015).

Konak immün sistemi ile *Brucella* etkileşimi sonrasında ya patojenin yok edilmesi ya da hücre içi parazitin çoğalarak kronik hastalık gelişimi ile sonlanır. *Brucella* ya karşı konak savunmasında esas olarak antijen sunan hücre (ASH), Th1

hücreler ve farklılaşma kümesi CD8+ sitotoksik T lenfositler (STL) içeren hücre aracılı immünite ile sağlanır. Ancak immün sistemin diğer elemanları da immün yanıtı katılırlar. *Brucella* bakterisi ile konak immün sistem arasında çok karmaşık bir etkileşim başlar. Bu süreçte çok sayıda protein ve protein domainleri immün sistemi aktive ederken, aynı zamanda *Brucella*'nın gizlilik stratejisinin hedefi olurlar. Bu etkileşim sonrasında parazitin yaklaşık % 90'nı yok edilir. Ancak geri kalanları yaşayarak organizmayı istila ederler (Skendros, & Boura, 2013).

İnsan deoksiribonükleik asidinin (DNA) yapısının aydınlatılmasında sonra, çok sayıda gen ve bu genlerin kodladığı protein ve protein domainleri keşfedilmiştir. Bu proteinlerin hücre büyümesi, çoğalması, transkripsiyon, hücre iskeletinin oluşturulması, hücre göçü ve protein fosforilasyonu gibi bilinen fonksiyonlarının yanında henüz tam olarak anlaşılamayan çok sayıda fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. Ancak bu proteinlerin bruselloz hastalarındaki fonksiyonları neredeyse hiç araştırılmamıştır. *Brucella* patogenezi ve immünobiyolojisi hakkında oldukça fazla bilgi edinilmiştir. Ancak temel noktaların anlaşılmış olmasına rağmen parazit ve konak immün sistemi arasındaki etkileşim, burada rol oynayan protein, protein domainleri ve fonksiyonları tam anlaşılamamıştır. Bununla birlikte bruselloz tanısında çok sayıda laboratuvar yöntemi geliştirilmiş olmasına rağmen halen özgüllük ve duyarlılığı yüksek, ucuz ve güvenilirlik kriterlerini karşılayan özel bir test yoktur. Ayrıca tedaviye yanıtı değerlendirebilecek, kronikleşmeyi öngörebilecek bir testte henüz geliştirilememiştir.

Bursa Uludağ Üniversitesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı'nda 2012-2015 yılları arasında "Brusellozda persistan ve kronik enfeksiyon oluşumunda rol oynayan immünolojik faktörlerin araştırılması" başlıklı, 111S182 nolu TÜBİTAK 1001 projesi yapılmıştır. Bu bilimsel araştırmada 30 000'den fazla mRNA (yayınlanmamış çalışma) ve mikro RNA çalışılmıştır (Budak ve ark., 2015, 2016a, 2016b, 2018). Bu çalışmadan elde edilen verilere göre akut ve kronik brusellozlu vakalar karşılaştırıldığında bazı gen ekspresyonlarının anlamlı olarak artmış ya da azalmış olduğu tespit edilmiştir. Bu genlerin bazı spesifik proteinleri kodladığı bilinmektedir. Bizim bu çalışmada amacımız ekspresyonunda farklılıklar olan bu genlerin ürünü proteinlerin seviyesini akut, subakut, iyileşen, kronik brusellozlu olgularda ve sağlıklı kontrol grubunda ölçerek kıyaslamak ve bu proteinlerin kronikleşmeye gidişte, tanı ve

tedavi yanıtını değerlendirmede marker olarak kullanılıp kullanılamayacağını değerlendirmektir. Bu amaçla bahsi geçen çalışmada hastalık sırasında ve hastalığın akut ve kronik dönemlerinde gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları bulunan gen ürünleri olan ABI 3; ABL interactor (Abi), PIAS4: Protein Inhibitor Of Activated STAT 4, PPP2R4: protein phosphatase 2 phosphatase activator, DDIT4L: DNA Damage Inducible Transcript 4 Like ve WDR33: WD Repeat-Containing Protein 33,IDO; Indoleamine 2,3-Dioxygenase protein veya protein domainlerinin çalışılması planlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım

Bruselloz koyun, keçi, inek, domuz gibi hayvanlardan insanlara bulaşan tüm dünyada yaygın olarak görülen zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır (Ariza ve ark., 2007). Her yıl yarım milyon yeni vaka görülmekte ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (Pappas ve ark., 2006). Hastalık çoğunlukla iyi pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi ile ortaya çıkmaktadır (Garcell ve ark., 2016). Bruselloz Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) tarafından B kategorisinde biyolojik silah olarak kabul edilmektedir (Pappas, Akritidis, Bosilkovski, & Tsianos, 2005).

2.2. Tarihçe

Hastalık çok eski tarihlerden bu yana bilinmektedir. Daha önceleri Malta Humması, Kırım Ateşi ve Bang Ateşi olarak adlandırılmıştır. 1913 yılında ondülan ateş, 1940 yılından sonra bruselloz olarak adlandırılmıştır (Corbel, 2006; Manson-Bahr & Willoughby, 1929). David Bruce adlı askeri cerrah 1886-1887 yıllarında Malta'da hastaların dalağından bakteriyi izole etmiştir. Bakteri izole edildikten sonra *Micrococcus melitensis* olarak adlandırılmıştır. Danimarkalı Doktor Bang sığırlarda düşüğe neden olan *Bacillus abortus* olarak adlandırdığı bakterileri izole etmiştir (Pappas ve ark., 2005). 1914 yılında Traum, abort olmuş domuz fetüslerinde bakteriyi tespit etmiş ve *Bacterium abortus suis* olarak adlandırmıştır. 1920 yılınca Bruce'un ismi temel alınarak *Brucella* türleri *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* olarak adlandırılmıştır. 1953 yılında van Drimmelen, koyunlardan *Brucella ovis*'i, 1957 yılında Stoenner ve Lackman sıçanlardan *Brucella neotomae*'i, 1968 yılında Carmichael ve Bruner köpeklerden *B. canis*'i izole etmişlerdir (Halling ve ark., 2005). 1994 yılında Ewalt ve Ross deniz memelilerinden *Brucella pinnipediae* ve *Brucella cetaceae* izole etmişler, sonrasında bu bakteriler *Brucella pinnipedialis* ve *Brucella ceti* olarak yeniden adlandırılmıştır (Kerrinnes ve ark., 2015). *Brucella microti* 2008

yılında hayvanlardan, *Brucella inopinata* 2010 yılında meme implantlarından izole edilmiştir (Scholz ve ark., 2008, 2010).

2.3. Mikrobiyoloji

Brucella türleri gram negatif, küçük, hareketsiz, spor oluşturmeyen, hücre içinde çoğalan, boyu 0,6-1,5 µm eni 0,5-0,7 µm olan aerobik kokobasillerdir. *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* ve *B. canis* insanlar için patolojiktir. Tüm *Brucella* türleri katalaz pozitif iken oksidaz ve üreaz aktiviteleri ve hidrojen sülfid üretimleri değişkendir. Çoğunlukla *Brucella* türleri üremek için aerobik koşullar gerektirirken, *B. abortus* ve *B. suis* mikroaerofilik olup %5-10 karbondioksit ihtiyacı duyar (Franco ve ark., 2007). Çoğu *Brucella* türü yaklaşık 2,1 ve 1,2 mega base pair (Mbp) büyüklüğünde halkasal kromozom yapısına sahiptir (Franco ve ark., 2007). *B. suis* diğer türlerden farklı olarak 3,1 Mbp büyüklüğünde halkasal kromozom yapısına sahiptir (Paulsen ve ark., 2002).

Brucella bakterileri endotoksin üretmezler. Hücre duvarında bulunan LPS tabaka endotoksin aktivitesi gösterir. LPS tabakada bulunan O polisakkarit bakteriyel virülansında önemli aktiviteye sahiptir. O zincir üzerinde bulunan A, B, C olarak adlandırılan üç epitop türler arasında farklılıklar gösterir. Sitoplazmik, periplazmik ve dış membran üzerinde bulunan yapısal proteinler antijenik özellik taşırlar ve immün sistem tarafından tanınmalarını sağlar (Lapaque ve ark., 2005). Merkezi oligosakkaritlerin yapısını etkileyen genlerde meydana gelen değişiklikler doğal immün yanıt ile daha kolay etkileşime giren zayıflatılmış mutantların oluşumu ile sonuçlanır (DH olgunlaşmasını arttırmak ve enflamatuvar sitokinleri arttırmak suretiyle) (Fontana ve ark., 2016).

Bakteriler 4°C krema içinde altı hafta, dondurma içinde 30 gün ve taze peynir içinde 15-100 gün arasında yaşayabilmektedirler (Davies, & Casey, 1973). Kaynatma ve pastörizasyon bakterileri öldürür. *Brucella* sütün ekşimesi veya laktik asit üretimi ile de ölürler. Peynirin 60-90 gün sonra tüketilmesi *Brucella* açısından güvenlidir. Bakteriler ısıtmaya, iyonize radyasyona ve dezenfektanlara da duyarlıdır (Wang, Bie, Cheng, Wu, & Lu, 2015).

2.4. Epidemiyoloji

Bruselloz insidansı dünyanın değişik yerlerinde 0,03-160/100 000 arasında değişmektedir (Pappas ve ark., 2006). Dünya üzerinde bulunan 1,3 milyar sığırın 300

milyondan fazlasının enfekte olduğu düşünölmektedir (de Figueiredo ve ark., 2015). Çoğunlukla Akdeniz Ölkeleri, Balkanlar, İran Körfezi, Orta Doğu, Orta ve Güney Afrika'da görölmektedir (Pappas ve ark., 2006). Çoğunlukla gelişen ölkelerde görölmekte olup, gelişmiş ölkelerde büyük oranda eradike edilmiştir (Corbel, 2006; Pappas ve ark., 2006; Troy, Rickman, & Davis, 2005). En patojen ve invazif insan brusellozu *B. melitensis* sonrasında *B. abortus* ve *B. suis*'dir. *B. melitensis* 1-3 suşları koyun, keçi, deve ve bufaloları, *B. suis* 1-5 suşları domuzları, kemirgenleri ve ren geyiklerini, *B. canis* köpekleri etkilemektedir (Pappas ve ark., 2005).

Kontamine koyun ve keçi sütleri *B. melitensis* için en önemli kaynak olarak görölmektedir (Corbel, 2006; Mancini ve ark., 2014). Enfekte hayvanlar veya sekresyonlarının açık yaralar ile direkt teması, enfekte aerosollerin inhalasyonu ve konjonktival inokölasyon ile de bulaş meydana gelebilmektedir (Tuon, Gondolfo, & Cerchiari, 2017). Brusellozun çiftçiler, veterinerler, doktorlar ve laboratuvar çalışanları arasında sık görölmesi nedeniyle meslek hastalığı olarak kabul edilmektedir. İnsandan insana geçişi oldukça nadir olmakla birlikte doğumsal enfeksiyonlar ve seksüel geçiş bildirilmiştir (Wang ve ark., 2015). Kan transfüzyonu ve kemik iliğı nakli ile bulaş rapor edilmiştir (Tuon ve ark., 2017).

2.5. Klinik Bulgular

Bruselloz insan vücudunda birçok organ ve sistemi tutabilmektedir. Çok sayıda hastalığı taklit edebilmesi nedeniyle "büyük taklitçi" olarak anılmaktadır (Franco ve ark., 2007). Klinik spektrum asemptomatik taşıyıcılıktan ölümcöl hastalığa kadar değişmektedir (Corbel, 2006). İnkübasyon periyodu bir-dört hafta kadardır. Ancak aylarca uzun süreler de olabilir. Klinik olarak türlerin tanımlanması mümkün olmamakla birlikte *B. melitensis*'in *B. abortus*'a göre daha hızlı bir klinik hastalığa yol açtığı bilinmektedir. Klinik prezentasyon ve komplikasyonlar açısından benzer özellik göstermektedirler (Guerrier, Daronat, Morisse, Yvon, & Pappas, 2011).

Hastalık, akut ateşli hastalık veya kronik hastalık olarak ortaya çıkabilir. Hastaların %75-100'ünde atıralji, ateş ve yorgunluk vardır. Bunların yanında terleme, terde kötü koku, iştah kaybı, kas ağrıları, titreme ve sırt ağrıları olabilir (Corbel, 2006; Franco ve ark., 2007; Gul, & Erdem, 2019). Ateşin doğal seyri artış ve azalışlar ile karakterizedir ve ondölan ateş olarak adlandırılmaktadır (Manson-Bahr, &

Willoughby, 1929). En yaygın klinik bulgu hepatomegali ve ateş olmakla birlikte splenomegali, periferik artrit, sakroileit, skrotal şişlik, ense sertliği ve lenfadenopati görülebilir (Bosilkovski, Katerina, Zaklina, & Ivan, 2010; Buzgan ve ark., 2010). Hastalık klinik semptomların başlangıç zamanına göre akut (<8 hafta), subakut (8-52 hafta) ve kronik (>52 hafta) olarak sınıflandırılmaktadır (Andriopoulos, Tsironi, Deftereos, Aessopos, & Assimakopoulos, 2007).

Kültür pozitif olup olmadığına bakılmaksızın belirti ve bulguların tekrarlaması relaps olarak adlandırılır (Corbel, 2006). Relaps %5-15 oranında görülür ve çoğunlukla kullanılan tedavi rejimi ile alakalıdır. Hastalık tedavi kesilmesinden altı ay sonra tekrarlaması halinde ilk atağa göre hafif seyretmesi beklenir (Solera, 2010). Relaps bakterinin antibiyotik direncinden ziyade hastanın tedaviye uyumunun kötü olması ile ilişkilidir (Andriopoulos ve ark., 2007). Diğer nedenler yetersiz antibiyotik kullanımı, bakterinin virülansı ve fokal enfeksiyon ile ilişkilidir (Corbel, 2006).

2.5.1. İskelet Sistemi

Osteoartriküler tutulum hastaların yarısından fazlasında görülen en yaygın komplikasyondur. Sakroileit, spondilodiskit ve periferik artrit şeklinde ortaya çıkar (Buzgan ve ark., 2010; Calik, & Gokengin, 2011). Lomber tutulum en sık görülen spinal tutulum bölgesi iken kalça, diz ve ayak bileği en fazla tutulan eklemlerdir (Bosilkovski, Krteva, Caparoska, & Dimzova, 2005; Erdem ve ark., 2015; Ulu-Kilic ve ark., 2014). Genç hastalarda çoğunlukla sakroileit olarak görülmekle beraber yaşlı hastalarda çoğunlukla spondilit ve periferik artrit olarak karşımıza çıkmaktadır (Erdem ve ark., 2015; Dashti, & Karimi, 2013; Ulu-Kilic, Metan, & Alp, 2013).

2.5.2. Sinir Sistemi

Nörolojik tutulum brusellozun ciddi bir komplikasyonudur ve hastaların yaklaşık %10 kadarında görülür (Buzgan ve ark., 2010; Gul, Erdem, & Bek, 2009). Bruselloz merkezi sinir sistemi (MSS) enfeksiyonlarının yaklaşık %0,5 kadarını oluşturmaktadır (Erdem ve ark., 2017). MSS tutulumu akut menenjit veya meningoensefalit, kronik periferik form (radikülönöropati), ve kronik MSS enfeksiyonu (meningoensefalit, miyelit, serebellar tutulum ve kraniyal sinir felçleri) olarak ortaya çıkabilir (Gul ve ark., 2009). Nörobruselloz vakalarının yarısından fazlası ciddi nörolojik bulgular ile prezente olurlar. Başta altıncı ve sekizinci sinir olmak üzere

kafa çiftleri tutulumu olur. Polinöropati, radikülopati, depresyon, parapleji, inme ve apse bildirilmiştir (Gul, & Erdem, 2019).

2.5.3. Kardiyovasküler Sistem

Kardiyovasküler tutulum endokardit, miyokardit, perikardit, endarterit, trombofilebit ve mikotik anevrizma şeklinde olabilir (Gul, & Erdem, 2019). Kalp yetmezliğine yol açan pankardit ciddi bir komplikasyondur (Biyik, Oto, & Ergene, 2007). Mortalite çoğunlukla endokardite bağlı olarak gelişir (Franco ve ark., 2007). Aort ve mitral kapak en fazla tutulumun olduğu yerdir. Hastaların %60'dan fazlasında altta yatan yapısal kalp hastalığı bulunmaktadır. Tedaviye rağmen mortalite %13 civarındadır (Koruk ve ark., 2012).

2.5.4. Gastrointestinal Sistem

İnsan brusellozu enterik ateş sebeplerinden biridir ve gastrointestinal sistem (GİS) semptomlarından ziyade sistemik semptomlar ön plandadır. Brusellozlu bir kişide bulantı, kusma, ishal, kabızlık ve karın hassasiyeti olması durumunda GİS tutulumundan şüphelenilmelidir (Mermut ve ark., 2012). Diyare tüm bruselloz vakalarının %3-6'sında bildirilmiştir (Corbel, 2006). Spontan bakteriyel peritonit, akut ve kronik pankreatit, kolit, intestinal tıkanıklık ve ileit bildirilmiştir (Gul, & Erdem, 2019).

2.5.5. Hematopoetik Sistem

Brusellozda çok geniş aralıkta laboratuvar anormallikleri bildirilmiştir. Anemi, lökopeni, lökositoz, trombositopeni, trombositoz ve pansitopeni görülebilmektedir (Gul, & Erdem, 2019). Kemik iliği incelemesinde hipersellülerite, hemofagositoz ve granülomlar görülebilir (Demir ve ark., 2012).

2.5.6. Genitoüriner Sistem

Çoğunlukla erkeklerde olmak üzere genitoüriner sistem tutulumu %5-10 civarında görülür. Erkeklerde çoğunlukla epididimoorşit şeklinde görülürken kadınlarda çoğunlukla pyelonefrit olarak ortaya çıkar (Gul, & Erdem, 2019). Nefrit çoğunlukla endokardit komplikasyonu olarak gelişmektedir. *Brucella*'nın neden

olduğu renal, testiküler, skrotal apse ve prostatit vakaları bildirilmiştir (Erdem ve ark., 2014; Li ve ark., 2014).

2.5.7. Solunum Sistemi

Solunum sistemi tutulumu bruselloz vakalarının %1 kadarında görülmektedir. Bronşit, pnömoni ve plevral efüzyon şeklinde ortaya çıkabilir (Gul, & Erdem, 2019). Bruselloz en önemli laboratuvar kaynaklı enfeksiyonlardan biridir ve çoğunlukla inhalasyon yolu ile bulaşır (Siengsan-Lamont, & Blacksell, 2018).

2.5.8. Diğer Sistemler

Nonspesifik mukozal ve deri lezyonları %2-6 arasında bildirilmektedir (Buzgan ve ark., 2010; Karaali, Baysal, Poturoglu, & Kendir, 2011). Eritematöz, papülonodüler ve eritemanodozum benzeri lezyonlar en sık görülen cilt lezyonlarıdır ve çoğunlukla hastalığın erken aşamasında görülür (Karaali ve ark., 2011). Üveit en önemli komplikasyon olmakla birlikte optik nörit, papil ödem, keratit, konjonktivit ve diğer oküler komplikasyonlar gelişebilir. Panüveitli hastaların neredeyse tamamı görme yetisini kaybederler ve tüm üveitli vakaların beşte birinde görülmektedir (Rolando ve ark., 2008).

2.6. Tanı

Brucella birçok organ ve dokuyu etkilemektedir. Hastalık bulguları enfeksiyon için spesifik değildir ve birçok hastalık ile karışabilir. Tanıda yaşanan bu zorlukların yanında rutinde kullanılmayan ilaçların uzun süre kullanımını dolayısı ile direnç ve toksisite sorununu ortaya çıkarmaktadır.

Hastanın hikâyesi, fizik muayene bulguları, rutin laboratuvar yöntemleri, radyolojik tetkikler ile birlikte kültür, serolojik testler veya NAAT ile tanı konulur (Yagupsky ve ark., 2019).

2.6.1. Tanıda Kullanılan Yöntemler

2.6.1.1. Direkt Tanı Yöntemleri

2.6.1.1.1. Kültür

Brucella tanısında altın standart yöntemdir. Bakterinin yavaş üremesi, fokal hastalıklarda ve uzamış hastalıklarda tanısallık katkısının düşük olması ve laboratuvar güvenliği gibi dezavantajları vardır. Ancak bakterinin tür düzeyinde tanımlanması, antibiyotik duyarlılığının elde edilmesi ve olası enfeksiyon kaynağının araştırılması avantajlı yanındır (Yagupsky ve ark., 2019).

Hastalığın erken döneminde antikor (Ab) titresinin düşük olduğu veya oluşmadığı dönemde kültür kullanışlıdır. Çoğu zaman hastalık klinik tablosu özgül değildir. Hastalığın endemik olduğu bölgelerde hematolojik, romatolojik veya diğer sistem hastalıkları ile karışabilir. Nadir de olsa hastalık tablosu bu hastalıklar ile birlikte olabilir. Dünyanın değişik yerlerinde klinik olarak bruselloz düşünülmeyen çok sayıda olgunun kan kültürlerinde *Brucella spp.* ürettiği bildirilmiştir (Yagupsky ve ark., 2019).

Brucella GIS, solunum yolu, konjonktiva, hasarlanmış deri veya transfüzyon ile bulaşabilir. Giriş bölgesinden bağımsız olarak makrofajlar ve DH tarafından fagosite edildikten sonra en yakın lenf noduna yerleşir. Sonrasında kan yoluyla makrofajlardan zengin olan karaciğer, dalak, lenf nodu ve kemik iliği gibi retiküloendotelial bölgeler başta olmak üzere yayılır. Patogenez sırasında mutlaka bakteriyemik faza girer. Bu dönemde kültür oldukça duyarlıdır. Pozitiflik oranı hastanın durumu, bakterinin tipi ve kan kültürü metoduna bağlı olarak %10-90 arasında değişmektedir (Yagupsky ve ark., 2019).

Hastalığın erken döneminde, bakteriyemi dönemlerinde alınan çok sayıda kültür üreme olasılığını arttırmaktadır. Hastalığın daha geç dönemlerinde bakterinin hücre içi döneme girmesinden sonra üreme ihtimali azalmaktadır (Yagupsky ve ark., 2019). *Brucella*, insanlarda göreceli olarak düşük virulansda olduğu için zayıf bir enflamatuvar yanıt oluşturur. Çoğunlukla hastalar minimal veya silik belirtiler gösterir. Ateş olmayabilir. Bu nedenle hasta ateşsiz bile olsa klinik şüphe durumunda kültür alınmalıdır. Üreme genellikle beş-yedi günde olmakla birlikte örneklerin dört haftaya kadar bekletilmesi önerilmektedir (Yagupsky ve ark., 2019).

Katı veya sıvı besi yerinde üreme sonrasında klasik yöntem olarak gram boyama, oksidaz testi, üreaz aktivitesi, şeker fermentasyonu ve hareketlilik gibi özellikler ile tür ayırımı yapılabilir. Ancak bu yöntem oldukça zaman alan ve çalışanlar için oldukça riskli bir durumdur. Bunun yerine NAAT veya özgül antikor testleri kullanılabilir. Ancak antikor testlerinin de birçok dezavantajı vardır (Yagupsky ve ark., 2019).

Manuel ve otomatize sistemler dâhil olmak üzere birçok kültür yöntemi vardır. Son yıllarda otomatik sistemler son derece kullanışlı hale gelmiştir. Bakteriler çok daha hızlı şekilde üretilabilmektedir. The matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF), son derece hızlı, ekonomik ve alt kültürlerle gerek kalmaksızın doğru sonuçlar elde edilebilmektedir (Yagupsky ve ark., 2019).

2.6.1.1.2. Moleküler Tanı (Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri) (NAAT)

NAAT akut bruselloz ve lokal komplikasyonlarında kültür yöntemlerinden daha duyarlı, serolojik testlerden daha özgüldür. Yüksek duyarlılığı, teknik kolaylığı, hızlı ve güvenli olması nedeniyle kültür ve serolojik yöntemlere iyi bir alternatiftir. Ancak duyarlılığının çok yüksek olması nedeniyle pozitif sonuçlar akut enfeksiyon anlamına gelmez. Sonuçlar klinik ve epidemiyolojik veriler ışığında değerlendirilmelidir. Pozitif sonuçlar, hasta olmayıp *Brucella*’ya sık maruz kalan bir kişide ve başarılı tedaviye rağmen lökositler içinde bulunan çok az miktardaki bakteri DNA’sını tespit edebilir. Tedavi başarısını gösteren belli bir kıtas olmamasına karşın bakteriyel yükün saptanması ileride kıtas olarak kullanılabilir. Multiplex real-time polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bakteri türlerinin identifikasyonu ve ayırımı için kullanışlı olabilir.

Ancak ticari olarak kullanılan kitler çok fazla değerlendirilememiştir. Çalışılacak materyalin seçimi, saklanması, optimal volümü, DNA ekstraksiyon süreci, moleküler hedefin seçimi, amplifikasyon süreci gibi konularda henüz bir standardizasyon olmadığı için henüz yeterince doğrulanmış ticari kitler yoktur.

2.6.1.2. İndirekt Tanı Yöntemleri (Serolojik Yöntemler)

Bu yöntemler *Brucella*’ya veya antijenlerine karşı oluşan antikorların serolojik yöntemler ile tespit edilmesi ve *Brucella* bakterilerine karşı oluşan aşırı duyarlılığın deri testleri ile tespit edilmesidir. Kültür gibi kesin sonuç veren yöntemler değildir ve değerlendirilmesi zordur. Pozitiflik için eşik değer klinik ve epidemiyolojik durumlara

göre değişiklik gösterir. Endemik bölgelerde asemptomatik ve kendi kendini sınırlayan hastalık nadir değildir. Ayrıca başarılı tedavi sonrasında IgG tipi antikorlar aylarca yüksek kalabilir. Birçok dezavantajına rağmen serolojik testler endemik bölgelerde brucelloz tanısı için vazgeçilmezdir. Serolojik testler duyarlı olduğu kadar özgöl olmalı, hastayı temaslıdan ayırabilmeli, latent hasta ile eradike edilmiş hastayı ayırt edebilmeli, yeni başlangıçlı hastalık ile uzun süreli hastalığı tanıyabilmeli, sistemik veya lokal hastalığı tanıyabilmelidir. Ancak günümüzde ne tek başına ne de kombinasyonlar halinde kullanılan hiçbir test bu özellikleri karşılamamaktadır. *Brucella* serolojik testleri çoğunlukla LPS yapısına karşı gelişen antikorlar ile yapılmaktadır. Serolojik testler bakterilerin yapısında bulunan ortak S-LPS ye karşı gelişen antikorlar ile yapılmaktadır. Bu testlerin türler arasında ayırım yapması mümkün değildir. Antikor testlerinin aynı epitoplara taşıyan *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella enterica* serovar Urbana O:30, *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O116 ve O157, *Vibrio cholerae*, *Xanthomonas maltophilia* ve *Afiptia clevelandensis* ile çapraz reaksiyon verebileceği akılda tutulmalıdır. Sitolitik proteinlere karşı gelişen antikorlar hayli özgöldür ve çapraz reaksiyon ihtimali hayli düşüktür (Yagupsky ve ark., 2019).

Serolojik tanıda S-LPS karşı gelişen antikorlar tespit edilir. Hastalığın ilk haftasında IgM tipi antikorlar ortaya çıkar, ikinci hafta IgG1 antikorlar sonrasında IgG2 ve IgA tipi antikorlar düşük düzeyde ortaya çıkar. Dördüncü haftada antikorlar zirve seviyesine çıktıktan sonra IgM tipi antikorlar azalmaya başlar. Hastalığın geç döneminde hâkim olan IgG ve A tipi Ab'dur. Hastalığın geç döneminde aglütine olmayan antikorlar aglütine olanlara göre daha ön plana çıkar. Böyle bir durumda yanlış negatiflikleri engellemek için ek bir test olan Coombs testi yapılmalıdır.

İnsanlarda *Brucella*'ya karşı immün yanıt hayli değişkendir. Çoğu hasta tamamen iyileştikten sonra IgM tipi antikorlar bir yıl kadar kanda tespit edilebilir. Hızla azalan IgA ve IgG titreleri tedaviye iyi yanıtı gösterirken persiste eden veya artan bu Ig'ler tedaviye yanıtsızlığı, residüel hastalığı veya relapsı işaret eder. Relaps olan hastalarda yüksek oranda IgG titresinde artış olurken IgA titresinde orta düzeyde artış olur. IgM titresinde bir artış beklenmez. Fokal komplikasyonu olan hastalarda antikorlar düzeyleri başlangıçta çok yüksektir ve yavaş bir şekilde düşer. Tedavi

sonrasında devam eden yüksek antikor yüksekliği tedavi başarısızlığı olarak değerlendirilmelidir (Yagupsky ve ark., 2019).

2.6.1.2.1. Hızlı Aglütinasyon Testleri

2.6.1.2.1.1. Rose Bengal Testi

Rose Bengal Testi (RBT) bir kart testidir. Aglütine olan ve olmayan tüm antikorları tespit edebilir. Prezon sorunu yoktur. Kolay bir testtir ve özel laboratuvar şartları gerektirmez. Hastalık aşamasından bağımsız olarak duyarlılığı %99'dan fazladır. Ancak aynı epitopu taşıyan bakteriler ile çapraz reaksiyon verebilir. Pozitif sonuçlar ileri testler ile doğrulanmalıdır.

2.6.1.2.1.2. Mikroaglütinasyon

SAT'ın minyatürize edilmiş şeklidir. Daha az serum ve antijen ile aynı anda çok sayıda hasta çalışılabilir.

2.6.1.2.2. Tüp Aglütinasyon Testleri

2.6.1.2.2.1. Standart Tüp Aglütinasyon Testi (Wright Testi)

SAT en yaygın kullanılan tanısal testtir. S-LPS karşı gelişen Ab'ları tespit eder. Klinik bulguların uyumlu olduğu yerlerde 1/160 titre ve üzeri pozitif kabul edilir. Duyarlılığı arttırmak için pozitif sınır değer 1/320 yapılabilir. Hastalığın erken döneminde SAT negatif veya tanı eşiğinin altında kalabilir. Negatif sonuçlar prezon fenomeni sebebiyle de ortaya çıkabilir. Klinik şüphe devam ediyorsa iki-üç hafta sonra test tekrarlanabilir. Antibiyotik tedavisine yanıt ile antikor titresindeki azalma uyumlu olmasına karşın, %3-5 hastada antikor titreleri iki yıl kadar yüksek kalabilir. Klinik olarak iyi durumda olan hastalara titre takibi yapmak gereksizdir.

2.6.1.2.2.2. Diamino 6,9 Etoxy Acridin (Rivanol) ve 2-Mercapto Ethanol'lü Aglütinasyon Testi

IgM tipi antikorlar aynı LPS bağlanması ve uygun tedaviye rağmen IgM seviyelerinin yüksek kalması tanıda zorluklara yol açmaktadır. Bu testte IgM tipi antikorlar 2-Mercapto Ethanol (2-ME) duyarlılığından faydalanılarak, IgM tipi antikorların aglütinasyon yeteneği ortadan kaldırılır. Bu sayede sadece IgG tipi Ab'lar kalır (IgA da benzer duyarlılığa sahiptir). Hastalığın erken döneminde IgM tipi

antikorların hâkim olduğu için erken dönemde tanısal değeri düşüktür. Daha çok tanı almış hastaların tedavi yanıtlarını izlemede kullanılır. 1/20 altı titreler negatif kabul edilir. Endemik bölgelerde 1/80 üzeri titreler pozitif kabul edilir.

2.6.1.2.2.3. Coombs Testi

Özellikle hastalığın geç döneminde aglütinasyon oluşturmayan IgG tipi antikorlar ortaya çıkabilir. Aslında antijen-antikor birleşimi olmakta ancak aglütinasyon olmamaktadır. Anti-human antikorlar bu antikorlar arasında bağlantı yaparak aglütinasyonu ortaya çıkarmaktadır. Bu yöntem çoğunlukla kronik veya relaps hastaların tanısında kullanılmaktadır. Kronik bruselloz tanısında SAT'nin yetersiz kaldığı durumlarda kullanılabilir.

2.6.1.2.3. ELISA (Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi)

Çoğunlukla hücre içi antijenlere karşı oluşan antikorlar ölçülür. Ancak LPS'lere karşı oluşan Ab'da ölçülebilir. Fokal, komplike ve kronik hastaların tanısında tercih edilir. Çoğunlukla doğrulama testi olarak kullanılır. Nörobruselloz hastalarının serolojik tanısında beyin omirilik sıvısında (BOS) ölçülebilir. IgG ve IgM birlikte çalışılmalıdır. Romatoid artrit gibi hastalıklarda olası yalancı pozitiflik için serum ön işleminden geçirilmelidir.

2.6.1.2.4. Kompleman Fiksasyon Testi (KFT)

Teknik zorluklar ve standardizasyon sorunu nedeniyle yaygın olarak kullanılmaz. Enfeksiyonun geç döneminde SAT'ın yetersiz kaldığı durumlarda kullanılabilir.

2.6.1.2.5. Brucellacapt Testi

"Sandwich ELISA" yöntemine dayalı bir testtir. Kuyucukların etrafı anti-human IgG, IgM ve IgA ile kaplıdır. *Brucella*'ya karşı antikor olması durumunda reaksiyon gözle görülebilir hale gelir. SAT ve Coombs'lu testin birlikte yapılmış şeklidir. IgM tipi antikorları ve blokan antikorları saptayabilir. SAT ve RBT'ye göre oldukça duyarlıdır. Ancak yalancı pozitiflik oranları benzerdir. Relaps ve kronikleşme durumunda kullanışlıdır.

2.6.1.2.6. Brucella Dipsitik Test

Brucella özgül antikorları tespiti için kullanılan bir testtir. Basit, ileri bilgi ve laboratuvar şartları gerektirmez. Hastalığın erken dönem tanısında kullanışlıdır.

2.6.1.2.7. Floresan Polarizasyon Testi

Florokrom ile işaretlenmiş küçük antijen molekülleri ve antikorlar ile yaptığı kompleksin rotasyon hızının ölçüm temellerine dayanır. Çoğunlukla hayvancılık sektöründe kullanılır.

2.6.1.2.8. Lateral Flow Assay (LFA)

ELISA testlerinin basit bir çeşididir. IgG ve IgM tipi antikorlar tespit edilir. Sınır değer 1/160 alındığında duyarlılığı SAT ile aynı 1/320 alındığında daha yüksektir. Özgüllüğü %98'in üzerindedir. Yatak başı uygulama için uygundur.

2.7. Tedavi

Antibiyotiklerin makrofajlar içinde konsantre olması tedavi başarısında en önemli faktördür. Tek ilaç çoğunlukla tedavi yetersizliği veya relaps ile sonuçlanır (Lecároz, Blanco-Prieto, Burrell, & Gamazo, 2006). Komplike olmayan bruselloz tedavisinde en az altı hafta süren ikili antibiyotik tedavisi önerilir (Ariza ve ark., 2007; Corbel, 2006; Lecároz ve ark., 2006). Doksisiklin+streptomisin kombinasyonu en başarılı tedavidir. Doksisiklin+gentamisin ve doksisiklin+rifampin diğer alternatif tedavi seçenekleridir (Gul, & Erdem, 2019). *Brucella* izolatlarında tetrasiklin veya aminoglikozid direnci saptanmamıştır. Tedavi başarısızlığı çoğunlukla tedavi uyumsuzluğu nedeniyle olmaktadır. Aynı antibiyotik rejimlerinin uzun süre kullanımı ile tedavi sağlanmaktadır (Gul, & Erdem, 2019). İlk tercih olmamakla birlikte trimetoprim sülfametoksazol (TMP-SMX) temelli rejimler direnç durumunda ve toksisite durumunda kullanılabilir. TMP-SMX sekiz yaş altında dış komplikasyonlarına neden olan doksisikline alternatif olması sebebiyle önemlidir.

Spondilodiskit enfeksiyonlarında enfeksiyonun paravertebral alana, epidural alana, psoas kasına veya sinir köklerine yayılımı durumunda tedavi en az 5-6 ay olmalıdır. Nörobruselloz durumunda bir ay parenteral seftriakson ile birlikte tedavi en az 5-6 ay olmalıdır. Endokardit durumunda en uygun tedavi süresi net olmamakla

birlikte aminoglikozit kullanımı akıllıcadır. Ayrıca seçilmiş vakalar da cerrahi müdahale gerekli olabilir (Gul, & Erdem, 2019).

2.11. *Brucella* Patogenezi

Brucella güçlü doku tropizmi gösterir ve makrofaj, DH ve plasental trofoblastlar içindeki vakuollerde replike olurlar. Ancak bu patojen mikrogliya, fibroblastlar, endotel hücreleri ve epitel hücreleri gibi çok çeşitli memeli hücrelerinde de replike olabilmektedir. *Brucella*'nın hücre içindeki yaşam döngüsü doğal ve edinsel immün yanıt ile sınırlandırılır. Antibiyotik etkisinden kurtulan bakteriler konakta özgün patolojik değişikliklere neden olurlar (Martirosyan, & Gorvel, 2013). Hastalığın üç farklı aşaması vardır. Klinik bulguların ortaya çıkmasından önceki inkübasyon dönemi, bakterinin konak dokularına istila ettiği, yayıldığı akut dönem ve sonunda konak dokularına ağır hasar oluşturan ve ölüme neden olan kronik dönem. İnsanlarda ateş, terleme, yorgunluk, anoreksi, miyalji ve atralji gibi influenza benzeri semptomlar gözlenir. Endemik bölgelerde gebelerde düşüklere sebep olduğu bilinmektedir (Baud, & Greub, 2011). Konağın hücre içinde persiste eden bakteriler lenforetiküler sistem ile tüm vücuda yayılarak kardiyovasküler, hepatik, lenforetiküler, nörolojik ve osteoartriküler hastalıklara yol açarlar. Dalağın büyümesi ile beraber dalak içinde lenfohistiyositik hücrelerde artış, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre sayısında hafif azalma meydana gelirken splenik makrofajlarda büyük bir artış görülür (de Figueiredo ve ark., 2015).

Brucella epitelyal bariyerleri hızla geçerek mukozal makrofajlar ve DH tarafından fagosite edilir (Rossetti ve ark., 2013). *Brucella* profesyonel fagositik hücreler içinde yaşar ve çoğalır. Konak immün sisteminden kaçarak ve değiştirerek hedef dokulara yayılır (Adams, 2002). İn vitro model çalışmalarda *Brucella*'nın konak hücrelerine adezyonu, hücre içine alımı, hücre içi trafiği, yaşam döngüsü ve replikasyonu anlaşılmıştır. *Brucella* mukozal epitelyal hücrelerin yüzeyine bağlanır ve fermuar benzeri bir mekanizma ile hücre içine alınır (Rossetti, Drake, & Adams, 2012). Epitelyal hücreye bağlanmadan önce bağlanma molekülleri aktive olur ve sialik asit ve sülfür rezidüleri içeren epitelyal reseptörlerine bağlanır (Castañeda-Roldán ve ark., 2004). Bağlanma sonrasında patojenin invazyonunu arttırmak için patojen yüzeyi boyunca konak membranının yeniden yapılanmasını sağlayacak olan guanozin

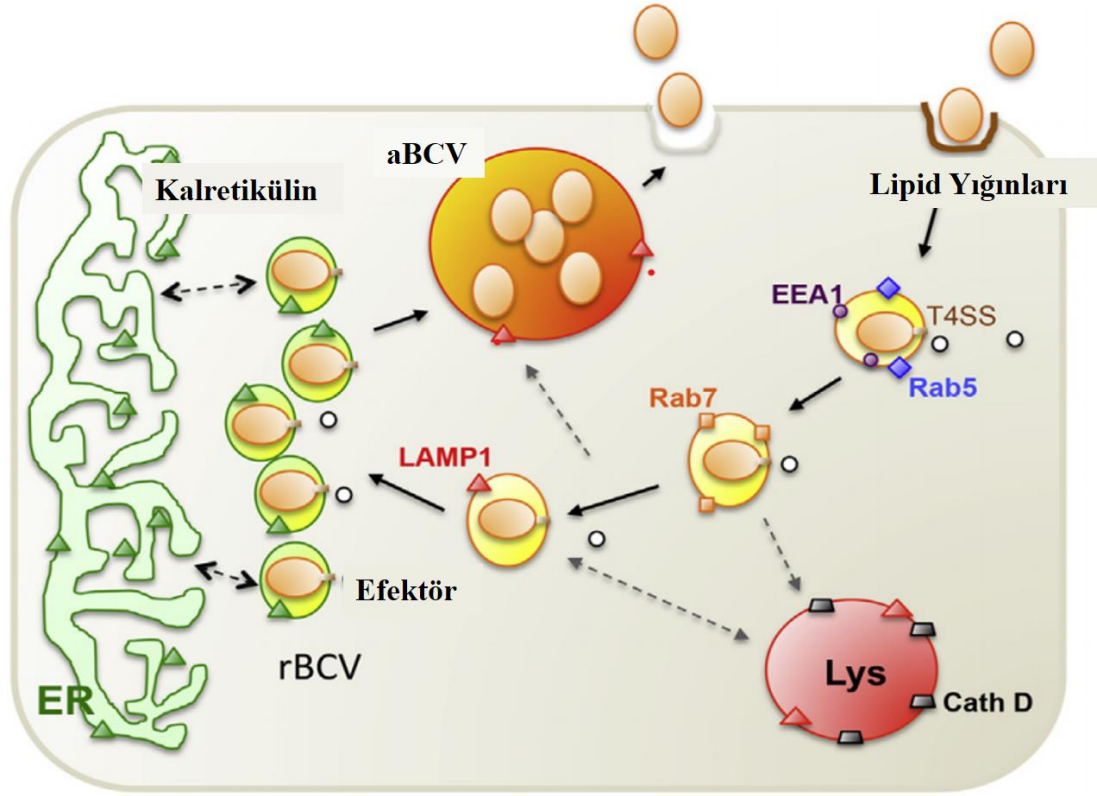
trifosfataz (GTPaz) aktive olur. Mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolunun tam aktivasyonunu gerektiren etkileşim sonrasında birkaç dakika sonra patojen hücre içine girer (Rossetti ve ark., 2012). *Brucella* non-profesyonel fagositler içinde 72 saat kadar yaşar ve çoğalır sonrasında mukozal epitelyal hücrelerin bariyer fonksiyonlarını bozarak epitel tabakayı geçerler (Rossetti ve ark., 2013). Eş zamanlı olarak bu etkileşim minimal proenflamatuvar yanıt oluşturan doğal immün yanıtı başlatır (Barquero-Calvo ve ark., 2007; Rossetti ve ark., 2012). Mukozal fagositik hücreler tarafından hücre içine alınan *Brucella*'nın %10 kadarı çevreye adapte olarak yaşar. *Brucella* PAMP azaltarak, değiştirerek veya saklayarak immün tanımayı ve yanıtı geciktirir (Barquero-Calvo ve ark., 2007). Ancak bazı TLR *Brucella* antijenlerini tanıdıktan sonra (özellikle de TLR2, TLR4 ve TLR9 olmak üzere) enflamatuvar sitokin genlerini kontrol altında tutan transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B (NF-kB)'yi aktive eden sınırlı bir yanıt oluştururlar. Ancak bu yanıt enterobakterilerin oluşturduğundan 10 kat daha zayıf bir enflamatuvar yanıttır (Barquero-Calvo ve ark., 2007).

Hücre içine giren *Brucella* BCV içinde yaşar, hücre içi trafiği kontrol eder vakuolü replikatif bir kompartımana veya brusellom'a dönüştürür (Barquero-Calvo ve ark., 2007). İnvazyondan çok kısa sonra *Brucella*'nın yerleştiği ve adapte olduğu vakuol çok sınırlı miktarda besin içermektedir. Patojen başlangıçta anabolik metabolizmasında görevli protein sentezini ve gen ekspresyonunu azaltır, aminoasit katabolizmasını arttırır, alternatif enerji kaynakları oluşturur ve solunum faaliyetlerini düşük düzeydeki oksijen miktarına göre düzenler (Lamontagne ve ark., 2009). Enfeksiyonun erken döneminden sonra *Brucella*'nın memeli hücre içinde yaşaması ve çoğalması için tip dört sekresyon sistemi (T4SS) gereklidir. T4SS invazyon, sistemik yayılım ve enfeksiyon başlangıcında gerekli değildir. Ancak persistans için mutlak gereklidir. T4SS persistansı sağlamak için hücreyi güçlendirecek olan enflamatuvar bir yanıt oluşturur (Roux ve ark., 2007).

Adaptasyon sürecini atlatan ve yaşamaya devam eden invazif *Brucella* metabolik faaliyetlerine tekrar başlamak için gen ekspresyonuna başlar. Bu translasyon ve transkripsiyon esas olarak taşıyıcıları, demir metabolizmasını ve hücre membranını hedef alır (Lamontagne ve ark., 2009). Eş zamanlı olarak yaşam fonksiyonları için *Brucella* virülans faktörü gibi genleri replike etmeye başlar

(Rambow-Larsen, Rajashekara, Petersen, & Splitter, 2008; Weeks ve ark., 2010). Enfekte fagositer sistem hücreleri adaptasyon sürecine yanıt vermek için aşırı bir transkripsiyonel değişiklik yaparlar. Ancak yaklaşık 12 saat sonra *Brucella*'nın replikasyon başlangıç döneminde bu reaksiyon söner. *Brucella* aktive olmuş fagositer hücrelere karşı enfekte mononükleer hücrelerin apoptozunu engellemek, DH olgunlaşmasını engellemek, antijen sunumunu azaltmak ve naive T hücre aktivasyonunu azaltmak gibi çok zekice stratejiler izler (Billard, Dornand, & Gross, 2007). *Brucella* hücre içi ortama adapte olduktan sonra süresiz olarak hücre içinde persiste ederek tropizmi olan plasental trofoblast, fetal akciğer, erkek genital sistemi, iskelet dokusu, retiküloendotelyal sistem ve endotelyuma metastaz yapar ve enfeksiyon oluşturur. *Brucella* ile hedef dokular arasındaki etkileşim hakkında çok az bilgi mevcuttur (Carvalho Neta ve ark., 2008; Delpino, Fossati, & Baldi, 2009). *Brucella* ile tüm konak hücreleri anlamak için daha ileri ve bütünsel biyolojik sistemlere ihtiyaç vardır.

Brucella BCV'leri ve lizozom birleşmesini engelleyerek hücre içi yıkımdan kaçır. Hücre içine alınmış *Brucella*'yı saklayan BCV endositik komponentten endoplazmik retikulum (ER) belirteçlerini içeren replikatif vakuollere dönüşürler. ER membran ve komponentlerini içeren BCV ER'un fonksiyonel yapısını ve karakteristiğini gösterir (Smith ve ark., 2013). BCV sonrasında otofajik özellikler göstermeye başlar. *Brucella* hücre içi yaşam döngüsünde ayırıcı bir özellik katan lizozom eşlikçi membran protein-1 (LAMP-1) pozitifleşir (Şekil 1).



Şekil 1. *Brucella*'nın makrofaj hücrelerindeki hücre içi trafiği (de Figueiredo ve ark., 2015).

Brucella'nın hücre içi trafiği VirB T4SS tarafından kontrol edilir ve bu sisteme sahip olmayan organizmalar replikatif yaşam dönemine geçmeyi başaramazlar (Comerci, Martínez-Lorenzo, Sieira, Gorvel, & Ugalde, 2001; Delrue ve ark., 2001). *Brucella*'nın T4SS'nin *Brucella* patogeneğinde konak hücreleri ile patojen elementleri arasında etkileşimi olan çok sayıda efektör molekül salgıladığı düşünülmektedir (de Barse ve ark., 2011; Döhmer, Valguarnera, Czibener, & Ugalde, 2014).

İki komponentli düzenleyici sistem *Brucella*'nın gizlenme programında önemli rolü vardır. Üzerinde en çok çalışılan *Brucella* virülans ilişkili regülatör/sensör protein (BvrR/BvrS) iki bileşenli düzenleyici sistem ve the LuxR-like transcriptional regulator VjbR'dir (Viadas ve ark., 2010; Weeks ve ark., 2010). Organizmanın hücre içine alınmasını sağlayan BvrR/BvrS yokluğunda bakteri dış membranında büyük değişiklik meydana gelir (Manterola ve ark., 2007). BvrR/BvrS düzenleyici sistemi karbon ve nitrojen metabolik fonksiyonlarını içermektedir ve 127 farklı gen tarafından eksprese edilmektedir (Viadas ve ark., 2010). Fare modellerinde BvrR/BvrS fonksiyonlarının yokluğunda *Brucella* hücre içinde replike olamaz ve avirulan hale gelir. BvrR/BvrS tarafından düzenlenen genler arasında vjbR'de içeren on tane

transkripsiyonel düzenleyici vardır. vjbR tarafından kodlanan proteinlerin fagozom-lizozom birleşmesini engellemek için gerekli olan T4SS'yi kodlayan VirB ekspresyonunuda düzenlediği gösterilmiştir (Comerci ve ark., 2001). Hücre içinde yaşamsal fonksiyonların devamı için gereken birçok fonksiyonuna rağmen T4SS son dönemde virülans potansiyelinin araştırılması için önemli bir hedef haline gelmiştir (Hong, Tsolis, & Ficht, 2000; O'Callaghan ve ark., 1999). Halen tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen lizozomla etkileşmeyi engelleyen mekanik olaylar, enzim aktiviteleri, protein modifikasyonları gibi birçok hücresel aktivitenin ancak T4SS varlığında gerçekleşebildiği anlaşılmıştır (de Barsy ve ark., 2011; Döhmer ve ark., 2014; Myeni ve ark., 2013).

1990'lı yıllara kadar *Brucella* virülans faktörü olarak tek yapının *Brucella* hücre membranında bulunan O polisakkarit olduğu düşünülmekteydi (Ficht, 2002). Günümüzde hedef genlerin inaktive edilmek suretiyle yapılan çalışmalarda *Brucella*'nın BCV olarak adlandırılan özel bir vakuol içinde yaşadığı, immün sistemden kaçarak çoğaldığı ve yayıldığı anlaşılmıştır (Campos ve ark., 2004). Ayrıca konağın sekretuar komponentini hedef alan ektozik olarak sekrete edilen çok sayıda efektörün konak protein sekresyonunu bozduğu gösterilmiştir (de Jong ve ark., 2013; Myeni ve ark., 2013). Genetik çalışmalarda efektörlerin çok sayıda fonksiyonu bulunmuş olmasına rağmen lizozomal füzyonun engellenmesi, replikasyonun artmasını sağlayan enzimatik aktivite, protein-protein etkileşimi ve efektörlerin hedefleri halen tam olarak anlaşılamamıştır.

Konak katlanmamış protein yanıtının (KPY), ER'da protein katlanma stresine karşı hücre adaptasyona aracılık eden bir mekanizmadır. Katlanmamış proteinler ER biriktiği zaman ER membranında bulunan stres algılayıcısı olan aktive transkripsiyon faktörü-6 (ATF-6), protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) ve inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) KPY'yu uyarır. ATF-6 katlanmayı kolaylaştıran şaperon ekspresyonunu düzenler. Çözülmeyen stres sırasında PERK geçici translasyonel zayıflamaya aracılık eder ve apoptozu artırır. Hücre içinde katlanmamış protein miktarı arttığında X box binding protein I (XBP1) mRNA eklenmesini katalize ederek KPY yanıtını başlamasında IRE1 α kritik rol oynar. Oluşan bu mesaj aktif XBP1 transkripsiyon faktör oluşturmak için çevrilir (Calfon ve ark., 2002). XBP1 KP birikiminin zararlı etkilerini azaltan proteinler ve ER ilişkili proteinler ve ER

şaperonlarının kodlanmasında görevli KPY genlerinin ekspresyonunu kontrol eder (Shaffer ve ark., 2004).

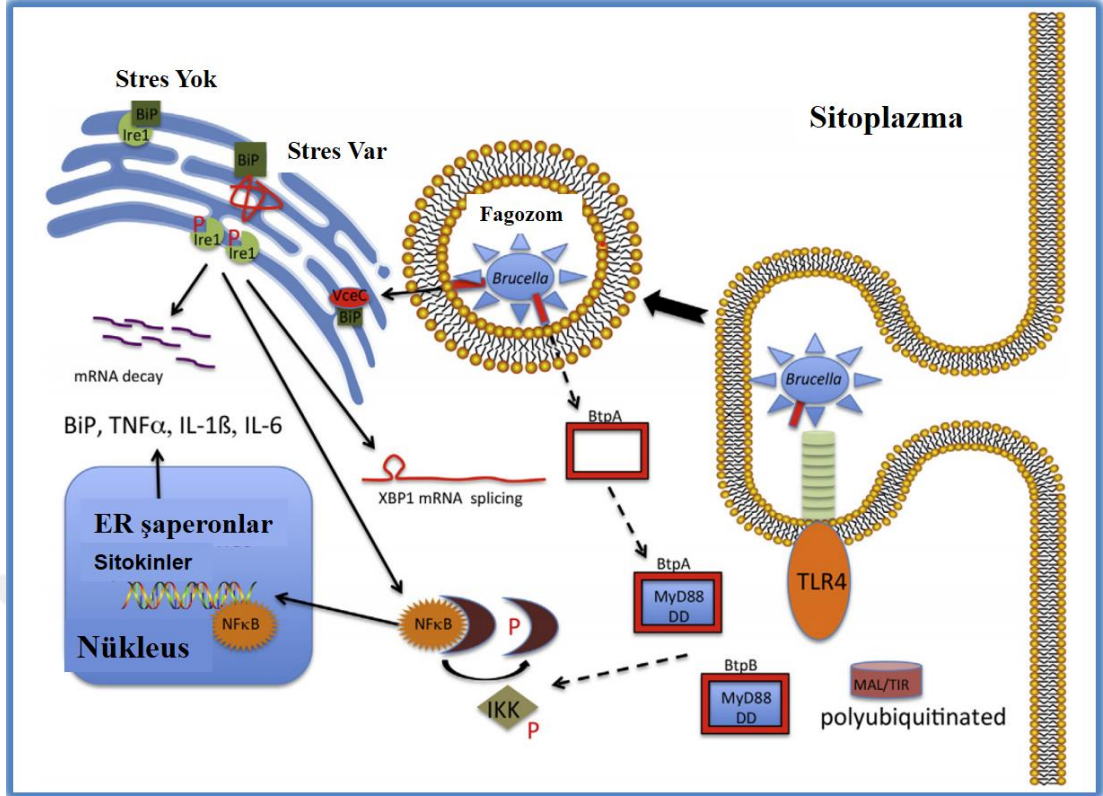
KPY'nin alt tipleri *Brucella*'nın hücre içi yaşam döngüsünde kritik role sahiptir (Delrue ve ark., 2001; Qin ve ark., 2008). Konak fosfotidilinozitol 3-kinaz (PI3K) aktivitesinin *Brucella*'nın hücre içine alımında önemli rol oynadığı ancak uptake sonrası replikasyonda rolü olmadığı gösterilmiştir (Qin ve ark., 2008). Celli ve ark. (Starr ve ark., 2012) *Brucella*'nın otofajik markerleri olan ER kaynaklı BCV'ler içinde replikasyonun olduğu göstermişlerdir. BCV'nin kademeli oluşumu sırasında yapısına Unc-51-like kinase 1 (ULK1), Beclin 1 gibi otofajik proteinler eklenir. Bu otofajik BCV yapısı ATG5 ve LC3b gibi autophagy-elongation proteinlerinden bağımsızdır ve LEMP-1 pozitif, kalretikülin negatif patojen içeren kompartmanlara dönüşür. BCV patojenin hücreden hücreye yayılmasında önemli rolleri vardır (Shaffer ve ark., 2004). Sonuç olarak *Brucella* enfeksiyonu konak makrofajı içinde in vitro ve in vivo olarak XBP1 eklenmesini ve KPY gen ekspresyonunu uyarır. Farmakolojik şaperon olan taurodeoksikolik asit KPY arttırarak *Brucella* replikasyonunu bozar (Smith ve ark., 2013). Tüm bu olaylar birlikte değerlendirildiğinde *Brucella* hücre içinde beslenmesini, çoğalmasını ve hücreden hücreye yayılmasını sağlayan hücre içi çevresini korumak için konak IRE1 α sinyal kaskadını bozar (de Figueiredo ve ark., 2015).

Phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate (PIP3) ve PI3K, Toll/IL-1 receptor (TIR)-domain containing adaptor (TIRAP) proteinlerin plazma membranına bağlanmasını uyarır ve ardından TLR yanıtını başlatır. *Brucella* DH matürasyonunu ve proenflamatuvar yanıtı engellemek için en az iki tane TIRAP eksprese ederek bunu engeller (Chaudhary ve ark., 2012; Kaplan-Türköz ve ark., 2013; Radhakrishnan, Yu, Harms, & Splitter, 2009; Sengupta ve ark., 2010; Smith ve ark., 2013). Detayları tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte TIRAP TcpB veya BtpA ve/veya BtpB varlığında TLR4/TLR2 etkileşimini ve TIRAP degradasyonu ile sonuçlanan TIRAP oluşumu için gerekli olan myeloid differentiation response gene 88 (MyD88) ile yarışır (Sengupta ve ark., 2010). PIP3 bağlanma bölgelerinde TcpB/BtpA ve BtpB bulunması NF- κ B aracılı transkripsiyonu ve efektif proenflamatuvar yanıtın oluşumunu engelleyen inhibisyon ile sonuçlanır.

Brucella'nın gizli doğası hücre membranı üzerinde bulunan büyük bir parça olan düz LPS ile ilişkilidir. Lipit A parçaları üzerinde bulunan uzatılmış yağ asitleri *Brucella* LPS'i TLR4 için zayıf bir uyarı oluşturarak toksisitesinin azalmasını sağlar. Bu durum *Brucella*'ya karşı zayıf bir immün yanıt oluşması ile sonuçlanır. LPS'in O polisakkariti olmayan kaba *Brucella* makrofajlar için sitotoksiktirler. T4SS'nin yokluğunda sitotoksik aktivitenin tamamen eradike edilmesi sitotoksik aktivitede kaba LPS'ye karşı olan immüniteyi ispatlar. O polisakkarit organizmanın gizli yaşam döngüsünde önemlidir ve LPS zayıf bir TLR4 agonistidir. Kaba *Brucella* enfeksiyonlarının aksine düz *Brucella* enfeksiyonların da PI3K aktivitesinde daha sınırlı artış ve daha sınırlı hücre içine giriş varken kaba *Brucella* enfeksiyonlarında daha fazla oranda PI3K aktivitesine artmış ve hücre içine giriş artışının eşlik ettiği gizlilik de azalma vardır (Qin ve ark., 2008). *Brucella* zayıf TLR agonistik etkilerinin yanında doğal immün yanıtı baskılayan immünmodülatör faktörlerde salgılar (Şekil 2).

TIRAP veya *Brucella* TIR protein ve TcpB/BtpA bunlardan bazılarıdır (Smith ve ark., 2013). TLR benzer şekilde TcpB sitoplazmik MyD88 adaptor like/TIRAP ile etkileşime giren bir domain içerir. TcpB bağlanması MyD88'in MyD88 adaptor like/TIRAP bağlanmasını engeller. Bunun sonucunda MyD88 adaptor like/TIRAP artışında azalma, TLR yanıtında ve proenflamatuvar sitokin üretiminde bozulma olur (Radhakrishnan ve ark., 2009; Sengupta ve ark., 2010). TcpB MyD88 ile etkileşime geçerek, etkileşim akışlarını ve TLR aracılı aktivasyonu engeller (Chaudhary ve ark., 2012). Delta-TcpB knockout mutantlar ile yapılan çalışmalarda patojenin makrofaj içindeki yaşam sürelerinde değişiklik olmadığı görülmüştür (Smith ve ark., 2013).

TIR yapısal domainler içeren BtpB'nin MyD88 aracılığı ile DH matürasyonunu engellemektedir (Salcedo ve ark., 2013). TLR4^{-/-} /TLR2^{-/-} knockout farelerde yaşayan bakteri sayısında belirgin bir artış olmaz iken MyD88^{-/-} knockout farelerde fazla sayıda yaşayan bakteri olması BtpA/BtpB ve MyD88 arasındaki etkileşimi göstermektedir (Weiss, Takeda, Akira, Zychlinsky, & Moreno, 2005). MyD88 yokluğu TLR aracılı doğal immün sistem yanıtının azalması ile proenflamatuvar yanıtların olumsuz etkilenmesi ile sonuçlanabilir (Calfon ve ark., 2002).



Şekil 2. *Brucella* immünolojisiinde düzenleyici bileşenlerin rolleri (de Figueiredo ve ark., 2015).

2.12. *Brucella* İmmünolojisi

Klasik olarak konak immün yanıtı fonksiyonel olarak doğal veya özgül olmayan ve edinsel veya özgül olan olarak ikiye ayrılır. Doğal immün sistem istilacı patojenlere karşı ilk savunmayı sağlar. Doğal immün sistem deri ve internal epitelyal tabakalar gibi anatomik bariyerleri, çeşitli kemokinler, sitokinler, kompleman sistemi ve opsoninler gibi sekretuar molekülleri ve makrofajlar (nötrofil, monosit/makrofaj, DH) ve doğal T lenfositler (naturel killer (NK), $\gamma\delta$ T hücreler) gibi hücreler yapılarıdır. Diğer taraftan edinsel immün sistem sitotoksikite ve sitokin üretiminden sorumlu T lenfosit ve antikor üretiminden sorumlu B lenfositlerden oluşmaktadır (Parkin, & Cohen, 2001).

Non-spesifik durumlarda PAMP (LPS, peptidoglikan, lipoproteinler, DNA) fagositler üzerinde bulunan patern tanıyıcı reseptör (PRR) aracılığı ile mikrobun fagositozunu kolaylaştırır. Doğal immün sistemin aktive olması ile proenflamatuvar sitokin salınımı artırarak edinsel immün sistem uyarılır (Janeway, & Medzhitov, 2002). Makrofajlar ve DH, ASH olarak görev yaparlar. ASH antijeni fagositte ettikten sonra,

kısa peptitlere dönüştürerek majör doku uyumluluk kompleksi (MHC) sınıf 1 ve 2 molekülleri aracılığı ile sırasıyla CD4⁺ T helper (Th) lenfositlere ve CD8⁺ STL sunarlar. Doğal immün sistemin hücre içi öldürme mekanizmaları ile mikrobiyal yayılma engellenir, antijen özgül T lenfositlerinin aracılığı ile enfeksiyonun tamamen temizlenmesi sağlanır (Janeway, & Medzhitov, 2002; Holland, & Pickett, 1958).

Bruselloz hücre içi bakteriyel enfeksiyonlara karşı immün yanıt araştırmalarında uzun zamandır kullanılmaktadır. İlk defa 1958 yılında *Brucella* türlerinin fare makrofajları içinde toksik etki oluşturmaksızın “sessiz modda” çoğaldıkları, sonrasında da *Brucella*’ya karşı immünitede T lenfositler ile makrofajlar arasında önemli bir etkileşim olduğu gösterilmiştir (Holland, & Pickett, 1958; Mackaness, 1964). İki dekat sonra Th1/Th2 tanımlanması konusunda interferon- γ (IFN- γ) üretimi ile ilgili çalışmada bruselloz tekrar model olarak kullanılmıştır (Mosmann, Cherwinski, Bond, Giedlin, & Coffman, 1986). Sonrasında hücresel immünite ile Th1 sitokinlerinin [IFN- γ , tümör nekrozis faktör (TNF)] arasındaki önemli ilişki sadece fare modellerinde değil doğal konaklarında ve insanlarda da gösterilmiştir (Grilló, Blasco, Gorvel, Moriyón, & Moreno, 2012; Skendros, Pappas, & Boura, 2011; Wyckoff, & Potts, 2007).

Konak immün sistemi ile *Brucella* arasındaki bu etkileşim ya patojenin eradikasyonu ile ya da parazitin hücre içi çoğalması ve kronik hastalık gelişimi ile sonuçlanacaktır. Bruselloza karşı konak savunması esas olarak profesyonel ASH, Th1 hücreler CD8⁺ STL içeren hücre aracılı immüniteye bağlıdır. Buna karşın *Brucella* doğal ve edinsel immün yanıtı kaçıran uzun süreli yaşamak ve çoğalmak için çeşitli stratejiler geliştirmektedir (Baldwin, & Goenka, 2006; Bagues, Dudal, Dornand, & Gross, 2005; Martirosyan, Moreno, & Gorvel, 2011)

2.12.1. Doğal İmmün Sistem ve *Brucella*

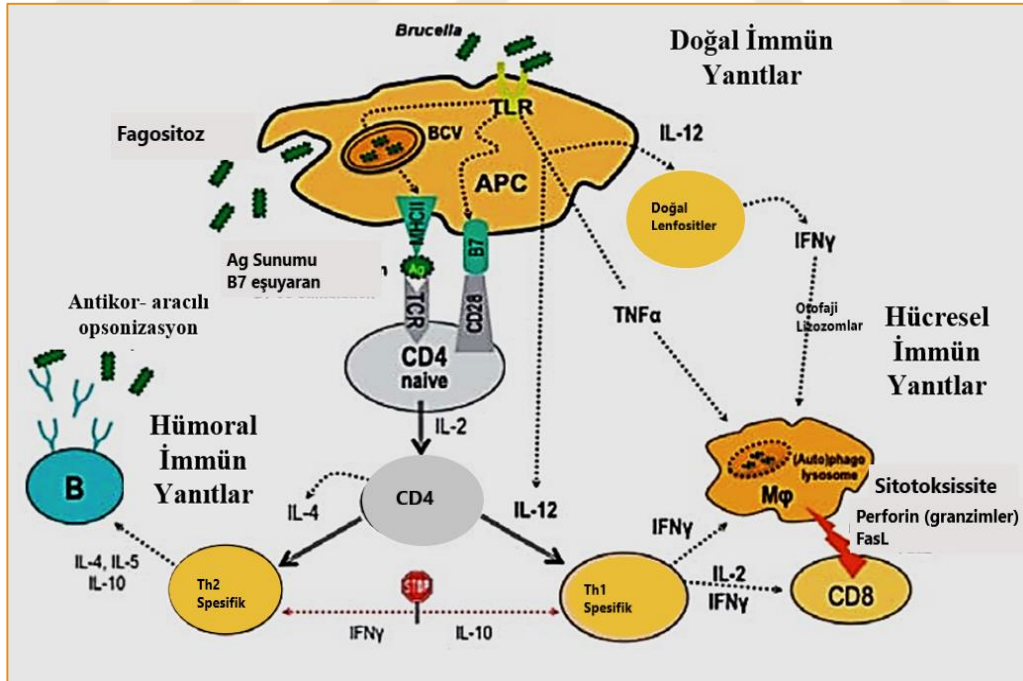
2.12.1.1. Makrofajlar ve Dendritik Hücreler

Makrofajlar ve DH *Brucella* gibi hücre içi bakterilerin tanınmasında ve güçlü bir edinsel immün yanıt oluşturulmasında temel rol oynarlar. *Brucella* ve bu hücreler arasında iki yönlü bir ilişki bulunmaktadır. Her iki hücre tipi hücresel immün yanıtı kurtulmak isteyen bakterilere karşı indüklenebilir mekanizmalara sahiptirler. *Brucella* kronik enfeksiyon oluşturabilmek için makrofaj ve DH antijen sunumunu ve

antimikrobiyal aktivitelerini engelleyen virölans faktörleri veya PAMP ortaya koyarlar (Baldwin, & Goenka, 2006; Bagues ve ark., 2005; Martirosyan ve ark., 2011; Skendros ve ark., 2011; Velásquez ve ark., 2012). *Brucella* bu sinsi strateji sayesinde ASH üzerinde düşük düzeyde uyarıcı etki ve toksisite göstererek Th1 yanıtları oluşmadan önce hücre içinde yaşamak ve çoğalmak için bir fırsat sağlarlar (Skendros, Boura, Kamaria, & Raptopoulou-Gigi, 2006).

Brucella fagositozu kolaylaştıran FcR, C3bR, scavenger receptors (SR) gibi reseptörler aracılığı ile fermuar benzeri fagositoz ile hücre içine alınır. Makrofajlar ve DH tarafından hücre içine alındıktan sonra bakterilerin %90'dan fazlası birkaç saat içinde öldürülür. Ancak bazı bakteriler yaşar ve çoğalmaya başlarlar (Martirosyan ve ark., 2011; Rittig, Alvarez-Martinez, Porte, Liautard, & Rouot, 2001; Watarai, Makino, Fujii, Okamoto, & Shirahata, 2002).

Brucella yaşamayı sağladıktan sonra endositik yol trafiğini yönlendirerek BCV olarak adlandırılan ER kaynaklı oluşumunu meydana getirir (Şekil 3). *Brucella* içeren endozom, lizozom ile füzyondan kaçarak ER membranı ile füzyon yapmak üzere ER taşınır (Celli ve ark., 2003; Salcedo ve ark., 2008).



Şekil 3. *Brucella*'ya karşı immün yanıt (Skendros, & Boura, 2013).

Otofaji dinamik homeostatik bir süreçtir. Otofagozom olarak adlandırılan çift membranlı veziküllerin lizozomlar aracılığı ile yok edilmesidir. Otofagolizozomlarda hidrolitik degradasyon yolu ile doğal immün sistem tarafından hücre içi patojenlerin yok edilmesi yani otofaji en önemli mekanizmadır (Kuballa, Nolte, Castoreno, & Xavier, 2012; Skendros, & Mitroulis, 2012). Patojenin ASH tarafından hücre içine alınmasından sonra TLR sinyalleri ve Th1 tarafından salgılanan IFN- γ otofaji mekanizmaları için en önemli uyarıcılardır (Skendros, & Mitroulis, 2012). Ancak son dönemde yapılan fare makrofaj çalışmaları *B. abortus* ve *B. melitensis*'in otofaji mekanizmalarını kendi avantajlarına kullandıklarını göstermiştir. Özellikle *B. abortus* hücre içindeki yaşam döngüsünü tamamlamak ve hücreden hücreye yayılmak için otofajinin yapısal özelliklerini içeren BCV ihtiyaç duyarlar (Thornes, Early, Hogan, & Reen, 1982). Otofajinin farmakolojik olarak inhibe edilmesi ile *B. melitensis*'in hücre içi çoğalmasının büyük ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Skendros, Sarantopoulos, Tselios, & Boura, 2008).

TLR'ler tarafından patojenlerin tanınması ve sinyal oluşturulması ASH'lerin aktivasyonu ve edinsel immün sistemin aktive olması için temel olaydır (**Şekil 3**).

TLR LPS, lipoproteinleri, nükleik asitleri içeren geniş bir yelpazedeki PAMP'ları tespit etmekte ve NF- κ B, aktivatör protein (AP)-1 ve interferon düzenleyici faktör (IRF)3/IRF7 gibi temel transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunda temel rol almaktadır. TLR TNF- α , interlökin (IL-12), IL-6, IL-1 β , tip-I IFN'lar gibi birçok proenflamatuvar sitokinlerin salınımını ve CD80, CD86 gibi kostimulatör proteinlerin ekspresyonunu arttırarak doğal ve edinsel immün sistem arasında bir köprü görevi üstlenmektedir (Iwasaki, & Medzhitov, 2004). *B. abortus* ve *B. melitensis* enfeksiyonlarında konak direncinde en önemli mekanizmanın TLR9 beraberinde MyD88 adaptör proteini olduğu tespit edilmiştir. Hücre içinde endozomal kompartımanlarda üretilen TLR9 bakteriyel DNA'ları tanıyarak Th1 yanıtını yönlendiren IL-12 salınımını sağlamaktadır (Huang, Ishii, Akira, Aliberti, & Golding, 2005; Macedo ve ark., 2008). TLR dışında diğer NOD benzeri reseptörler (NLR) gibi PRR'ler de hücre içi bakterilere karşı önemli rollere sahiptirler (Sérgio. Oliveira, de Almeida, Carvalho, Oliveira, & Lacerda, 2012).

Brucella'nın doğal immün sistem tarafından tanınması için çok sayıda PAMP bulunmaktadır. Bunların içinde en çok çalışılan ve en iyi bilineni LPS'dir. *Escherichia*

coli'nin endotoksini ile kıyaslandığında Br-LPS tipik endotoksin özellikleri göstermemektedir. Br-LPS *Brucella*'nın hücre içinde yaşaması ve çoğalması için en önemli immünmodülatör role sahiptir (Cardoso, Macedo, Azevedo, & Oliveira, 2006; Conde-Álvarez ve ark., 2012). Br-LPS brusellozun yaşam döngüsünde benzersiz ikili role sahiptir. Enfeksiyonun erken döneminde düşük immünmodülatör aktivite göstererek doğal immün sistemden kaçarken enfeksiyonun geç döneminde doğal immün sistemi negatif yönde düzenleyerek patojeni korur ve hastalığın kronikleşmesini sağlar (Skendros, & Boura, 2013).

2.12.1.2. Nötrofiller

Nötrofiller doğal immün sistemde önemli bir role sahiptirler ve enflamasyon bölgesinde çok büyük sayılarda bulunurlar. Nötrofiller mikropları hücre içine aldıktan sonra antimikrobiyal granülomların fagozom ile birleşmesi ile öldürürler. Ayrıca patojenleri öldürmek için reaktif oksijen radikalleri üretirler ve litik enzimlerde salgırlar. *B. abortus*'un in vitro ortamda nötrofilleri aktive ettikleri ve yaşam sürelerini uzattıkları gösterilmiştir. Bu etki doğal immün yanıtın lipitle zenginleştirilmiş dış membranın (L-Omp)19 proenflamatuvar rolü ile olmaktadır (Giambartolomei, Scian, Acosta-Rodríguez, Fossati, & Delpino, 2012). *Brucella* nötrofil içinde öldürülmeye dirençli olmakla birlikte nötrofil içinde çoğalamamaktadır (Barquero-Calvo ve ark., 2007; Kreutzer, Dreyfus, & Robertson, 1979).

2.12.1.3. Diğer T Lenfosit Alt Grupları ve Doğal Öldürücü Hücreler

Diğer T lenfosit alt grupları doğal ve edinsel immünite arasında ara yüz oluşturan doğal öldürücü (NK) T hücrelerinden ve $\gamma\delta$ T hücrelerinden oluşmaktadır. Klasik antijen spesifik T hücreleri ($\alpha\beta$ TCR CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositler) ile kıyaslandığında periferik kanda çok az miktarda bulunurlar ve MHC sınırlandırılması olmaksızın non-peptit antijenleri (glikolipid ve fosfolipid) tanıyabilmektedirler. Birçok çalışmada hücre içi patojenlere karşı spesifik Th1 yanıtı oluşuncaya kadar enfeksiyonun erken döneminde bu hücrelerin hızlı ve erken bir şekilde IFN- γ üretimi sağladıkları gösterilmiştir (Şekil 3) (Dieli ve ark., 2003; Kubota, 2010; Nyirenda, Seeley, Mandala, Drayson, & MacLennan, 2010; Sada-Ovalle, Chiba, Gonzales, Brenner, & Behar, 2008).

$\gamma\delta$ T lenfositler fare, insan ve sığır brusellozunun erken döneminde koruyucu role sahiptir (Bertotto ve ark., 1993; Kilic, Akbulut, Ozden, & Bulut, 2009; Skyberg ve ark., 2011). İnsanlarda enfeksiyonun erken döneminde *Brucella* fosfoantijenleri $\gamma\delta$ T lenfositlerini aktive eder (Bertotto ve ark., 1993). Brusellozun erken döneminde $\gamma\delta$ T lenfositleri artış gösterirken tedavi ile azalmaktadır (Kilic ve ark., 2009). $\gamma\delta$ T lenfositler makrofaj içindeki *Brucella* 'ların üremesini temassız ve temassız yollar ile inhibe etmektedir. Bunu granül ve Fas-ligand aracılı sitotoksikite, makrofaj aktivasyonu, IFN- γ üretimi ile bakterisidal aktivite ve granülizin ve katelisidin gibi bakterisidal faktörler salınımı ile yaparlar (Dudal ve ark., 2006; Oliaro ve ark., 2005; Ottone, Dornand, Naroeni, Liautard, & Favero, 2000). Ayrıca V γ 9V δ 2 T hücrelerinin NKG2D reseptör üzerine uyarıcı etkisi olduğunu göstermiştir (Bessoles, Ni, Garcia-Jimenez, Sanchez, & Lafont, 2011).

NK hücrelerinin IFN- γ salınımı ve sitotoksik etki ile anti-*Brucella* etkileri bulunmaktadır (Bessoles, Dudal, Besra, Sanchez, & Lafont, 2009; Dornand ve ark., 2004). Isıtma yöntemi ile öldürülen *B. abortus* ile aşılanan farelerde NK hücrelerinin B hücrelerinden poliklonal antikörler üretimini indüklediği gösterilmiştir (Gao, Jennings, Guo, & Yuan, 2011). İnsanlarda periferik kan mononükleer hücrelerinde (PKMH) akut bruselloz sırasında geçici NK sitotoksitesinde bozukluk olduğu ancak tedavi ile normale geldiği gösterilmiştir. Bu durum bruselloz gelişimine NK hücre etkinliğinin önemli olduğunu göstermektedir (Salmerón ve ark., 1992).

2.12.2. Brusellozda Edinsel İmmün Yanıt

2.12.2.1. Spesifik T Hücre Yanıtı

Edinsel immün sistem bakteriyi eradike etmek ve konağı korumak için antijene özgül yanıt oluşturmak ve devam ettirmek için aktive olur. Brusellozda Th1 hücre yanıtını araştıran çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Bir çalışmada IFN- γ , IRF1 ve IL-12 gibi Th1 elementlerinin bruselloza duyarlı farelerde eksik olduğu bulunmuştur (Brandão ve ark., 2012; Martirosyan ve ark., 2011). Bir başka çalışmada IFN- γ ve IL-12 gibi Th1 ile ilişkili sitokinlerin farelere verilmesinin bruselloza karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Martirosyan ve ark., 2011). İn vitro ortamda çeşitli *Brucella* antijenleri ile uyarılan fare splenositleri ve CD4⁺ T hücrelerinin, sığır CD4⁺ T lenfositlerinin insan PKMH ve T hücrelerinden baskın olarak IFN- γ salgılatığı tespit

edilmiştir (Fernandes, Jiang, Jung, & Baldwin, 1996; Giambartolomei ve ark., 2002; Oliveira, & Splitter, 1995; Rafiei ve ark., 2006; Weynants ve ark., 1998; Zaitseva ve ark., 1995; Zhan, Kelso, & Cheers, 1995). Bir diğer çalışmada Th1 yanıtında azalma ile relaps/kronik vakalar arasında korelasyon olduğu bulunmuştur (Akbulut, Kilic, Bulut, & Ozden, 2005; Giambartolomei ve ark., 2002; Rafiei ve ark., 2006; Rodríguez-Zapata ve ark., 2010). İnsan genetik çalışmalarında hastalık duyarlılığı ile Th1 yanıtında görevli olan moleküllerde mutasyonlar ve polimorfizmler olduğu gösterilmiştir (Skendros ve ark., 2011).

2.12.2.2. B Lenfositler ve *Brucella* Enfeksiyonu

B lenfositler antijene özgül antikor üretimini sağlayan edinsel immünitinin hümorale kısmını yönetmektedirler (Şekil 3). Nötralizan etkilerinin yanında antikorlar mikropların ASH tarafından fagositozunu kolaylaştıran opsonin olarak görev yapar, komplemanı aktive eder, makrofaj, nötrofil ve NK hücrelerinin antikor aracılı sitotoksitesinde görev alırlar. B hücreler belli durumlarda ASH gibi görev yaparak edinsel immün yanıtın aktive olmasını sağlarlar (Baldwin, & Goenka, 2006).

Hücre içi bakterilere karşı hümorale immünitinin rolü sınırlıdır ve koruyucu değildir. Antikorlar tarafından opsonizasyon bakterilerin fagositler tarafından hücre içine alımını kolaylaştırır, başlangıçta enfeksiyonu bir miktar sınırlar. Ancak *Brucella*'nın hücre içi döngüsünde çok az etkinliği vardır (Baldwin, & Goenka, 2006; Bellaire, Roop, & Cardelli, 2005). Br-LPS karşı gelişen antikorlar bruselloz tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır (Al Dahouk, Tomaso, Nöckler, Neubauer, & Frangoulidis, 2003).

Çalışmalarda B hücrelerinin brusellozda düzenleyici rolü olduğu gösterilmiştir. Enfeksiyonun erken fazında B hücreleri IFN- γ aracılı Th1 yanıtını azaltan ve enfeksiyonun persistan hale gelmesini sağlayan IL-10 ve Transform edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) salgılamaktadır. B hücrelerin yokluğunda *Brucella*'ya karşı antikorlar bağımsız direnç çok daha belirgindir (Goenka, Parent, Elzer, & Baldwin, 2011). Opsonize edilmiş *B. abortus*'un esas olarak B hücrelerini enfekte etmesi ve hücre içinde yaşaması, yine *B. abortus*'un çok miktarda IL-10 salınımına yol açan çok güçlü B hücre mitojeni olan virülans faktör proline racemase protein A (PrpA)

eksprese etmesi B hücrelerinin düzenleyici rolünü göstermektedir (Radhika Goenka, Guirnalda, Black, & Baldwin, 2012; Spera, Ugalde, Mucci, Comerci, & Ugalde, 2006).

2.12.2.3. Sitokinler

Sitokinler *Brucella*'ya karşı doğal ve edinsel immün yanıtta anahtar rol oynarlar. B hücrelerden ve makrofajlardan salınan IL-12, Th1 yanıtını sağlarken aktive olmuş makrofajlardan IFN- γ salınımını sağlarlar. Makrofaj ve NK hücreler tarafından salgılanan TNF- α , IFN- γ etkinliğini maksimum seviyeye ulaştırır. IL-1 bağımlı koloni stimüle edici faktörün nötrofil ve makrofajların dalağa birikmesini sağlar (Doyle, Halliday, Barnett, Dunn, & Hume, 1992). Bu durum T hücrelerden salgılanan IL-6 ile açıklanabilmektedir. Enfekte hastaların splenositleri Th1 yanıtını artırmak için IL-2, IFN- γ ve IL-10 üretimi için yüksek seviyede mRNA eksprese ederken IL-4 üretimi için düşük seviyede mRNA eksprese etmektedirler (Doyle ve ark., 1992; Zaitseva ve ark., 1995). Enfeksiyonun geç döneminde artış gösteren IL-10, Th1 yanıtını azaltarak *Brucella*'nın immün gözetimden kaçmasına katkıda bulunur (Svetić, Jian, Lu, Finkelman, & Gause, 1993).

2.13. Kronik Brusellozlu Vakalarda *Brucella* Anerjisi

Brusellozlu vakaların %10-30 kadarında atipik klinik seyir, fokal tutulum gibi çok sayıda komplikasyonlar, kronik yorgunluk sendromu ve relaps ile karakterize kronik hastalık tablosu gelişir (Skendros ve ark., 2006; Spera ve ark., 2006). Kronik bruselloz vakalarında *Brucella*'nın konak immün yanıtını düzenlemesi sonucu meydana gelen defektif Th1 yanıtı ve T hücre anejisi vardır (Elfaki, & Al-Hokail, 2009; Giambartolomei ve ark., 2002; Kinikli, Turkcapar, Kucukay, Keskin, & Kinikli, 2005; Rafiei ve ark., 2006; Skendros ve ark., 2006, 2008). Klinik çalışmalarda hastalık özgül ve özgül olmayan antijenlere karşı migrasyon ve fagositoz bozukluğu olduğu, bakteriyel antijenlere karşı deri reaktivitesinin azaldığı, lenfosit ve monositlerin apoptozuna karşı uzamış direnç geliştiği, mitojenlere veya *Brucella* antijenlerine karşı lenfositlerin düşük proliferasyon gösterdiği, serumda TGF- β 1 artarken PKMH'den salınan Th1 sitokinlerinde (IFN- γ , IL-2) azalma olduğu, CD69⁺ erken aktive olan T lenfositlerin azaldığı ve sitotoksik T lenfosit oranının arttığı gösterilmiştir (Skendros ve ark., 2011).

Akut bruseloz vakaları ile kıyaslandığında relaps kronik bruselozlu vakalarda IL-2 alfa reseptör (CD25) eksprese eden CD4⁺ T lenfosit oranlarında azalma olduğu, PKMH hücrelerinin mitojen ve *E. coli* LPS ile uyarıldıklarında dahi bu etkinin devam ettiği gösterilmiştir (Skendros ve ark., 2008; Spera ve ark., 2006). IL-2, antijen ile uyarılmış T lenfositleri için büyüme faktörüdür ve Th1 klonal çoğalması için kritiktir. T hücre reseptör (TCR) sinyalinin güçlenmesi için ASH ile T hücreleri arasında CD28/CD80 kostimülasyonu gerekir.

Akut enfeksiyon ile kıyaslandığında kronik bruselozlu hastalarda *E. coli* LPS ve mitojen ile uyarılmış PKMH CD4⁺/CD28⁺ T oranında azalma vardır. Ayrıca ısıtma ile öldürülmüş *Brucella* hücreleri (heat-killed *B.abortus*) (HKBA) ile uyarılmış PKMH CD80⁺ monositlerde doz bağımlı önemli bir azalma vardır (Skendros ve ark., 2006, 2008). HKBA ile yapılan tam kan kültürlerinde IFN- γ eksprese eden T lenfositlerde azalma olurken CD3⁺/ IL-13⁺ T hücrelerde artma gözlenmiştir (Th2 değişimi) (Rafiei ve ark., 2006).

İnsan primer hücreleri ve HKBA kültüründe *Brucella* PAMP'larının immünesüpresif etkisi görülmüştür. Bu durumlar kronikleşmeyi açıklamaya katkıda bulunabilir.

2.14. Yeni Markerler

2.14.1. Human ABI Gene Family Member 3 (ABI3)

Abl interactor (ABI) ailesi proteinlerinin memelilerde aktin hücre iskeletini düzenlemek ile görevli olduğu bilinmektedir. Memeli hücreleri üç çeşit ABI proteinine (ABI-1, ABI-2, ve ABI-3) sahiptir. Human ABI Gene Family Member 3 (ABI3) yeni izole edilen Src homology 3 (SH3) domaine sahip bir gendir (Miyazaki ve ark., 2000). Aminoasit dizilişindeki benzerlik nedeniyle daha sonra ABI ailesine eklenmiştir. Her üç Abi protein büyük ölçüde aynı domain yapısına sahiptir (Ichigotani, Fujii, Hamaguchi, & Matsuda, 2002).

Çalışmalarda ABI protein ailesinin aktin dinamiklerinin düzenlemesinde önemli olduğu gösterilmiştir (Hossain, Dubielecka, Sikorski, Birge, & Kotula, 2012). ABI-1 ve ABI-2 özellikle Rac GTP'aze cevap olarak aktin ağlarının oluşumunda ve aktin ligamentlerinin oluşumunu düzenleyen makro molekül olan WAVE kompleksi içinde yer almaktadır (Eden, Rohatgi, Podtelejnikov, Mann, & Kirschner, 2002; Innocenti ve

ark., 2004). ABI-1 ve ABI-2 cAbl aracılı sinyal transdüksiyonu ve hücrelerin reorganizasyonunda fonksiyon görmektedirler (Hossain ve ark., 2012).

ABI3 timüs ve dalak dokularında bol miktarda bulunmaktadır (Hirao ve ark., 2006). ABI3 çok sayıda kan hücresi tarafından da eksprese edilmektedir. Bu hücreler aktin bazlı hücre iskelet sistem organizasyonunu devam ettirmek için WAVE2 kompleksine ihtiyaç duyar. ABI3 bu kompleksin yapısında yer almaktadır. Makrofajlar ve epitelyal hücreler podozomlar üretmektedir. ABI3 muhtemelen bu hücrelerdeki podozomların yapısına katılmaktadır (Sekino ve ark., 2015). Sıçan hipokampuslerinde ABI3'ün direkt olarak F-aktine bağlandığı ve DH çıkıntılarının ve sinaps yapısını düzenlediği gösterilmiştir (Bae, Sung, Cho, Kim, & Song, 2012; Bae, Sung, Cho, & Song, 2012).

ABI-1 ve ABI-2 bilinen fonksiyonlarına karşın ABI3 protein fonksiyonları tam olarak anlaşılamamıştır (Sekino ve ark., 2015). ABI3'ün ABI-1 ve ABI-2 gibi WAVE2 kompleksinin yapısına katılır. Ancak ne c-abl'ye bağlanır nede WAVE2 kompleksinin c-abl aracılı fosforilasyonuna katılmaktadır. Çalışmalarda WAVE2 kompleksine katılan ABI3'ün ABI-1 ve ABI-2 WAVE2 kompleksinden farklı fonksiyonları gösterilmiştir. Bu farklı fonksiyonlardan biri v-Src eksprese eden hücrelerde hücre membran protrüzyonunun yapısına katılmaktır (Sekino ve ark., 2015).

Metastatik hücrelerde aşırı miktarda ABI3 ekspresyonunun hücre motilitesini ve metastaz potansiyelini azalttığı gösterilmiştir (Ichigotani, Yokozaki, Fukuda, Hamaguchi, & Matsuda, 2002). Bir ABL inhibitörü olan imatinib mesylate varlığında ABI3 ekspresyonunun metastazı süprese ettiği görülmüştür (Matsuda ve ark., 2008).

2.14.2. Human C-Type Lectin Domain Family 12, Member B (CLEC12B)

C tip lektin olarak bilinen karbonhidrat bağlayan protein domainlerinden biridir. C tip olarak adlandırılması bağlanma için kalsiyum gerekliliğindendir (Zelensky, & Gready, 2005).

C tip lektin domaini içeren proteinlerin hücre-hücre adezyonu, patojenlere immün yanıt ve apoptoz gibi fonksiyonları bulunmaktadır (Cambi, & Figdor, 2009; Drickamer, 1999). C tip lektinler protein domainlerindeki çeşitlilik temel alınarak 17 alt gruba ayrılmıştır (Zelensky, & Gready, 2005).

İmmün sistemin aşırı aktive olarak zararlı etkilerinin ortaya çıkması engellenmelidir. Bu immün regülasyonun sağlanmasında C tip lektin ailesinin önemli rolü vardır. Myeloid hücreler üzerinde bulunan human c-type lectin domain family 12, member b (CLEC12B) inhibitör reseptörler olarak görev yaparlar. CLEC12B'in hücre dışı domaini NK hücrelerinin NKG2D reseptörleri ile homolog yapıdadır. Ancak CLEC12B'in hücre içi domaini immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) içerir. CLEC12B NKG2D'nin ligandlarına bağlanmaz üstelik NKG2D'nin inhibitör karşılığı da değildir. Ancak CLEC12B, NKG2D aracılı sinyal gibi davranma yeteneğine sahiptir. CLEC12B'nin hücre içinde herhangi bir fonksiyonu yoktur. Sadece plazma membranı üzerindeki belli reseptörlere bağlanarak hücrel fonksiyonları engeller. CLEC12B mRNA tüm dokulardan eksprese edilmektedir. İn vitro deneylerde makrofajların CLEC12B eksprese ettikleri gösterilmiş olmakla birlikte DH'in CLEC12B eksprese ettikleri gösterilememiştir (Hoffmann ve ark., 2007).

2.14.3. Human DNA Damage Inducible Transcript 4 Like (DDIT4L)

DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4) protein, aynı zamanda regulated in development and DNA damage response 1 (REDD1) olarak da bilinir. İnsanlarda DDIT4 geni tarafından kodlanmaktadır (Shoshani ve ark., 2002). DDIT4L, hücre büyümesi, çoğalması, motilitesi, hücrenin yaşam döngüsü, protein sentezi, otofaji ve transkripsiyon düzenleyen serine/threonine protein kinase gibi fonksiyon gören The Mammalian Target of Rapamycin'i (mTOR) negatif düzenlemek suretiyle fonksiyon görmektedir (Sofer, Lei, Johannessen, & Ellisen, 2005).

Özellikle hipoksi durumlarında upregüle olan DDIT4, mTOR'un negatif düzenlenmesiyle sonuçlanır. Hipoksi durumlarına ek olarak DNA hasarlanması ve hücrenin enerji stresi içinde olması durumunda da DDIT4L aktive olmaktadır (Ellisen ve ark., 2002).

Klinik olarak DDIT4L'un mTOR üzerinden yaşlanma ile ilgili etkileri bulunmaktadır. Tüberoskleroz, lenfanjiomyomatoz, diyabet ve kanser ile ilişkilendirmiştir (Sarbassov, Ali, & Sabatini, 2005). Diyabet tedavisinde kullanılan metforminin DDIT4L ekspresyonunu arttırmak suretiyle kanser riskini azalttığıının gösterilmesinden sonra DDIT4L dikkatleri üzerine çekmeye başlamıştır (Ben Sahra ve

ark., 2011). mTOR'u hedef alan birçok ilaç kanser ve otoimmün hastalık tedavisinde kullanılmaktadır. mTOR T hücre farklılaşmasında, B hücrelerinin gelişimi ve farklılaşmasında, nötrofil, mast hücresi ve DH migrasyonu ve bu hücrelerin sitokin üretimi için gereklidir (Eiden, Zhang, Gary, Simmons, & Mock, 2016).

mTOR'un DDIT4L tarafından negatif regüle edilmesi tüm bakteriyel enfeksiyonlara olduğu gibi bruselloza yatkınlığı arttıracaktır.

2.14.4. Human Zinc Finger Protein 1 (ZFP1)

Zinc finger protein (ZFP) en büyük DNA bağlayıcı protein ailesidir ve çok geniş moleküler fonksiyonları vardır. Zinc finger domainleri DNA, RNA, poly-ADP-ribose (PAR) ve diğer proteinlerle etkileşime girmektedir. ZFP'ler birçok hücrel düzenleyici süreçte görev almaktadır. ZFP'ler, transkripsiyonel düzenleme, ubiquitin aracılı protein degradasyonu, sinyal transdüksiyonu, DNA tamiri, hücre migrasyonu ve çok sayıda hücrel fonksiyonda görevlidir. Çinko iyonu sistein ve histidin ile çeşitli kombinasyonlar yaparak ZFP'lerin yapısını oluştururlar. C2H2, RING, PHD ve LIM olmak üzere dört farklı ZFP domain yapısı bulunmaktadır. Klasik C2H2 zinc-finger proteinler, bir zincir üzerindeki iki histidin ve diğer zincir üzerindeki iki sistein ve bir çinko iyonu ile koordine edilir (Cassandri ve ark., 2017).

Çoğu ZFP'ler çok sayıda ve farklı yapıda ZP domaini içerir. ZFP'lerin çok farklı hücrel fonksiyonları vardır. Hücrelerin farklı kompartımanlarında yerleşmişlerdir.

ZFP'ler göreceli olarak küçük protein motifleridir, parmak şeklinde çıkıntılara sahiptir ve parmak çıkıntılar ile hedef moleküllerine bağlanırlar. Bu domainler çinko iyonuna bağlıdır, ancak demir gibi farklı metallere de bağlanabilir veya hiçbir metale bağlanmayabilirler. İlk defa DNA moleküllerine bağlandıkları gösterilmiş olmakla birlikte DNA, RNA, protein ve lipid substratlara bağlandığı da gösterilmiştir.

Bağlanma çeşitlilikleri aminoasit sekanslarındaki çeşitliliğe bağlıdır. ZFP domainleri çoğunlukla kümeler halinde bulunur ve farklı bağlanma özgüllüklerine sahiptirler. ZFP protein motifleri sekans ve yapıları çok çeşitli olan birbirinden çok farklı proteinlerde bulunabilmektedir. ZFP domainleri aynı grup içinde (DNA, protein vs.) farklı bağlanma özelliklerine sahiptir ve bu farklı yapılar fonksiyon çeşitliliği sağlamaktadır. Gen transkripsiyonu, mRNA trafiği, hücre yapısı, epitelyal gelişim, hücre adezyonu, protein katlanması, kromatin yeniden yapılanması bu fonksiyondan

bazılarıdır (Laity, Lee, & Wright, 2001). ZFP motifleri oldukça stabil moleküllerdir ve hedef moleküllere bağlandıktan sonra nadiren yapısal değişiklik gösterirler. ZFP yapısı temel olarak çinko iyonu ile birlikte histidin ve sistein rezidülerinden oluşmaktadır. Bu rezidülerin sayısı ve sırasına göre ZFP sınıflandırılması yapılmaktadır. Son dönemlerde daha metodolojik bir yöntem kullanılarak ZFP proteinleri katlanma bölgesindeki protein motiflerine göre yapılmaktadır (Krishna, Majumdar, & Grishin, 2003).

ZFP içinde Cys₂His₂-like fold group (C2H2) en iyi karakterize edilen memeli transkripsiyon faktörüdür. Bunun yanında çok sayıda ve farklı fonksiyonu olan ZFP bulunmaktadır. ZFP histidin, sistein ve çinko iyon konsantrasyonlarına göre en az dokuz grupta kategorize edilmektedir. Çoğu ZFP protein sadece tek tip zinc finger yapısı içermektedir (Li & Liu, 2020).

2.14.5. Human Protein Inhibitor of Activated STAT4 (PIAS4)

Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) (Chung ve ark.), E3 small ubiquitin-like modifier (SUMO) -protein ligase PIAS ve protein inhibitor of activated STAT protein gamma (PIASg or PIASy) olarak da bilinmektedir. PIAS4 bir enzimdir ve PIAS4 geni tarafından kodlanmaktadır (Liu ve ark., 1998).

İlk olarak 1997 yılında PIAS3 bulunmuştur. PIAS, JAK-STAT yolu araştırılmaları sırasında keşfedilmiştir (Chung ve ark., 1997). PIAS proteinleri STAT inhibe etme özelliklerine göre adlandırılmıştır. PIAS1 STAT1'i, PIAS2 STAT2'yi inhibe eder. Ancak sonrasında PIAS proteinlerin sadece basit bir şekilde STAT inhibe etmesinin yanında SUMO proteinler ile olan ilişkisi anlaşıncaya isimlendirme "Pleiotropic Interactors Associated with SUMO" tümcesinin kısaltılmış hali olan PIAS olarak belirlenmiştir (Rytinki, Kaikkonen, Pehkonen, Jääskeläinen, & Palvimo, 2009).

Ubikitin yolunun aksine hücre proteinlerin SUMOylation'u E3 ligaz olan PIAS proteinleri ile yapılmaktadır. Bu proteinler IFN yolu üzerinden doğal immün yanıtı baskılama yönünde hareket ederler. Ancak bunun yanında polimorfonükleer lökosit stabilitesi, transkripsiyon, DNA tamiri, NF-κB regülasyonu, hücre döngüsü ve

hücre yaşlanması gibi birçok hücreyel olayda görev aldığı anlaşılmıştır (Conn ve ark., 2016).

PIAS proteinleri transkripsiyonel ko-regülatör olarak gen ekspresyonlarının kontrolünde görev almaktadırlar. PIAS proteinleri E3 SUMO-protein ligaz gibi davranarak transkripsiyonla ilişkili altmıştan fazla protein ile etkileşime girmektedir (Sharrocks, 2006). Bir SUMO proteininin hedefine bağlanması PIAS ile transkripsiyon faktör arasında protein-protein etkileşimini başlatır. Bu transkripsiyon aktivasyon veya inhibisyon şeklinde ortaya çıkabilir (Rytinki ve ark., 2009).

STAT4, STAT ailesine ait bir transkripsiyon faktörüdür. Naif CD4⁺ T hücrelerini Th1 dönüşümü ve IL2'ye IFN- γ yanıtının oluşması için gereklidir. PIAS4, STAT4 ekspresyonunu baskılamak suretiyle immün baskılayıcı bir durum ortaya çıkarmaktadır (Bacon ve ark., 1995; Kaplan, 2005).

Ubiquitin yolağının aksine SUMOylation PIAS-4 protein ailesi ile düzenlenmektedir. Bu ligazlar enfeksiyonun başlangıcında IFN yolağındaki anahtar düzenleyicileri baskılayarak doğal immün sistemi negatif yönde düzenlerler (Conn ve ark., 2016).

2.14.6. Human Protein Phosphatase 2A Activator Regulatory Subunit 4 (PPP2R4)

PP2A olarak bilinen protein fosfataz 2A (PP2A) enzimi PPP2CA geni tarafından kodlanır. PP2A hücre büyümesinde, hücre döngüsünde, DNA replikasyonunda, transkripsiyon ve translasyonda, hücre çoğalması ve apoptozda, sinyal transdüksiyonunda, hücre mobilitesi ve hücre iskeleti dinamiklerinde etkin rol oynadığı bulunmuştur. Bu etkileri sayesinde PP2A kanser tedavisinde, kalp hastalıklarında, diabetes mellitusda ve nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir araştırma konusu olmuştur (Cohen, 1991; Klumpp & Krieglstein, 2002). PP2A disregülasyonunun Alzhemier hastalığı ve enfeksiyonlara artmış duyarlılık ile ilişkili olduğu da bilinmektedir (Cho, & Xu, 2007).

Hücreyel transformasyonda ve çeşitli hücreyel fonksiyonların yanında tümör süpresyon yapan bir protein olarak görev yapmaktadır (Mumby, 2007). Çeşitli sinyal yolları üzerindeki inhibitör etkileri sayesinde enflamatuvar yanıtları sınırlandırılmasının keşfedilmesinden bu yana PP2A aktivitesini arttıran ilaçların

enflamatuvar hastalıkların tedavisinde etkin olabileceği düşünülmektedir (Clark, & Ohlmeyer, 2019).

Fosforilasyon ve defosforilasyon proteinleri temel hücre mekanizmalarının regülasyonu için gereklidir. PP2A total hücre proteinlerinin en az %1'ni oluştururlar. Protein fosfataz 1 ile birlikte değerlendirildiğinde hücrelerde ve dokulardaki Ser/Thr fosfataz aktivitesinin %90 fazlasından sorumludurlar (Klumpp, & Krieglstein, 2002; Lin ve ark., 1998).

PP2A proteinlerin serin ve treonin amimoasidlerinden selektif olarak fosfat gruplarını kaldırılmasını katalizleyen oldukça kompleks heterodimerik bir enzimdir (Clark & Ohlmeyer, 2019). Hücre fonksiyonlarının regülasyonu için fosfataz ve kinaz aktiviteleri arasında çok hassas denge olmalıdır. Kavramsal olarak ve pratik olarak zararlı hücre aktivitesini engellemek için kinazları inhibe etmek fosfatazları aktive etmekten daha kolay görülmektedir (Clark, & Ohlmeyer, 2019). PPA tek bir antite değildir. Protein fosfatazlar, fosforilaz kinaz enzimini defosforile edebilme ve inhibisyon durumlarına göre tip-1 ve tip-2 olarak iki gruba ayrılmaktadır (Cohen, 1991). Tip-2 enzimler aktif enzim 65 kD ağırlığında scaffolding (iskele) subunit A, 36 kD katalitik subunit C ve spesifiteyi belirleyen farklı boyutlardaki subunit B'den oluşmaktadır (Haesen, Sents, Lemaire, Hoorne, & Janssens, 2014; Lambrecht, Haesen, Sents, Ivanova, & Janssens, 2013). Fonksiyonel karmaşıklık ve çeşitlilik B subuniti tarafından sağlanmaktadır (Haesen ve ark., 2014; Lambrecht ve ark., 2013).

Treonin, tirozin veya serin gruplarından kovalen olarak bağlanmış fosfat gruplarını ayırmak protein fonksiyonlarını düzenlemek için hızlı ve etkin bir yöntemdir. Az sayıda ters reaksiyonu katalizleyen fosfataz olmakla birlikte, enzimlerin substrat spesifitesi katalitik fonksiyonları olmayan regülatör subunitler tarafından sağlanabilir. Regülatör subunitlerin farklılaşması fosfataz ve kinaz kodlayan genlerin sayısında artışla paralel olmaksızın bu enzimlerin (fosfatazlar ve kinazlar) fonksiyonlarında önemli derecede artış sağlar. Bu durumun PP2A için özellikle önemli olduğu görülmüştür (Clark, & Ohlmeyer, 2019).

PAMP ve PAMP tanıyan hücre reseptörleri enflamasyonun başlaması ve immünite için temel noktadır. Özellikle gram negatif bakterilerin yapısında bulunan LPS'lerin tanınması için TLR4 gereklidir. LPS'ler dışında nükleik asit gibi diğer antijenik yapılar diğer reseptörlerce tanınır. Bu tanınma sonrası sitokin, kemokin ve

diğer enflamatuvar proteinleri içeren gerekli immün yanıtların oluşabilmesi için bir dizi enzimatik reaksiyon gerçekleşmektedir. Hücre içi bu enzimatik reaksiyonların dengeli bir şekilde devam ettirilmesi fosforilasyon ve defosforilasyon ile sağlanmaktadır. PP2A, NF-κB ve MAPK üzerinden fonksiyonlarını yerine getirmektedir. Defosforilasyonda PP2A'nın önemli bir yeri vardır. PPP2R4, PP2A'nın B subunitlerinden biri olan regülatör proteinlerden biridir ve fonksiyonel çeşitliliğe katkıda bulunmaktadır. Ancak fonksiyonları tam olarak anlaşılamamıştır ve PPP2R4 ile ilgili literatürde yeterli veri bulunmamaktadır (Clark, & Ohlmeyer, 2019).

2.14.7. Human WD Repeat-Containing Protein 33 (WDR33)

Proteinler genellikle yaygın olan motif sekanslarına, katalitik fonksiyonlarına ve/veya yapılarına göre adlandırılmaktadırlar. Human WD repeat-containing protein 33 (WDR33) 40 amino asitlik rezidü yapısındaki aspartik asit ve triptofan tekrarı nedeniyle bu şekilde adlandırılmıştır.

WD tekrarları içeren proteinler, sinyal transdüksiyonu, hücre iskeletinin yeniden yapılandırılması, sinyal transdüksiyonu, apoptoz, hücre içi vezikül trafiği ve hücre bölünmesi gibi birçok hücresel olayda görev almaktadırlar (Silva, Hamamoto, Nakamura, & Furukawa, 2005).

İnsanlarda WDR33 geni ile kodlanmaktadır. WDR33 mRNA'nın AAUAAA bağımlı adenilasyonu ve bölünmesinde görev yapan “bölünme ve poliadenilasyon spesifik faktör” (CPSF)'ün bir subunitidir (Ito ve ark., 2001). WDR33, CPSF'nin subsrat RNA'ya bağlanması ve poliadenilasyonu başlatabilmesi için gereklidir. WDR33 AAUAAA sinyalini oldukça spesifik olarak tanır ve AAUAAA içeren sekanslara bağlanır. İnsan WDR33 WDC146 olarak adlandırılmaktadır ve özellikle testislerde üretilmektedir. İnsanlarda kolon ve ince bağırsaklar dışında tüm dokularda eksprese edilmektedir. WDR33 hücre farklılaşmasında ve DNA rekombinasyonunda görev alan önemli bir proteindir (Ito ve ark., 2001). WDR33 ratlarda timus, dalak ve lenfositlerde bol miktarda eksprese edildiği tespit edilmiştir. WDR33 knockout farelerde fertilité bozukluğu ve/veya immün yanıtlarda bozukluk olduğu tespit edilmiştir (Ito ve ark., 2001)

2.14.8. Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO)

Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase (IDO), ince bağırsak, akciğer, kadın genital sistemi ve plasenta gibi birçok dokudan ve hücreden fizyolojik olarak salgılanmaktadır. İnsanlarda IDO1 geni tarafından kodlanır. IDO triptofan metabolizması için gereklidir. Kynurenine yolunda birinci ve hız sınırlayıcı basamağı katalizleyen üç enzimden biridir. IDO immün sistemin önemli bir parçasıdır ve çeşitli patojenlere karşı doğal bağışıklıkta rol alır. Triptofan patojenlerin yaşaması için esansiyel olduğu için IDO enzim aktivitesi patojenleri harap eder. Streptokoklar gibi bazı bakteriler, kızamık ve herpes gibi bazı virüsler triptofan eksikliğine çok duyarlı olmalarına rağmen (Adams ve ark., 2004; MacKenzie, Hadding, Xe, & Ubener, 1998; Obojes, Andres, Kim, Däubener, & Schneider-Schaulies, 2005) *Brucella* yaşamsal fonksiyonlarının devamı için triptofana ihtiyaç duymaz (Qin ve ark., 2008).

IDO ekspresyonu IFN- γ tarafından indüklenmektedir. Bu durum neden enflamatuvar hastalıklar ve tümorogenezis sırasında IDO ekspresyonunun arttığını açıklamaktadır (Mellor, Lemos, & Huang, 2017).

Diğer taraftan IDO, T hücre fonksiyonlarını sınırlayarak ve immün tolerans mekanizmalarını kullanarak immünsüpressif etki gösterir. Enflamasyona yanıt olarak hücreler tarafından üretilir (Munn, & Mellor, 2013). IDO tümör gelişimi sırasında aktive olarak tümörün malign hücrelerin immün sistem gözetiminden kaçmasına yardımcı olur. Akut miyeloid lösemi, over kanseri ve kolorektal kanserler gibi birçok kanserde IDO ekspresyonu arttığı gösterilmiştir. IDO malign dönüşüm sürecinin bir parçasıdır ve anti-tümör yanıtların baskılanmasında kilit rol oynar. Dolayısıyla IDO'nun baskılanması ile kemoterapi etkinliği ve diğer immünoterapötik tedavilerin etkinliği arttırılabilir (Prendergast ve ark., 2014; Uyttenhove ve ark., 2003).

IDO immün düzenleyici hücreler ve alternatif yoldan aktive olan makrofajlardan salınan bir enzim olarak immün sistemin kontrol noktası olarak görev alan bir moleküldür (Moon, Hajjar, Hwu, & Naing, 2015). IDO'nun T ve NK hücrelerini baskıladığı, Treg ve miyeloid kökenli süpressör hücre üretimini arttırdığı ve anjiyogenezisi desteklediği bilinmektedir (Prendergast ve ark., 2014).

Bu mekanizmalar özellikle karsinogenezde önemlidir. IDO tümör hücrelerinin iki temel mekanizma ile immün sistemden kaçışını sağlar. Birincisi tümör mikro çevresindeki triptofanın tüketilmesi, ikincisi ise T hücreleri ve NK hücreleri için

sitotoksik olan triptofan katabolizma ürünü olan kynurenine'ler ile ilişkilidir (Frumento ve ark., 2002; Munn ve ark., 1999).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hastaların Seçimi ve Çalışma Planı

Çalışmaya Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı (Tarih: 28.02.2020, Onay no: 2017-3/15) alınarak başlandı. Bruselloz vakaları semptomların ortaya çıkışına göre akut (0-2 ay), subakut (2-12 ay) ve kronik (12 ay ve üzeri) olarak gruplandırıldı. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji polikliniğine başvuran ve bruselloz tanısı alan hastalara çalışma hakkında bilgi verildi. Çalışmaya katılmayı kabul eden hastaların onamları alınarak çalışmaya dâhil edildi. Bruselloz tanısı klinik bulguların yanında SAT 1/160 ve üzeri pozitifliği ile konuldu.

Hastaların çalışmaya dâhil edilme kriterleri;

- *18 yaş ve üzerinde olması
- *Gebelik ve laktasyon döneminde olmaması
- *Bruselloz dışında kronik granülomatoz hastalığı olmaması
- *Başka bir enfeksiyöz hastalığı olmaması
- *Otoimmün veya immün kökenli hastalığı olmaması
- *Anemi veya lökopeni olmaması olarak belirlendi.

Çalışma grupları akut, kronik, subakut, iyileşen ve kontrol grubu olarak tasarlandı. Bruselloz vakaları ayrıca kendi içinde osteoatriküler tutulumu olup olmamasına göre iki gruba ayrıldı. Kontrol grubu olarak kan merkezine donör adayları olarak başvuran, daha önce bilinen veya saptanan hastalığı olmayan sağlıklı gönüllülerden oluşturuldu. Hasta ve sağlıklı kontrol grubundan 10 ml kan alındı.

3.2. Protein Düzeylerinin Saptanması

Tüm proteinler için aynı olan biotin double antikor sandviç ELISA yöntemi kit prosedürlerine uygun şekilde basamaklar halinde aşağıdaki sıra ile yapıldı;

- Standart solüsyonların dilüsyonu yapıldı.

Tablo 1. ABI3 İçin Standart Dilüsyonlar

160 ng/L	Standart No.5	120µl Orjinal Standart + 120µl Standart Dilüent
80 ng/L	Standart No.4	120µl Standart No.5+ 120µl Standart Dilüent
40 ng/L	Standart No.3	120µl Standart No.4 + 120µl Standart Dilüent
20 ng/L	Standart No.2	120µl Standart No.3+ 120µl Standart Dilüent
10 ng/L	Standart No.1	120µl Standart No.2 + 120µl Standart Dilüent

Tablo 2. ABI3 İçin Stok Standart

Tüp	Standart	S5	S4	S3	S2	S1
ng/L	320	160	80	40	20	10

Tablo 3. CLEC12B İçin Standart Dilüsyonlar

160 ng/L	Standart No.5	120µl Orjinal Standart + 120µl Standart Dilüent
80 ng/L	Standart No.4	120µl Standart No.5+ 120µl Standart Dilüent
40 ng/L	Standart No.3	120µl Standart No.4 + 120µl Standart Dilüent
20 ng/L	Standart No.2	120µl Standart No.3+ 120µl Standart Dilüent
10 ng/L	Standart No.1	120µl Standart No.2 + 120µl Standart Dilüent

Tablo 4. CLEC12B İçin Stok Standart

Tüp	Standart	S5	S4	S3	S2	S1
ng/L	320	160	80	40	20	10

Tablo 5. DDIT4L İçin Standart Dilüsyonlar

48 pg/ml	Standart No.5	120µl Orjinal Standart + 120µl Standart Dilüent
24 pg/ml	Standart No.4	120µl Standart No.5+ 120µl Standart Dilüent
12 pg/ml	Standart No.3	120µl Standart No.4 + 120µl Standart Dilüent
6 pg/ml	Standart No.2	120µl Standart No.3+ 120µl Standart Dilüent
3 pg/ml	Standart No.1	120µl Standart No.2 + 120µl Standart Dilüent

Tablo 6. DDIT4L İçin Stok Standart

Tüp	Standart	S5	S4	S3	S2	S1
pg/ml	96	48	24	12	6	3

Tablo 7. ZFP1 İçin Standart Dilüsyonlar

3200 g/ml	Standart No.5	120µl Orjinal Standart + 120µl Standart Dilüent
1600 g/ml	Standart No.4	120µl Standart No.5+ 120µl Standart Dilüent
800 pg/ml	Standart No.3	120µl Standart No.4 + 120µl Standart Dilüent
400 pg/ml	Standart No.2	120µl Standart No.3+ 120µl Standart Dilüent
200 pg/ml	Standart No.1	120µl Standart No.2 + 120µl Standart Dilüent

Tablo 8. ZFP1 İçin Stok Standart

Tüp	Standart	S5	S4	S3	S2	S1
pg/ml	6400	3200	1600	800	400	200

Tablo 9. PIAS4 İçin Standart Dilüsyonlar

80 pg/ml	Standart No.5	120µl Orjinal Standart + 120µl Standart Dilüent
40 pg/ml	Standart No.4	120µl Standart No.5+ 120µl Standart Dilüent
20 pg/ml	Standart No.3	120µl Standart No.4 + 120µl Standart Dilüent
10 pg/ml	Standart No.2	120µl Standart No.3+ 120µl Standart Dilüent
5 pg/ml	Standart No.1	120µl Standart No.2 + 120µl Standart Dilüent

Tablo.10 PIAS4 İçin Stok Standart

Tüp	Standart	S5	S4	S3	S2	S1
pg/ml	160	80	40	20	10	5

Tablo 11. PPP2R4 İçin Standart Dilüsyonlar

400 ng/L	Standart No.5	120µl Orjinal Standart + 120µl Standart Dilüent
200 ng/L	Standart No.4	120µl Standart No.5+ 120µl Standart Dilüent
100 ng/L	Standart No.3	120µl Standart No.4 + 120µl Standart Dilüent
50 ng/L	Standart No.2	120µl Standart No.3+ 120µl Standart Dilüent
25 ng/L	Standart No.1	120µl Standart No.2 + 120µl Standart Dilüent

Tablo 12. PPP2R4 İçin Stok Standart

Tüp	Standart	S5	S4	S3	S2	S1
ng/L	800	400	200	100	50	25

Tablo 13. WDR33 İçin Standart Dilüsyonlar

24 pg/ml	Standart No.5	120µl Orjinal Standart + 120µl Standart Dilüent
12 pg/ml	Standart No.4	120µl Standart No.5+ 120µl Standart Dilüent
6 pg/ml	Standart No.3	120µl Standart No.4 + 120µl Standart Dilüent
3 pg/ml	Standart No.2	120µl Standart No.3+ 120µl Standart Dilüent
1,5 pg/ml	Standart No.1	120µl Standart No.2 + 120µl Standart Dilüent

Tablo 14. WDR33 İçin Stok Standart

Tüp	Standart	S5	S4	S3	S2	S1
pg/ml	48	24	12	6	3	1,5

Tablo 15. IDO İçin Standart Dilüsyonlar

64 U/L	Standart No.5	120µl Orjinal Standart + 120µl Standart Dilüent
32 U/L	Standart No.4	120µl Standart No.5+ 120µl Standart Dilüent
16 U/L	Standart No.3	120µl Standart No.4 + 120µl Standart Dilüent
8 U/L	Standart No.2	120µl Standart No.3+ 120µl Standart Dilüent
4 U/L	Standart No.1	120µl Standart No.2 + 120µl Standart Dilüent

Tablo 16. IDO İçin Stok Standart

Tüp	Standart	S5	S4	S3	S2	S1
U/L	128	64	32	16	8	4

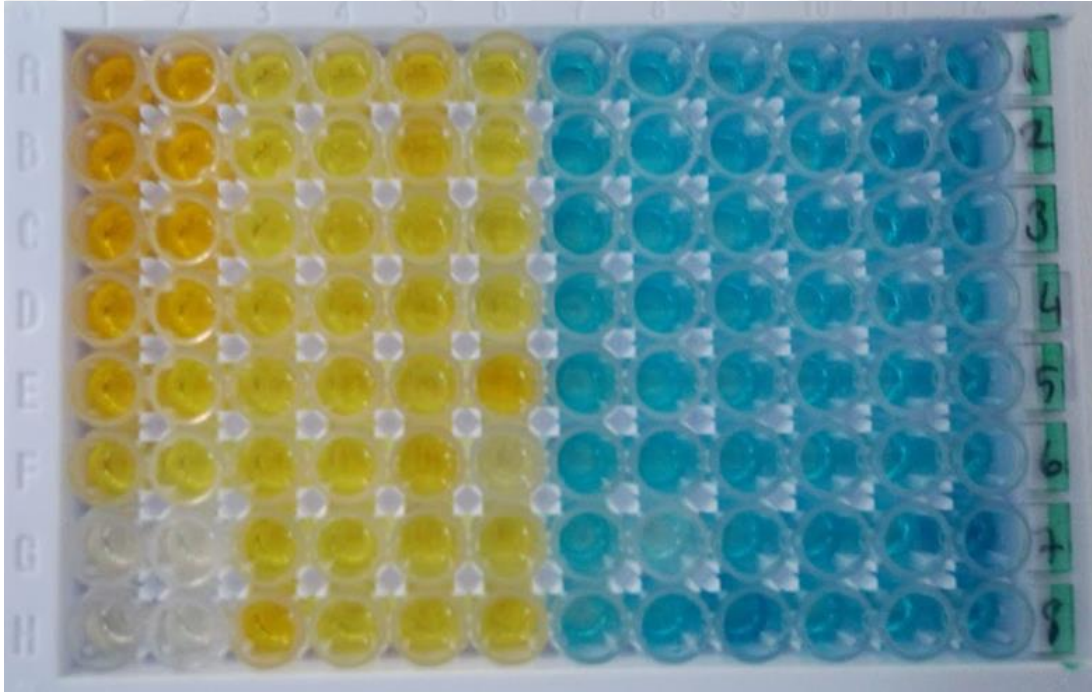
- Boş kuyucuklara kromojen solüsyon A, B ve stop solüsyonları eklendi.
- Standart solüsyon kuyucuklarına 50'şer µl streptavidin-HRP ve 50'şer µl standart eklendi.
- Örnek kuyucuklarına 40'ar µl örnek, 10'ar µl protein antikorları ve 50'şer µl streptavidin-HRP eklendi.
- Seal plate, membrane ile kapatılarak yavaşça çalkalandı ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.

- Distile su ve washing buffer kullanılarak 30x sulandırma ile yıkama solüsyonları hazırlandı.

- İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki sıvı alındı. Geri kalanlar silkeleme ile tamamen boşaltıldı. Sonrasında kuyucuklara yıkama solüsyonu eklendi. 30 saniye beklendi sonra sıvı tekrar alındı. Yıkama işlemi bu şekilde beş kez tekrarlandı.

- Tüm kuyucuklara önce 50'şer µl kromojen A solüsyonu ve sonrasında kromojen B solüsyonu eklendi. Hafifçe çalkalandıktan sonra ışıktan korunarak 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyon bitiminde tüm kuyucuklara 50'şer µl stop solüsyonu eklenerek maviden sarıya olan renk değişimi gözlemlendi (Resim 1).



Resim 1. Plate üzerinde renk değişimi

- Stop solüsyonu eklendikten sonra boş kuyucuk sıfır olarak alınarak her bir kuyucuğun absorbansı 450 nm dalga boyunda ELISA okuma cihazında (Tecan, Austria) okutuldu.

Sadece araştırma amaçlı ticari olarak üretilen Human ELISA kitlerinde ABI3, PPP2R4, DDIT4L, WDR33, ZFP1, PIAS4, CLEC12B ve IDO (SunRed Bio, Shanghai, China) verilen çalışma prosedürü izlenerek protein miktarları ölçüldü. Kitlerin içerisinde konsantrasyonları bilinen protein standartlarının vermiş olduğu

optik dansite değerleri ve konsantrasyon değerleri kullanılarak standart grafikler elde edildi. Numunelerdeki proteinlerin konsantrasyonu standart grafikler kullanılarak Microsoft Excel programı ile analizi yapıldı. Her bir protein için kitlerin ölçüm duyarlılığı ABI3; 0,35 ng/L, PPP2R4; 0,92 ng/L, DDIT4L; 0,13 pg/ml, WDR33; 0,04 pg/ml, ZFP1; 10,34 pg/L, PIAS4; 0,26 pg/ml, CLEC12B; 0,21 ng/L ve IDO; 0,27 U/L olarak verilmiştir.

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 21 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) kullanılarak yapıldı. Değerlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) incelendi. Tanımlayıcı analizler normal dağılan değişkenler için ortalama ve standart sapmalar olarak, normal dağılıma uymayan veriler için ortanca ve çeyrekler arası olarak verildi. Normal dağılıma uyan bağımsız sayısal grupların karşılaştırması tek yönlü ANOVA testi kullanılarak yapıldı. Varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. p-değerinin 0.05 altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar olarak değerlendirildi. Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunan durumlarda, ikişerli post-hoc karşılaştırmalar Tukey testi kullanılarak yapıldı. Normal dağılıma uymayan ikiden çok sayısal veri içeren grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İkişerli karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı ve Bonferoni düzeltmesi kullanılarak değerlendirildi. Kategorik verilen karşılaştırılmasında çok gözlü ki-kare testleri kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmaya kriterleri karşılayan toplam 133 kişi dâhil edildi. Ancak çalışmanın beşinci grubu (subakut grup) yeterli sayıda (dört) hasta bulunamadığı için değerlendirilmeye alınmadı. Çalışmaya dört gruptan toplam 129 kişi ile devam edildi. Akut gruptaki hastaların %40'ında (16/40), kronik gruptaki hastaların %34'ünde (13/38) kemik eklem tutulumu vardı. Gruplar arasında cinsiyet ($p=0.738$) ve yaş ($p=0.172$) dağılımı açısından istatistiksel anlamlı fark yoktu. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet dağılımı Tablo 17'de, elde edilen sonuçlar toplu halde Tablo 18'de verilmiştir.

Tablo 17. Demografik Veriler

	Akut	Kronik	İyileşen	Kontrol	Toplam
Yaş (yıl)*	44 (20,5)	52,5 (15,5)	54 (31)	54,5 (26,5)	51 (23)
Kadın (n,%)	18 (14)	15 (11,6)	3 (2,3)	15 (11,6)	51 (39,5)
Erkek (n,%)	22 (17,1)	23 (17,8)	8 (6,2)	25 (19,4)	78 (60,5)
Toplam (n,%)	40 (31)	38 (29,5)	11 (8,5)	40 (31)	129 (100)

* Sonuçlar ortanca ve çeyrekler arası olarak verilmiştir.

Tablo 18. Çalışma Gruplarına Göre Protein Seviyeleri*

Grup	Akut	Kronik	İyileşen	Kontrol
ABI3 (ng/L)	18,88 (7,29)	16,57 (4,47)	2,81 (0,35)	3,15 (2,91)
CLEC12B(ng/L)	449,26 (207,94)	486,82 (219,52)	17,08 (5,74)	23,31 (5,00)
DDIT4L (pg/ml)	4,72 (1,38)	4,67 (0,97)	5,98 (0,76)	5,87 (5,53)
IDO (U/L)	6,88 (2,72)	6,23 (2,10)	75,35 (17,11)	79,26 (140,64)
PIAS (pg/ml)	8,01 (3,04)	6,87 (2,47)	9,98 (1,65)	10,66 (8392)
PPP2R4 (ng/ml)	42,85 (16,72)	41,11 (17,66)	3,61 (0,69)	7,52 (2,77)
WDR33 (pg/ml)	3,25 (0,81)	3,13 (0,60)	2,75 (1,14)	2,89 (3,67)
ZFP1 (pg/ml)	310,31 (97,57)	219,69 (83,98)	317,46(117,59)	395,71 (408,30)

* Sonuçlar ortanca ve çeyrekler arası olarak verilmiştir.

Çalışma gruplarında ABI3 seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu tespit edildi ($p<0.001$). Akut hasta grubunda ABI3 seviyesi iyileşen ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanırken, kronik hasta grubunda ABI3 seviyesi iyileşen ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Akut hasta grubunda ABI3 seviyesi kronik hasta grubuna göre yüksek olmasına rağmen akut ve kronik hasta grupları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Yine kontrol grubunda ABI3 seviyesi iyileşen gruba göre yüksek

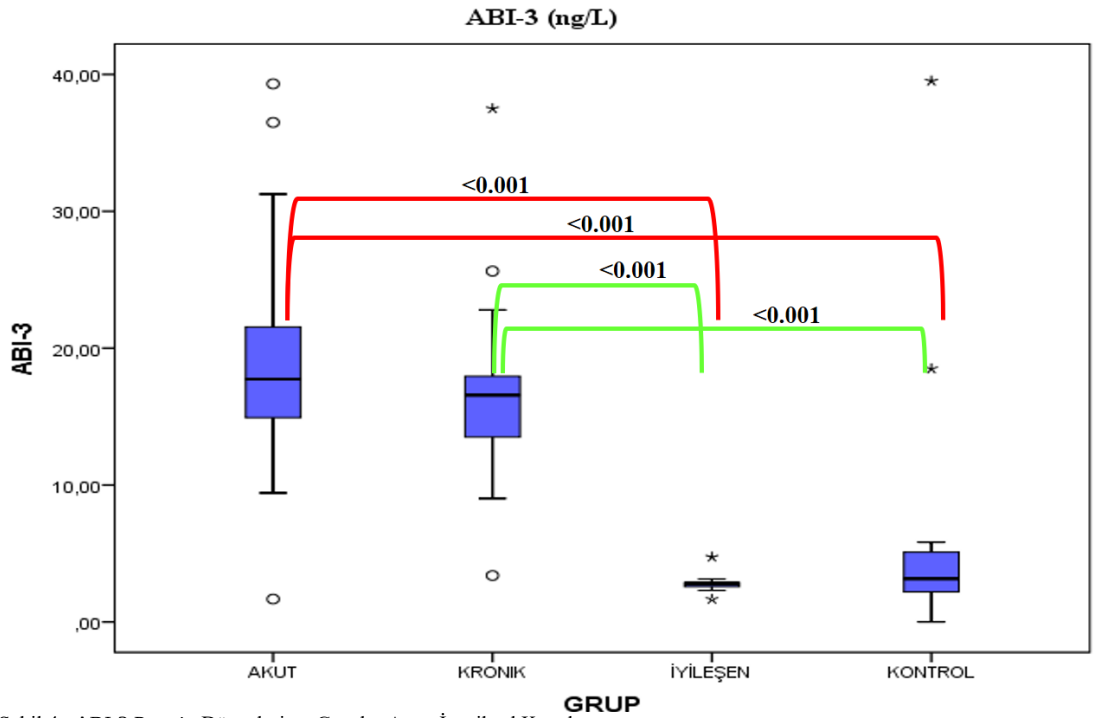
olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark olmadığı görüldü (Tablo 19, Şekil 4).

Tablo 19. ABI-3 Protein Düzeyleri ve Gruplar Arası İstatistiksel Karşılaştırma*

ABI-3	Akut	Kronik	İyileşen	Kontrol
ng/L ^{&}	17,73 (6,87)	16,57 (4,47)	2,81 (0,35)	3,15 (2,91)
Akut		.039	<0.001	<0.001
Kronik	.039		<0.001	<0.001
İyileşen	<0.001	<0.001		0.41
Kontrol	<0.001	<0.001	0.41	

*Bonferoni düzetmesine göre istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.008$ olarak alınmıştır.

[&]Sonuçlar ortanca ve çeyrekler arası olarak verilmiştir.



Şekil 4. ABI-3 Protein Düzeyleri ve Gruplar Arası İstatistiksel Karşılaştırma

4.2. CLEC12B

Çalışma gruplarında CLEC12B seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu tespit edildi ($p < 0.001$). Akut hasta grubunda CLEC12B seviyesi iyileşen ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanırken, kronik hasta grubunda CLEC12B seviyesi iyileşen ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Akut hasta grubunda CLEC12B seviyesi kronik

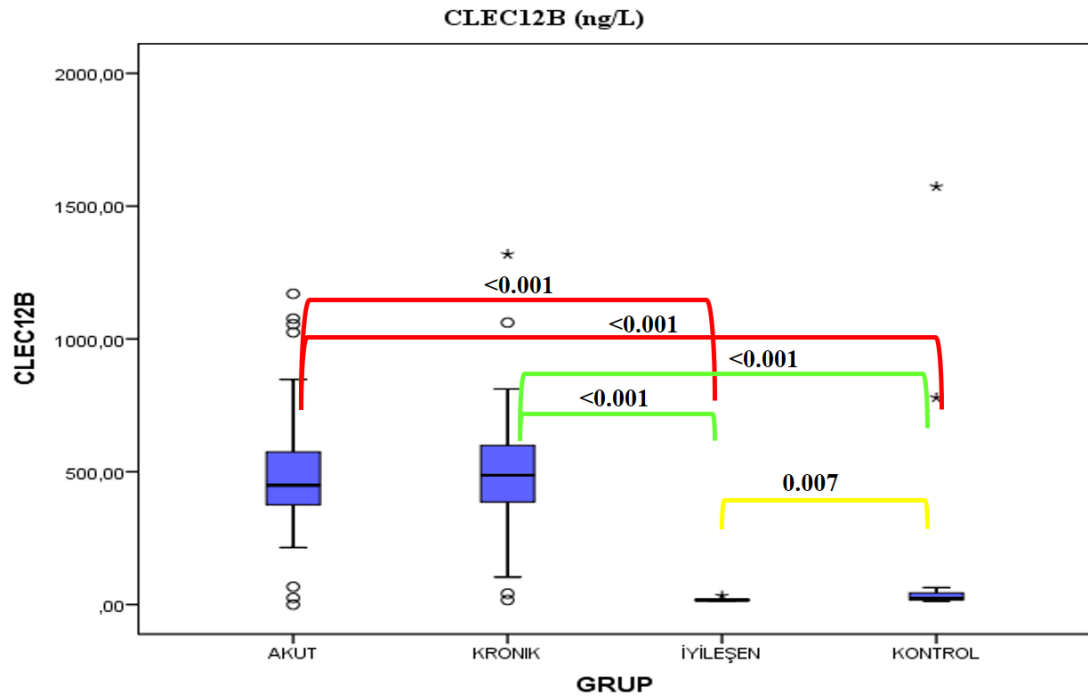
hasta grubuna göre yüksek olmasına rağmen akut ve kronik hasta grupları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Yine kontrol grubunda CLEC12B seviyesi iyileşen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı ($p=0.007$) (Tablo 20, Şekil 5).

Tablo 20. CLEC12B Protein Düzeyleri ve Gruplar Arası İstatistiksel Karşılaştırma*

CLEC12B	Akut	Kronik	İyileşen	Kontrol
ng/L ^{&}	449,26 (207,94)	486,82 (219,52)	17,08 (5,74)	23,31 (5,00)
Akut		0.624	<0.001	<0.001
Kronik	0.624		<0.001	<0.001
İyileşen	<0.001	<0.001		0.007
Kontrol	<0.001	<0.001	0.007	

*Bonferoni düzetmesine göre istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.008$ olarak alınmıştır.

[&]Sonuçlar ortanca ve çeyrekler arası olarak verilmiştir.



Şekil 5. CLEC12B Protein Düzeyleri ve Gruplar Arası İstatistiksel Karşılaştırma

4.3. DDIT4L

Çalışma gruplarında DDIT4L seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu tespit edildi ($p<0.001$). Akut hasta grubunda DDIT4L seviyesi iyileşen ve

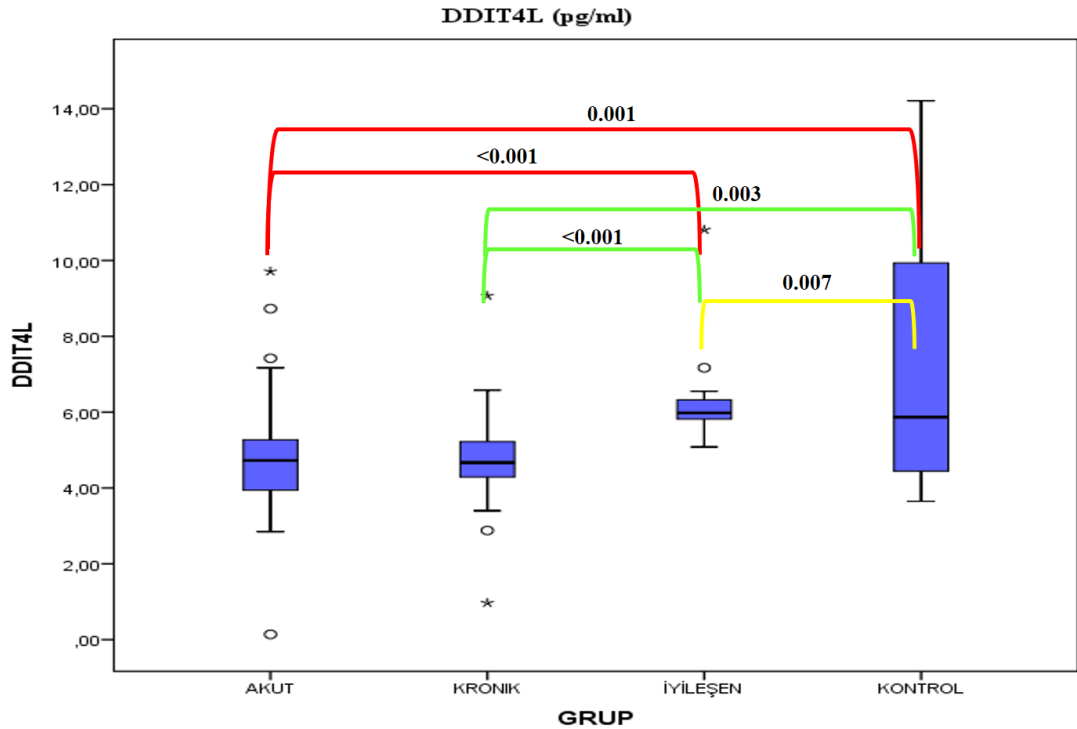
kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanırken, kronik hasta grubunda DDIT4L seviyesi iyileşen ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Akut hasta grubunda DDIT4L seviyesi kronik hasta grubuna göre yüksek olmasına rağmen akut ve kronik hasta grupları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Yine iyileşen grubunda DDIT4L seviyesi kontrol gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı ($p=0.007$) (Tablo 21, Şekil 6).

Tablo 21. DDIT4L Protein Düzeyleri ve Gruplar Arası İstatistiksel Karşılaştırma*

DDIT4L	Akut	Kronik	İyileşen	Kontrol
pg/ml ^{&}	4,72 (1,38)	4,67 (0,97)	5,98 (0,76)	5,87 (5,53)
Akut		0.671	<0.001	0.001
Kronik	0.671		<0.001	0.003
İyileşen	<0.001	<0.001		0.007
Kontrol	0.001	0.003	0.007	

*Bonferoni düzetmesine göre istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.008$ olarak alınmıştır.

[&]Sonuçlar ortanca ve çeyrekler arası olarak verilmiştir.



Şekil 6. DDIT4L Protein Düzeyleri ve Gruplar Arası İstatistiksel Karşılaştırma

4.4. ZFP1

Çalışma gruplarında ZFP1 seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu tespit edildi ($p<0.001$). Kronik grubunda ZFP1 seviyesi akut hasta ve kontrol gruplarına göre oldukça düşük düzeydeydi ve bu fark istatistiksel olarak oldukça anlamlı

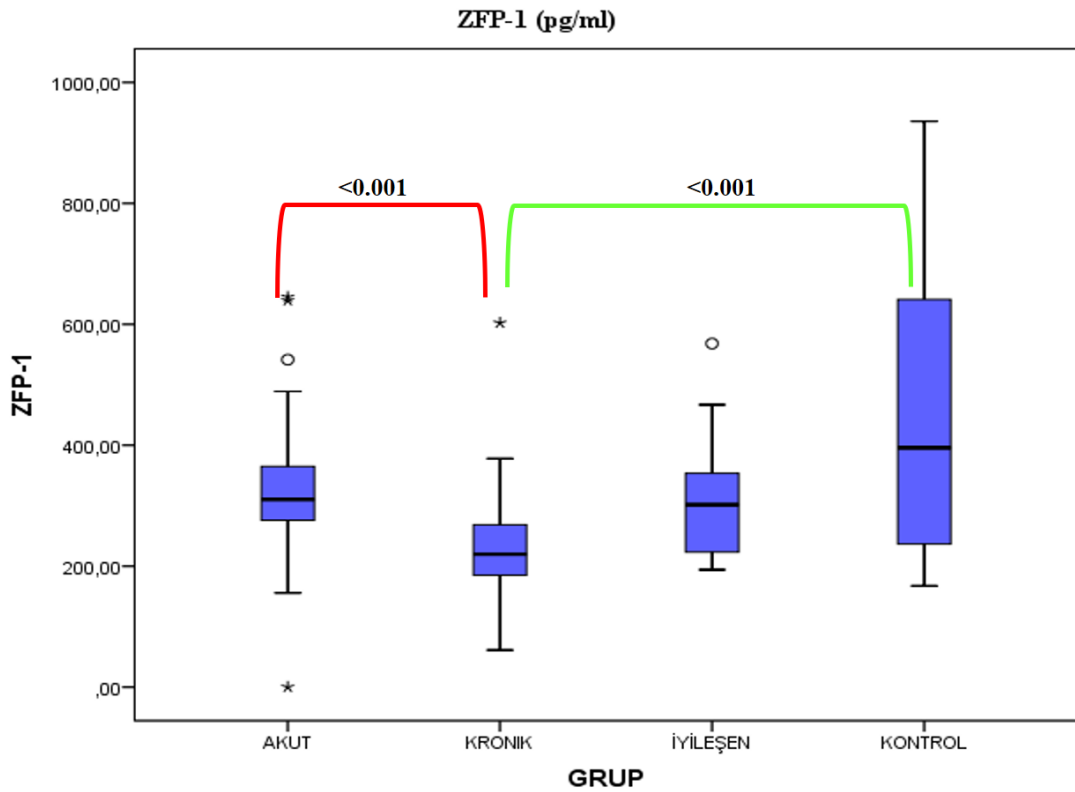
düzeyde idi. Akut hasta grubunda ZFP1 seviyesi kronik hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (Tablo 22, Şekil 7).

Tablo 22. ZFP1 Protein Düzeyleri ve Gruplar Arası İstatistiksel Karşılaştırma*

ZFP1	Akut	Kronik	İyileşen	Kontrol
pg/ml ^{&}	310,31(97,57)	219,69(83,98)	301,43(154,29)	395,71(408,30)
Akut		<0.001	0.714	0.119
Kronik	<0.001		0.18	<0.001
İyileşen	0.714	0.18		0.149
Kontrol	0.119	<0.001	0.149	

*Bonferoni düzetmesine göre istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.008$ olarak alınmıştır.

[&]Sonuçlar ortanca ve çeyrekler arası olarak verilmiştir.



4.5. PIAS4

Çalışma gruplarında PIAS4 seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu tespit edildi ($p < 0.001$). Akut hasta grubunda PIAS4 seviyesi iyileşen ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptandı, yine kronik hasta grubunda PIAS4 seviyesi iyileşen ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

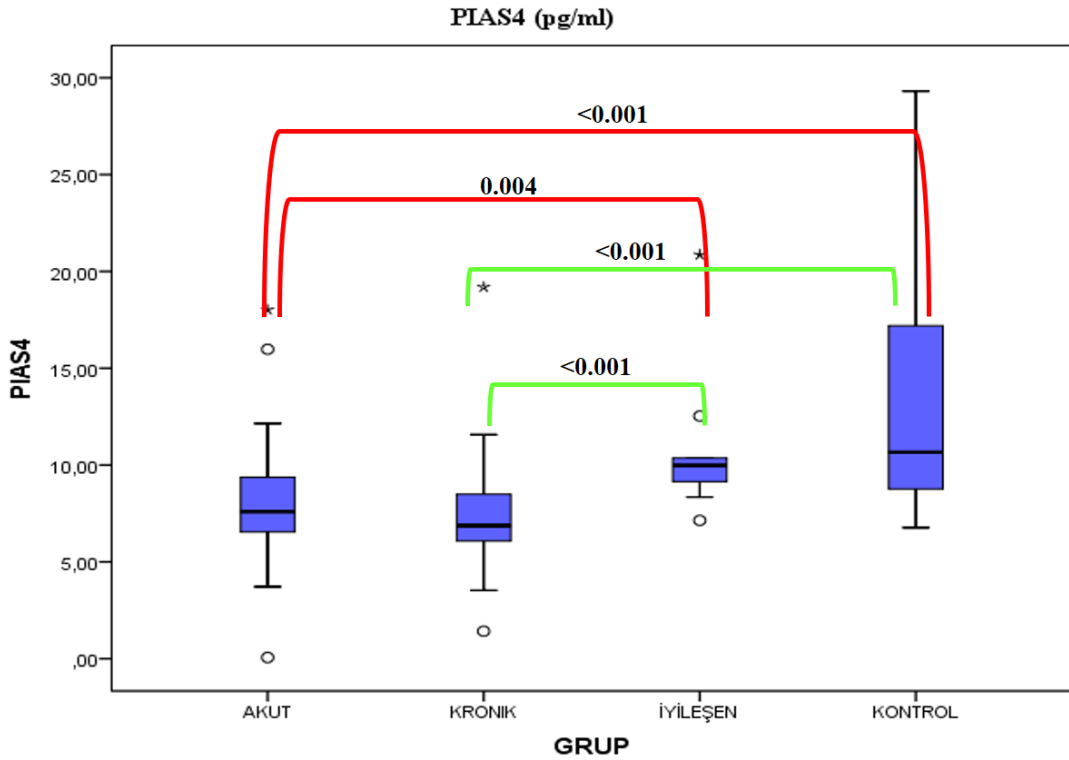
düzeyde düşük bulundu. Akut hasta grubunda PIAS4 seviyesi kronik hasta grubuna göre yüksek olmasına rağmen akut ve kronik hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. (Tablo 23, Şekil 8).

Tablo 23. PIAS Protein Düzeyleri ve Gruplar Arası İstatistiksel Karşılaştırma*

PIAS	Akut	Kronik	İyileşen	Kontrol
pg/ml ^{&}	7,59 (2,92)	6,87 (2,47)	9,98 (1,65)	10,66 (8392)
Akut		0.189	0.004	<0.001
Kronik	0.189		<0.001	<0.001
İyileşen	0.004	<0.001		0.303
Kontrol	<0.001	<0.001	0.303	

*Bonferoni düzetmesine göre istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.008$ olarak alınmıştır.

[&]Sonuçlar ortanca ve çeyrekler arası olarak verilmiştir.



Şekil 8. PIAS Protein Düzeyleri ve Gruplar Arası İstatistiksel Karşılaştırma

4.6. PPP2R4

Çalışma gruplarında PPP2R4 seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu tespit edildi ($p < 0.001$). Akut hasta grubunda PPP2R4 seviyesi iyileşen ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanırken, yine kronik hasta

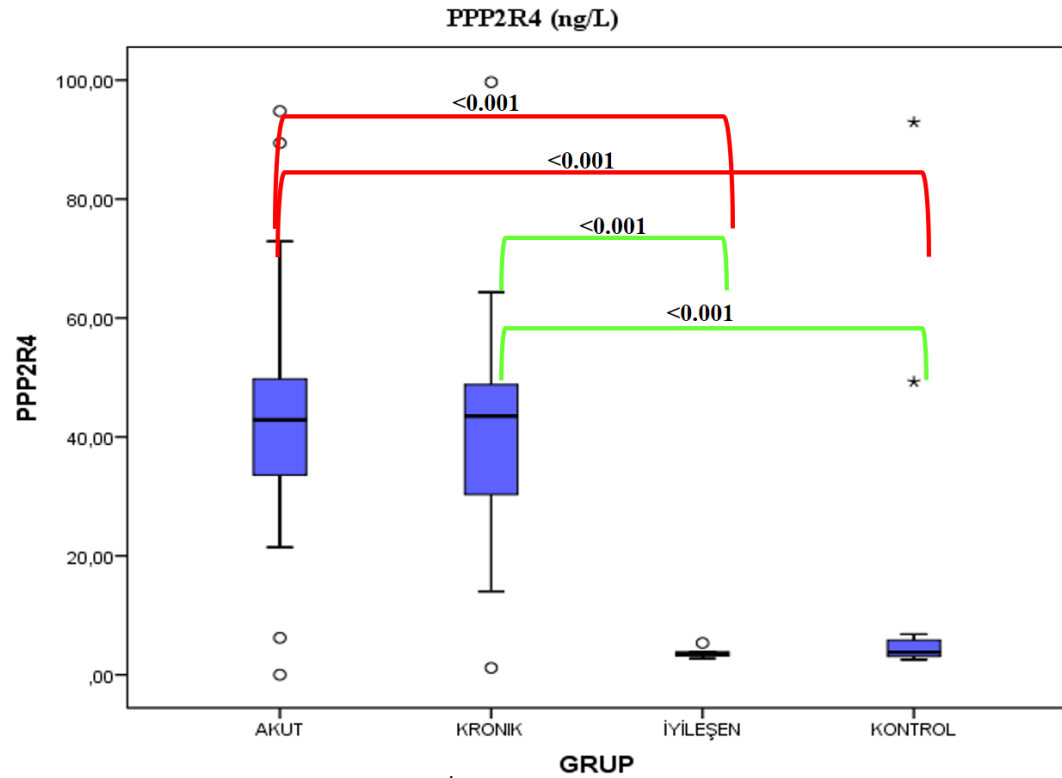
grubunda PPP2R4 seviyesi iyileşen ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Akut hasta grubunda PPP2R4 seviyesi kronik hasta grubuna göre yüksek olmasına rağmen akut ve kronik hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı (Tablo 24, Şekil 9).

Tablo 24. PPP2R4 Protein Düzeyleri ve Gruplar Arası İstatistiksel Karşılaştırma*

PPP2R4	Akut	Kronik	İyileşen	Kontrol
ng/L ^{&}	42,85 (16,72)	43,50 (18,65)	3,78 (2,78)	7,52 (2,77)
Akut		0.656	<0.001	<0.001
Kronik	0.656		<0.001	<0.001
İyileşen	<0.001	<0.001		0.319
Kontrol	<0.001	<0.001	0.319	

*Bonferroni düzetmesine göre istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.008$ olarak alınmıştır.

[&]Sonuçlar ortanca ve çeyrekler arası olarak verilmiştir.



Şekil 9. PPP2R4 Protein Düzeyleri ve Gruplar Arası İstatistiksel Karşılaştırma

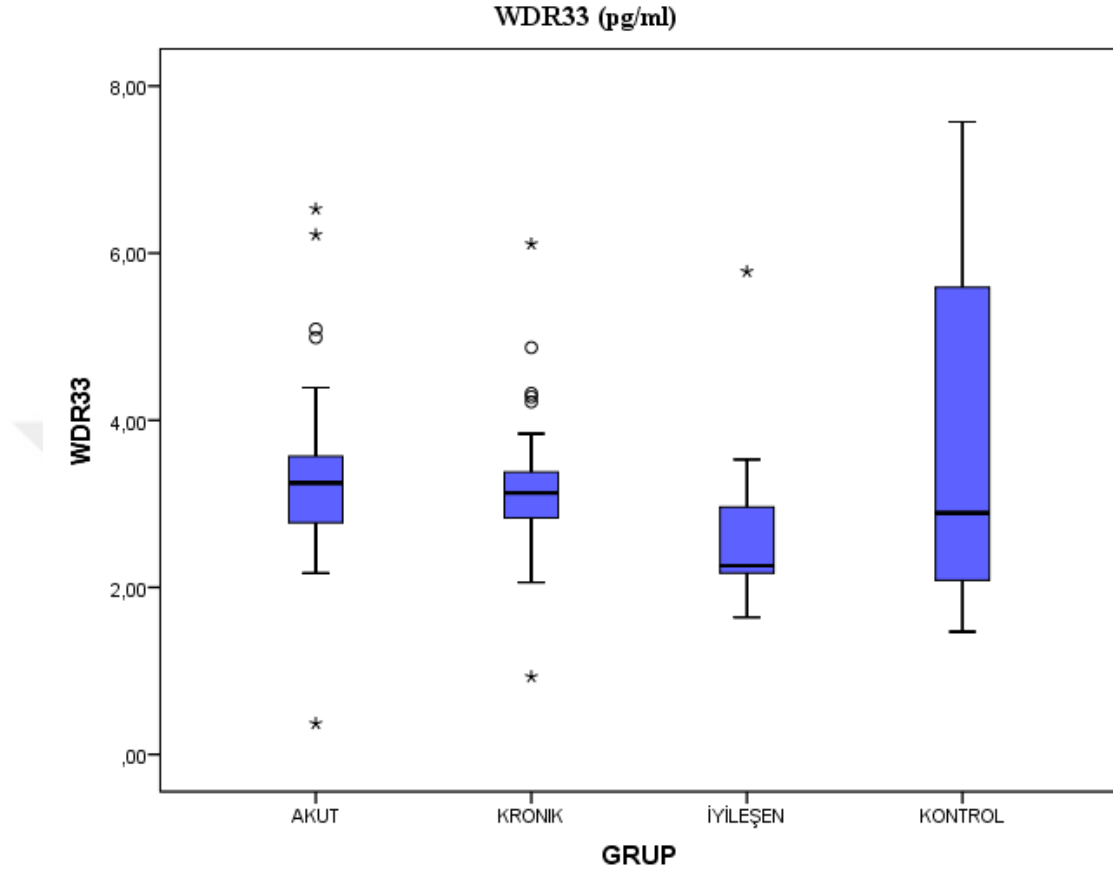
4.7. WDR33

Gruplarda WDR33 seviyeleri arasında istatistiksel anlamlı fark olmadığı saptandı ($p=0.115$). Bu nedenle post-Hoc testler yapılmadı. Gruplara göre WDR33 seviyeleri Tablo 25 ve Şekil 10'da verilmiştir.

Tablo 25. WDR33 Protein Düzeyleri*

WDR33	Akut	Kronik	İyileşen	Kontrol
pg/ml ^{&}	3,25 (0,81)	3,13 (0,60)	2,26 (1,09)	2,89 (3,67)

[&]Sonuçlar ortanca ve çeyrekler arası olarak verilmiştir.



Şekil 10. WDR33 Protein Düzeyleri

4.8. IDO

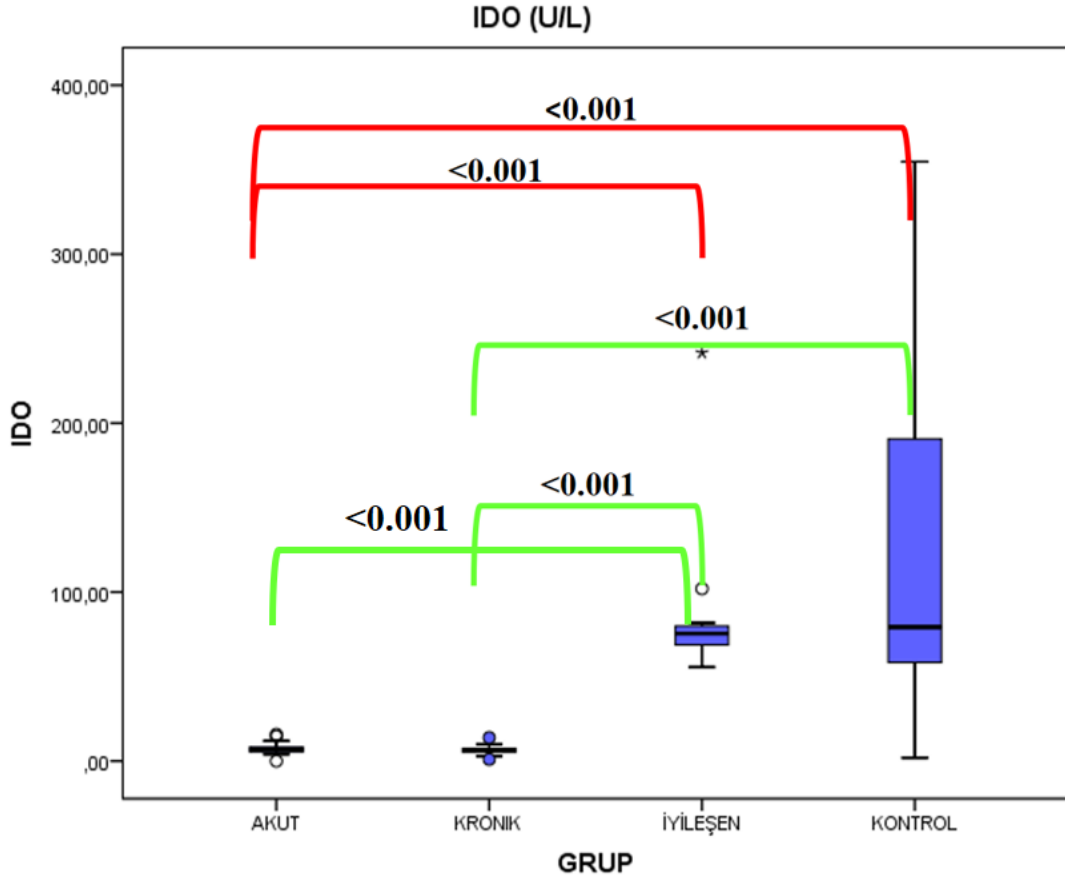
Çalışma gruplarında IDO seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu tespit edildi ($p < 0.001$). Akut hasta grubunda IDO seviyesi iyileşen ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptandı, yine kronik hasta grubunda IDO seviyesi iyileşen ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu. Akut hasta grubunda IDO seviyesi kronik hasta grubuna göre yüksek olmasına rağmen akut ve kronik hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı (Tablo 26, Şekil 11).

Tablo 26. IDO Protein Düzeyleri ve Gruplar Arası İstatiksel Karşılaştırma*

IDO	Akut	Kronik	İyileşen	Kontrol
U/L ^{&}	6,88 (2,72)	5,87 (2,30)	75,35 (17,11)	79,26 (140,64)
Akut		0.1	<0.001	<0.001
Kronik	0.1		<0.001	<0.001
İyileşen	<0.001	<0.001		0.775
Kontrol	<0.001	<0.001	0.775	

*Bonferoni düzetmesine göre istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.008$ olarak alınmıştır.

[&]Sonuçlar ortanca ve çeyrekler arası olarak verilmiştir.



Şekil 11. IDO Protein Düzeyleri ve Gruplar Arası İstatiksel Karşılaştırma

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bruselloz tüm dünyada özellikle Akdeniz kıyılarında görülen zoonotik bir hastalıktır. Günümüzde bruselloz tanısında klinik bulguların yanında en sık olarak SAT yöntemi kullanılmaktadır. Bunun yanında *Brucella*'ya karşı oluşan IgA, IgM ve IgG tipi antikorlar, KFT, NAAT ve kültür tanı amacıyla kullanılmaktadır. Ancak aglütinasyon testlerinde prezon, postzon ve blokan antikorlar varlığı test sonuçlarını değerlendirmekte sorun oluşturmaktadır. Yine *Brucella*'nın yavaş ve zor üreyen bakteri olması ve kültürlerin çoğu zaman negatif sonuçlanması tanıda gecikmeye veya tanı konulmasında zorluklara yol açmaktadır. Kültürler tanıda altın standart olmakla birlikte; hastalığın geç döneminde ve lokalize hastalıkta negatif kalmaktadır. Sonuçların geç alınması diğer bir dezavantajdır. Kültür de üreme ihtimalini arttırmak için yapılan kemik iliği aspirasyon işlemide son derece invazif bir işlem olması diğer önemli klinik bir sorundur.

Brucella'ya karşı immün yanıtta birçok hücresel eleman ve sitokinler görev almaktadır. Bunun yanında hücreler arası iletişim, büyüme, hücre motilitesi, hücre yapısının oluşturulması, transkripsiyon, translasyon gibi fonksiyonlar için çok sayıda protein ve protein domainleri görev almaktadır. Ancak bu yapıların etkileri proenflamatuvar veya antienflamatuvar özellikte olabilmektedir. Bruselloz sırasında görev yapan proteinler tam olarak tespit edilmiş değildir. Bruselloz patogenezi açıklamak için çok ileri düzeyde araştırmalar gerekmektedir.

Bununla birlikte akut hastaların bir kısmı uygun tedaviye rağmen kronikleşmektedir. Bugünkü bilgilerimiz ışığında hangi vakaların kronikleşeceğine dair herhangi bir belirteç bulunmamaktadır.

Bu çalışma diğer tanı yöntemlerinin yanında tanıya yardımcı olabilecek ve/veya kronikleşmeyi öngörebilecek bir marker bulabilmek ve *Brucella* patogenezi açıklayabilecek yeni markerler tespit edebilmek amacıyla yapılmıştır.

ABI3, hücrelerin motilitesinden ve hücre iskeletinin düzenlemesinde görevli olan Abi ailesine ait bir proteindir (Ichigotani ve ark., 2002). Abi ailesi proteinleri

özellikle hücrelerin aktin düzenlemesinde rol almaktadır. Aktin ligamentlerinin ve aktin ağlarının oluşumunda WAVE kompleksinin önemli fonksiyonları vardır (Eden ve ark., 2002; Innocenti ve ark., 2004). Ayrıca bu iki protein hücrelerin reorganizasyonunda da görev yapmaktadırlar (Hossain ve ark., 2012). ABI3 fonksiyonları üzerine çok az sayıda çalışma vardır ve fonksiyonları tam olarak anlayamamıştır. ABI-3 en çok epitelyal hücrelerde, timüste ve dalaktaki makrofajlarda eksprese edilmektedir (Hirao ve ark., 2006). ABI-3'ün WAVE dalgası yapısına katıldığı, hücre motilitesini bozduğu ve hücrelerin podosit oluşmasını engellediği dolayısı ile makrofaj fonksiyonlarını bozduğu gösterilmiştir (Bae, Sung, Cho, Kim, ve ark., 2012; Ichigotani ve ark., 2002; Matsuda ve ark., 2008).

ABI3 seviyesinin artması enfeksiyonun kolaylaşması ve patojenin yok edilememesi sonucuna yol açacaktır. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz veriler bu öngörüğü tamamen destekler niteliktedir. Akut vakalarda ABI3 seviyesi (17,73 ng/L) kontrol grubu (3,15 ng/L) ve iyileşen hasta grubu (2,81 ng/L) ile kıyaslandığında belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Her iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak yüksek oranda anlamlı çıkmıştır ($p<0.001$). Diğer taraftan akut (17,73 ng/L) ve kronik grup (16,57 ng/L) arasında istatistiksel anlamlı fark yok iken, kronik grup ile kontrol ($p<0.001$) ve kronik grup ile iyileşen grup ($p<0.001$) ile karşılaştırmasında ABI3 seviyesi istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 19). Bu sonuçlar *Brucella* patogeneğinde ABI3'ün görev aldığını akut enfeksiyon sonrasında ABI3 seviyesinin yüksek olmasının kronikleşmeyi ön görmek için bir parametre olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca iyileşen hasta grubunda akut hasta grubuna göre ABI3 seviyesindeki belirgin düşüklük ABI3 seviyesinin tedaviye yanıtı değerlendirmek içinde kullanılabileceğini göstermektedir.

CLEC lektin olarak bilinen karbonhidrat bağlayan protein domainlerinden biridir. (Zelensky, & Gready, 2005). C tip lektin domaini içeren proteinlerin hücre adezyonu, patojenlere immün yanıt ve apoptoz gibi fonksiyonları bulunmaktadır (Cambi, & Figdor, 2009; Drickamer, 1999). C tip lektinlerin immün aşırı uyarılmanın kontrol altına alınmasında önemli fonksiyonları vardır. CLEC12B SHP-1 ve SHP-2 fosfatazlar üzerinden NK hücrelerinde reseptör aracılı sinyalleri inhibe ederler. CLEC12B T hücre, DH veya NK hücreler üzerinde ekspresyonu gösterilememekle

birlikte makrofajlar, myeloid hücreler dâhil olmak üzere tüm hücrelerde ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (Hoffmann ve ark., 2007).

CLEC12B aşırı immün reaksiyonun engellenmesinde kontrol noktalarından biri gibi hareket etmektedir (Hoffmann ve ark., 2007). CLEC12B ile bruselloz immünolojisi arasındaki ilişki bugüne kadar hiç çalışılmamıştır. Ancak *Brucella*'nın immün gözetimden kaçmak için kullanacağı yollardan biri olabilir. Böyle bir durumda CLEC12B seviyesinin bruselloz hastalarında artmış olması beklenir. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz veriler bu hipotezimizi destekler niteliktedir. Akut (449,26 ng/L) ve kronik (486 ng/L) brusellozlu hastalarda iyileşen (17,8 ng/L) ve kontrol (23,31 ng/L) grubu hastalarına göre çok belirgin yükseklik bulunmuştur (Tablo 20). *Brucella* immün gözetimden kaçarken içinde yaşadığı hücrenin de hayatta kalması yaşamsal fonksiyonları için son derece önemlidir. Yani yaşamını devam ettirecek düzeyde immün süpresyon yaparken konakçı hücrenin de hayatta kalmasını sağlamaktadır. Akut ve kronik hastalardaki yüksek düzeydeki CLEC12B *Brucella*'nın yaşam dengesini sağlama gayreti olarak açıklanabilir. Akut ile kontrol grubu, akut ile iyileşen grup, kronik ile kontrol grubu ve kronik ile iyileşen gruplar arasındaki fark çok belirgindi ve istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlıydı. Tüm bu veriler yüksek CLEC12B'nin akut hastalık tanısında, azalan seviyelerinin tedaviye yanıtı değerlendirmede ve takip eden titrelerde yüksek seviyelerinin kronikleşmeye gidişi ön görmede kullanışlı bir marker olabileceğini göstermektedir. Ayrıca henüz tam olarak anlaşılamayan *Brucella*'nın immün sistemden kaçış mekanizmalarını anlamamızda bir ipucu da verebilir.

DDIT4L hücre büyümesi, çoğalması, motilitesi, hücrenin yaşam döngüsü, protein sentezi, otofaji gibi hücresel olaylarda görev almaktadır. Transkripsiyon düzenleyen serine/threonine protein kinase gibi fonksiyon gören mTOR'u negatif düzenlemek suretiyle fonksiyon görmektedir (Shoshani ve ark., 2002; Sofer ve ark., 2005). mTOR T hücre farklılaşmasında, B hücrelerinin gelişimi ve farklılaşmasında, nötrofil, mast hücresi ve DH migrasyonu ve bu hücrelerin sitokin üretimi için gereklidir (Eiden ve ark., 2016). mTOR'un DDIT4L tarafından negatif regüle edilmesi tüm bakteriyel enfeksiyonlarda olduğu gibi bruselloza yatkınlığı arttıracaktır. Bizim çalışmamızda akut (4,72 pg/ml) ile kronik (4,67 pg/ml) hasta grupları ($p=0.671$) ve iyileşen (5,98 pg/ml) ile kontrol (5,87 pg/ml) grupları ($p=0.697$ pg/ml) arasında

istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Ancak akut ile kontrol ($p=0.001$), akut ile iyileşen ($p<0.001$), kronik ile kontrol ($p=0.001$), kronik ile iyileşen ($p<0.001$) hasta grupları arasında yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (Tablo 21). DDIT4L'nin yüksek seviyeleri mTOR yanıtını negatif yönde etkileyerek immün süpresyon yapması enfeksiyonlara yatkınlığı arttıracak gibi düşük seviyeleri halen enflatuvar sürecin devam ettiği dolayısı ile enfeksiyonun persiste ettiği şeklinde yorumlanabilir. Çalışmamızda DDIT4L seviyeleri hasta gruplarında sağlıklı gruba kıyasla oldukça düşük düzeydeydi. DDIT4L düşük seviyelerinin akut hastalık tanısında, artan titrelerinin tedaviye yanıtı değerlendirmede, takip eden titrelerde devam eden düşük seviyelerinin kronikleşmeyi öngörmeye bir marker olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

ZFP'ler en büyük DNA bağlayıcı protein ailesidir ve çok geniş moleküler fonksiyonları vardır (Cassandri ve ark., 2017). ZFP'ler histidin, sistein ve çinko iyon kombinasyonlarına göre en az dokuz grupta kategorize edilmektedir (Li & Liu, 2020). Çok çeşitli hücresel fonksiyonları olan bu proteinler başlıca gen transkripsiyonu, mRNA trafiği, hücre yapısı, epitelyal gelişim, hücre adezyonu, protein katlanması, kromatin yeniden yapılanmasında görev almaktadırlar (Laity ve ark., 2001).

ZFP1 çok sayıdaki farklı ZFP proteinlerinden biridir. Ancak immün sistem üzerindeki net etki bilinmemektedir. DNA, RNA, farklı proteinler ve lipitlere bağlanması nedeniyle hem enflamatuvar hem de antienflamatuvar etkinliğe aynı anda sahip olması muhtemeldir. Aynı zamanda brusellozun immün sistemin kendi yaşam fonksiyonlarına göre düzenlemesi nedeniyle bu proteinlerin seviyeleri hakkında yorum yapmak daha da zor bir hal almaktadır. Bizim çalışmamızda kronik hasta grubunun ZFP1 seviyesi (219,69 pg/ml) kontrol (395,71 pg/ml) ve akut hasta (310,31 pg/ml) grubuna göre önemli derecede düşüktü ($p<0.001$) (Tablo 22). Ancak sonuçlar dikkatlice incelendiğinde ZFP1 seviyesinin akut hastalık, iyileşen ve kronik hastalığa doğru ilerledikçe azaldığı görülmektedir. Bu sonuçlar brusellozun immün sistemden gizlenme stratejisi ve kronikleşme sürecinde ZFP1 düzeyini azaltmak suretiyle etki edebileceğini göstermektedir. Tüm bu veriler ile ZFP1 akut hastalıkta tedaviye yanıt izlemek için uygun bir marker olmamakla birlikte takip eden titrelerde ZFP1 seviyesindeki azalma kronikleşmeyi öngörmeye kullanılabılır. Eğer bu çalışmada yeterli sayıda subakut vaka çalışmaya dâhil edilebilseydi bu hipotezimizin

ispatlanması mümkün olabilirdi. Bu nedenle bruselloz patogenezinde, tedaviye yanıtların değerlendirmesinde ve kronikleşmeyi öngörmede ZFP1 fonksiyonlarını değerlendirmek için; subakut vakaların da dâhil edildiği prospektif ve daha büyük gruplarda yapılacak çalışmalar yol gösterici olacaktır.

PIAS proteinleri transkripsiyonda görevli 60'dan fazla protein ile etkileşime girmektedir. Bu protein-protein etkileşimi aktivasyon veya inhibisyon şeklinde ortaya çıkabilmektedir (Conn ve ark., 2016; Rytinki ve ark., 2009; Sharrocks, 2006). STAT-4, STAT ailesine ait bir transkripsiyon faktörüdür. STAT proteinleri CD4⁺ T lenfositlerin Th1 dönüşümü, IL-2'ye IFN- γ yanıtının oluşmasında son derece önemlidir. PIAS4, STAT4 ekspresyonunu baskılamak suretiyle immün süpressif bir durum oluşturmaktadır (Conn ve ark., 2016; Kaplan, 2005; Sharrocks, 2006). Dolayısı ile kontrol altına alınamayan enfeksiyonlarda seviyesinin yüksek olması mikropların PIAS üzerinden immün süpresyon yaparak hastalığın ilerlemesine yol açabileceği, düşük seviyelerde kalmasının ise enfeksiyon ile mücadelenin dolayısı ile enflamasyonun halen devam etmekte olduğu şeklinde yorumlanabilir. Ancak *Brucella*'nın kronikleşmesi için immün sistemden kaçması gerekmektedir. *Brucella* hücre içi ve hücre dışında bugüne kadar gösterilen onlarca mekanizma ile yaşamak için immün süpressif ortam oluşturmaktadır. Aynı şekilde apoptozisi engelleyerek hem immün sistemin yıkıcı etkisinden kaçmakta hem de yaşaması için gerekli olan hücrenin ölümüne de izin vermemektedir. Bizim çalışmamızda akut (7,59 pg/ml) ve kronik (6,87 pg/ml) bruselloz grupları arasında PIAS4 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.189). Ancak akut grup ile kontrol (10,66 pg/ml) (p<0.001), akut grup ile iyileşen (9,98 pg/ml) (p=0.004), kronik ile kontrol (p<0.001) ve kronik ile iyileşen (p<0.001) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Enfeksiyon ile etkin mücadele için *Brucella* varlığında seviyelerinin düşük olması beklenir. Dolayısı ile PIAS4'ün düşük seviyelerinin akut dönemde tanıya yardımcı olarak, titre takiplerindeki düşüklüğün devam etmesi kronikleşmeyi öngörmede, artan seviyeleri ise tedavi yanıtını değerlendirmede bir marker olarak kullanılabilir.

PP2A hücre büyümesinde, hücre bölünmesinde, hücre çoğalması ve apoptoz olmak üzere neredeyse tüm hücrel yaşamsal olaylarda görev almaktadır. Bu nedenle

kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve enflamatuvar hastalıkların tedavisinde önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir (Clark, & Ohlmeyer, 2019; Cohen, 1991; Klumpp, & Krieglstein, 2002). Yaşamsal hücre fonksiyonlarının yerine getirilmesi için fosforilasyon ve defosforilasyon işlemleri denge halinde yürütülmelidir. Bu da fosfataz ve kinaz enzimleri arasındaki hassas denge ile sağlanmaktadır. PP2A tek bir yapı olmayıp değişik fonksiyonlara sahip üç farklı yapıdan oluşan heterotrimerik bir enzimdir. A subuniti iskelet kısmını, C subuniti katalitik kısmını oluştururken fonksiyonel çeşitlilik B subuniti tarafından sağlanmaktadır (Haesen ve ark., 2014; Lambrecht ve ark., 2013). PP2A başta kinaz enzimleri olmak üzere birçok enzimi defosforile etmek suretiyle etki göstermektedir. Bu sayede hücrelerde ve dokularda oluşacak aşırı enflamatuvar yanıt engellenmektedir. PPP2R4, PP2A'nın B subunitlerinden biridir ve PP2A'nın fonksiyonel çeşitliliğini arttırdığı düşünülmektedir. Ancak PPP2R4'ün fonksiyonları tam olarak anlaşılamamıştır ve literatürde yeterli veri bulunmamaktadır.

Çalışmamızda akut (42,85 ng/L) ile kronik (43,50 ng/L) gruplar arasında ve iyileşmiş (3,78 ng/L) ile kontrol (7,52 ng/L) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Akut ile kontrol grupları ($p<0.001$), akut ile iyileşmiş gruplar ($p<0.001$), kronik ile iyileşmiş gruplar ($p<0.001$) ve kronik ile kontrol grupları ($p<0.001$) arasında yüksek istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edildi (Tablo 24). PPP2R4'ün yüksek seviyeleri akut hastalık tanısında, azalan seviyeleri tedaviyi yanıtı değerlendirmede, takip eden titrelerde yüksek seviyeleri kronikleşmeyi öngörmeye bir marker olarak kullanılabilir. Ayrıca immün süpresif etkisi olan PPP2R4'ün hastalık durumunda seviyelerinin yüksek devam etmesi Brucella'nın immün yanıtı kaçmak için bu proteini kullanmış olabileceğini düşündürmektedir.

WDR33 fonksiyonları hakkında literatürde yeterli bilgi olmamakla birlikte, sinyal transdüksiyonu, hücre iskeletinin yeniden yapılandırılması, apoptoz, hücre içi vezikül trafiği ve hücre bölünmesi gibi birçok hücrel olayda görev aldığı bilinmektedir (Silva ve ark., 2005). WDR33 knockout farelerde fertilite ve immün yanıt bozuklukları olduğu gösterilmiştir (Ito ve ark., 2001). Bizim çalışmamızda akut (3,25 pg/ml) ve kronik hasta (3,13 pg/ml) grupları ile iyileşen (2,26 pg/ml) ve kontrol (2,89 pg/ml) grupları arasında WDR33 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0.115$) (Tablo 25). Ancak beklendiği gibi hastalık durumunda WDR33

seviyesi sağlıklı kontrollere göre yüksek seviyede ydi. Anlamlı farkın oluşmaması çalışma grubunun sayısal eksikliğinden kaynaklanacağı gibi *Brucella*’nın immün sistemden kaçacak şekilde immün sistemi düzenlemesi sebebiyle de olmuş olabilir. Ancak mevcut sonuçlar ile WDR33 akut hastalık tanısında, tedaviye yanıt değerlendirmede ve kronikleşmeyi öngörmede iyi bir marker olarak kullanılması mümkün görülmemektedir. Ancak bizim çalışmamız bu konuda ilk çalışmadır ve WDR33’ n bruselloz tanısında, tedavi izleminde ve kronikleşmeyi öngörmedeki rolleri daha büyük prospektif çalışmalar ile yeniden test edilmelidir.

IDO, ince bağırsak, akciğer, kadın genital sistemi ve plasenta gibi birçok dokudan ve hücreden fizyolojik olarak salınmaktadır. Triptofan patojenlerin yaşaması için esansiyel olduğu için IDO enzim aktivitesi patojenleri harap eder (Adams ve ark., 2004; MacKenzie ve ark., 1998; Obojes ve ark., 2005). IDO ekspresyonu IFN-  tarafından indüklenmektedir. IDO, T hücre fonksiyonlarını sınırlayarak ve immün tolerans mekanizmalarını kullanarak immünsüpressif etki göstermektedir. Enflamasyona yanıt olarak immün regülatör hücrelerden ve alternatif yoldan aktive olan makrofajlardan üretilmektedir (Moon ve ark., 2015; Munn, & Mellor, 2013). IDO’nun T ve NK hücrelerini baskıladığı, Treg ve miyeloid kökenli süpressör hücre üretimini arttırdığı ve anjiyogenezi desteklediği bilinmektedir (Prendergast ve ark., 2014). Çalışmamızda akut (6,88 U/L) ile kronik (5,87 U/L) gruplar, iyileşen (75,35 U/L) ile kontrol (79,26 U/L) gruplarının ikili karşılaştırmasında anlamlı fark yoktu. Hasta grupları ile iyileşen ve sağlıklı kontrol grupları arasında ileri düzeyde anlamlı farklılık vardı ($p<0.001$) (Tablo 26). IDO aktivitesi arttığında beklenen net sonuç immünsüpresyon durumudur. Çalışmamızda hasta gruplarında IDO seviyeleri düşük iken iyileşen ve kontrol gruplarında ise yüksekti. Bu durum enflamatuvar sürecin halen devam ettiği dolayısı ile enfeksiyon sürecinin halen devam ettiği şeklinde de yorumlanabilir. Düşük IDO seviyelerinin akut hastalık tanısı koymada, artan seviyelerinin tedaviye yanıt değerlendirmede, takip eden titrelerde düşük seviyede kalmasının kronikleşmeyi öngörmede marker olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak mevcut veriler ile *Brucella*’nın immün sistemden kaçmak için IDO’yu kullandığını söylemek mümkün görünmemektedir.

Çalışmamızda genel olarak bruselloz tanı, tedavi, izlem ve kronikleşmeyi  n gören anlamlı sonuçlar elde edilmiş olmakla birlikte akut, subakut, iyileşen ve

kronikleşen hastalar aynı hastalardan oluşturulamadı. Hasta grupları aynı hasta grupları üzerinden çalışılması protein seviyelerinin izleminde ve değişiminde daha sağlıklı veriler alınmasını sağlayabilirdi. Diğer taraftan subakut vaka sayımız (4 hasta) çok az olduğu için istatistiksel incelemeye dâhil edilemedi. Yeterli sayıda subakut vaka çalışmaya dâhil edilebilseydi, akut ve kronik hastalardan elde edilen protein seviyelerindeki değişim daha net bir şekilde ortaya konabilirdi.

Bruselloz Türkiye'nin dâhil olduğu bazı bölgelerde halen endemik bir hastalıktır. Hastalık tanısında kültür altın standart kabul edilmektedir. Ancak kültürler hastalığın erken döneminde pozitif olup hastalığın geç döneminde çoğunlukla negatif kalmaktadır. Bruselloz tanısında en yaygın olarak SAT kullanılmaktadır. Ancak bu testin prezon, postzon, blokan antikorlar gibi çok sayıda dezavantajı vardır. Tanıda kullanılan ELISA, NAAT, KFT gibi testlerde yalancı negatiflik ve yalancı pozitiflikler görülmektedir. Brusellozun çoğunlukla geri kalmış ülkelerde ve özellikle kırsal alanda sık görülmesine rağmen bu testler çoğunlukla ileri laboratuvar yöntemlerini gerektirmektedir. Halen yüksek duyarlılık ve özgüllüğü olan, ileri laboratuvar imkânları gerektirmeyen, ucuz, güvenilir ve standart bir tanı yöntemi yoktur. Ayrıca mevcut tanı yöntemlerinin tedavi izlemi ve kronikleşmeyi öngörmeye yetersizdirler. ABI3, CLEC12B ve PPP2R4'nin artan seviyeleri akut hastalık tanısında, azalan seviyeleri tedavi yanıtının değerlendirilmesinde, DDIT4L, PIAS4 ve IDO'nun azalan seviyeleri akut hastalık tanısında, artan seviyeleri tedavi yanıtının değerlendirilmesinde bir belirteç olarak kullanılabilir. Ayrıca takip eden titrelerde ABI3, CLEC12B, PIAS4, PPP2R4 ve IDO'nun seviyelerinin aynı düzeyde kalması kronikleşmeyi ön görmede bir belirteç olarak kullanılabilir. Ayrıca elde edilen sonuçlar *Brucella* gizlilik stratejisinin anlaşılmasında yeni ipuçları vermektedir. Ancak bruselloz patogenezinin açıklanması, tanı, tedavi ve kronikleşmeyi öngörmeye bu proteinlerin rutin kullanımı için çok daha büyük hasta gruplarında prospektif kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

- Adams, L. G. (2002). The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the Brucella genome. *Veterinary Microbiology*, 90, 553-561. doi:10.1016/s0378-1135(02)00235-3
- Adams, O., Besken, K., Oberdörfer, C., MacKenzie, C. R., Takikawa, O., & Däubener, W. (2004). Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. *Journal of Virology*, 78(5), 2632-2636. doi:10.1128/jvi.78.5.2632-2636.2004
- Akbulut, H., Kilic, S., Bulut, V., & Ozden, M. (2005). Determination of intracellular cytokines produced by Th1 and Th2 cells using flow cytometry in patients with brucellosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 45(2), 253-258. doi:10.1016/j.femsim.2005.04.001
- Al Dahouk, S., Tomaso, H., Nöckler, K., Neubauer, H., & Frangoulidis, D. (2003). Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis. *Clinical Laboratory*, 49(11-12), 577-589.
- Andriopoulos, P., Tsironi, M., Deftereos, S., Aessopos, A., & Assimakopoulos, G. (2007). Acute brucellosis: presentation, diagnosis, and treatment of 144 cases. *The International Journal of Infectious Diseases*, 11(1), 52-57. doi:10.1016/j.ijid.2005.10.011
- Ariza, J., Bosilkovski, M., Cascio, A., Colmenero, J. D., Corbel, M. J., & Falagas, M. E., International Society of Chemotherapy; Institute of Continuing Medical Education of Ioannina (2007). Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations. *PLoS medicine*, 4(12), e317-e317. doi:10.1371/journal.pmed.0040317
- Bacon, C. M., Petricoin, E., Ortaldo, J. R., Rees, R. C., Lerner, A. C., Johnston, J. A., ... O'Shea, J. J. (1995). Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7307-7311. doi:10.1073/pnas.92.16.7307
- Bae, J., Sung, B. H., Cho, I. H., Kim, S. M., & Song, W. K. (2012). NESH regulates dendritic spine morphology and synapse formation. *PLoS One*, 7(4), e34677. doi:10.1371/journal.pone.0034677

- Bae, J., Sung, B. H., Cho, I. H., & Song, W. K. (2012). F-actin-dependent regulation of NESH dynamics in rat hippocampal neurons. *PLoS One*, 7(4), e34514. doi:10.1371/journal.pone.0034514
- Baldwin, C. L., & Goenka, R. (2006). Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Critical Reviews in Immunology*, 26(5), 407-442. doi:10.1615/critrevimmunol.v26.i5.30
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D. S., Guzmán-Verri, C., Chacón-Díaz, C., Rucavado, A., . . . Moreno, E. (2007). *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One*, 2(7), e631-e631. doi:10.1371/journal.pone.0000631
- Baud, D., & Greub, G. (2011). Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(9), 1312-1322. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03604.
- Bellaire, B. H., Roop, R. M., & Cardelli, J. A. (2005). Opsonized virulent *Brucella abortus* replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes. *Infection and immunity*, 73(6), 3702-3713. doi:10.1128/IAI.73.6.3702-3713.2005
- Ben Sahra, I., Regazzetti, C., Robert, G., Laurent, K., Le Marchand-Brustel, Y., Auberger, P., . . . Bost, F. (2011). Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Research*, 71(13), 4366-4372. doi:10.1158/0008-5472.Can-10-1769
- Bertotto, A., Gerli, R., Spinozzi, F., Muscat, C., Scalise, F., Castellucci, G., . . . Vaccaro, R. (1993). Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection. *European Journal of Immunology*, 23(5), 1177-1180. doi:10.1002/eji.1830230531
- Bessoles, S., Dudal, S., Besra, G. S., Sanchez, F., & Lafont, V. (2009). Human CD4+ invariant NKT cells are involved in antibacterial immunity against *Brucella suis* through CD1d-dependent but CD4-independent mechanisms. *European Journal of Immunology*, 39(4), 1025-1035. doi:10.1002/eji.200838929
- Bessoles, S., Ni, M., Garcia-Jimenez, S., Sanchez, F., & Lafont, V. (2011). Role of NKG2D and its ligands in the anti-infectious activity of V γ 9V δ 2 T cells against intracellular bacteria. *European Journal of Immunology*, 41(6), 1619-1628. doi:10.1002/eji.201041230
- Billard, E., Dornand, J., & Gross, A. (2007). *Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion. *Infection and immunity*, 75(10), 4980-4989. doi:10.1128/IAI.00637-07

- Biyik, I., Oto, O., & Ergene, O. (2007). Brucella pancarditis with dissecting aortic root abscess, left ventricular pseudoaneurysm and ventricular septal defect. *Journal of International Medical Research*, 35(3), 422-426. doi:10.1177/147323000703500318
- Bosilkovski, M., Katerina, S., Zaklina, S., & Ivan, V. (2010). The role of Brucellacapt test for follow-up patients with brucellosis. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 33(5), 435-442. doi:10.1016/j.cimid.2009.06.001
- Bosilkovski, M., Krteva, L., Caparoska, S., & Dimzova, M. (2005). Osteoarticular involvement in brucellosis: Study of 196 cases in the Republic of Macedonia. *Croatian medical journal*, 45, 727-733.
- Brandão, A. P., Oliveira, F. S., Carvalho, N. B., Vieira, L. Q., Azevedo, V., Macedo, G. C., & Oliveira, S. C. (2012). Host susceptibility to Brucella abortus infection is more pronounced in IFN- γ knockout than IL-12/ β 2-microglobulin double-deficient mice. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 589494. doi:10.1155/2012/589494
- Budak, F (2015). Brusellozda, persistan ve kronik enfeksiyon oluşumunda rol oynayan, immünolojik faktörlerin araştırılması. [TÜBİTAK projesi (proje No: 1115182), Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü]
- Budak, F., Bal, S.H., Tezcan, G., Akalın, E.H., Goral, G. & Oral, H.B. (2016). Altered Expressions of miR-1238-3p, miR-494, miR-6069, and miR-139-3p in the Formation of Chronic Brucellosis. *Journal of immunology research*, 2016:4591468 doi:10.1155/2016/4591468
- Budak, F., Bal, S.H., Tezcan, G., Guvenc, F., Akalın, E.H., Goral, G. ... Oral, H.B. (2016) MicroRNA Expression Patterns of CD8+ T Cells in Acute and Chronic Brucellosis. *PLoS One*, 11 e0165138. doi:10.1371/journal.pone.0165138
- Budak, F., Bal, S.H., Tezcan, G., Akalın, E.H., Yılmaz, A., Hız, P. & Oral, H.B. (2018). The microRNA expression signature of CD4+ T cells in the transition of brucellosis into chronicity. *PLoS One*, 13, e0198659. doi:10.1371/journal.pone.0198659. doi:10.1371/journal.pone.0198659
- Buzgan, T., Karahocagil, M. K., Irmak, H., Baran, A. I., Karsen, H., Evirgen, O., ... Akdeniz, H. (2010). Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature. *The International Journal of Infectious Diseases*, 14(6), e469-478. doi:10.1016/j.ijid.2009.06.031

- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., . . . Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415(6867), 92-96. doi:10.1038/415092a
- Calik, S., & Gokengin, A. (2011). Human brucellosis in Turkey: a review of the literature between 1990 and 2009. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 41, 549-555. doi:10.3906/sag-0911-404
- Cambi, A., & Figdor, C. (2009). Necrosis: C-type lectins sense cell death. *Current Biology*, 19(9), R375-378. doi:10.1016/j.cub.2009.03.032
- Campos, M. A., Rosinha, G. M. S., Almeida, I. C., Salgueiro, X. S., Jarvis, B. W., Splitter, G. A., . . . Oliveira, S. C. (2004). Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infection and immunity*, 72(1), 176-186. doi:10.1128/iai.72.1.176-186.2004
- Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V., & Oliveira, S. C. (2006). *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories*, 5, 13. doi:10.1186/1475-2859-5-13
- Carvalho Neta, A. V., Stynen, A. P. R., Paixão, T. A., Miranda, K. L., Silva, F. L., Roux, C. M., . . . Santos, R. L. (2008). Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infection and immunity*, 76(5), 1897-1907. doi:10.1128/iai.01554-07
- Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., . . . Raschellà, G. (2017). Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discovery*, 3, 17071. doi:10.1038/cddiscovery.2017.71
- Castañeda-Roldán, E. I., Avelino-Flores, F., Dall'Agnol, M., Freer, E., Cedillo, L., Dornand, J., & Girón, J. A. (2004). Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cellular Microbiology*, 6(5), 435-445. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00372.x
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.-M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., & Gorvel, J.-P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *The Journal of experimental medicine*, 198(4), 545-556. doi:10.1084/jem.20030088
- Charles A. Janeway, J., & Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 197-216. doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
- Chaudhary, A., Ganguly, K., Cabantous, S., Waldo, G. S., Micheva-Viteva, S. N., Nag, K., . . . Tung, C.-S. (2012). The *Brucella* TIR-like protein TcpB interacts with the death domain of MyD88. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(1), 299-304. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.104

- Cho, U. S., & Xu, W. (2007). Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature*, 445(7123), 53-57. doi:10.1038/nature05351
- Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., & Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, 278(5344), 1803-1805. doi:10.1126/science.278.5344.1803
- Clark, A. R., & Ohlmeyer, M. (2019). Protein phosphatase 2A as a therapeutic target in inflammation and neurodegeneration. *Pharmacology & Therapeutics*, 201, 181-201. doi:https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.05.016
- Cohen, P. (1991). Classification of protein-serine/threonine phosphatases: identification and quantitation in cell extracts. *Methods in Enzymology*, 201, 389-398. doi:10.1016/0076-6879(91)01035-z
- Comerci, D. J., Martínez-Lorenzo, M. J., Sieira, R., Gorvel, J. P., & Ugalde, R. A. (2001). Essential role of the VirB machinery in the maturation of the Brucella abortus-containing vacuole. *Cellular Microbiology*, 3(3), 159-168. doi:10.1046/j.1462-5822.2001.00102.x
- Conde-Álvarez, R., Arce-Gorvel, V., Iriarte, M., Manček-Keber, M., Barquero-Calvo, E., Palacios-Chaves, L., . . . Gorvel, J. P. (2012). The lipopolysaccharide core of Brucella abortus acts as a shield against innate immunity recognition. *PLOS Pathogens*, 8(5), e1002675. doi:10.1371/journal.ppat.1002675
- Conn, K. L., Wasson, P., McFarlane, S., Tong, L., Brown, J. R., Grant, K. G., . . . Boutell, C. (2016). Novel Role for Protein Inhibitor of Activated STAT 4 (PIAS4) in the Restriction of Herpes Simplex Virus 1 by the Cellular Intrinsic Antiviral Immune Response. *Journal of Virology*, 90(9), 4807-4826. doi:10.1128/jvi.03055-15
- Corbel, M. J. (2006). *Brucellosis in humans and animals*. Geneva: World Health Organization.
- Davies, G., & Casey, A. (1973). The survival of Brucella abortus in milk and milk products. *British Veterinary Journal*, 129(4), 345-353. doi:10.1016/s0007-1935(17)36436-9
- de Barsy, M., Jamet, A., Filopon, D., Nicolas, C., Laloux, G., Rual, J. F., . . . De Bolle, X. (2011). Identification of a Brucella spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. *Cellular Microbiology*, 13(7), 1044-1058. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01601.x
- de Figueiredo, P., Ficht, T. A., Rice-Ficht, A., Rossetti, C. A., & Adams, L. G. (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of Brucella-host interactions. *The American Journal of Pathology*, 185(6), 1505-1517. doi:10.1016/j.ajpath.2015.03.003

- de Jong, M. F., Starr, T., Winter, M. G., den Hartigh, A. B., Child, R., Knodler, L. A., . . . Tsolis, R. M. (2013). Sensing of bacterial type IV secretion via the unfolded protein response. *mBio*, 4(1), e00418-00412. doi:10.1128/mBio.00418-12
- Delpino, M. V., Fossati, C. A., & Baldi, P. C. (2009). Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with *Brucella* spp. *Infection and Immunity*, 77(3), 984-995. doi:10.1128/iai.01259-08
- Delrue, R. M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., . . . Letesson, J. J. (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cellular Microbiology*, 3(7), 487-497. doi:10.1046/j.1462-5822.2001.00131.x
- Demir, C., Karahocagil, M. K., Esen, R., Atmaca, M., Gönüllü, H., & Akdeniz, H. (2012). Bone marrow biopsy findings in brucellosis patients with hematologic abnormalities. *Chinese Medical Journal*, 125(11), 1871-1876.
- Dieli, F., Ivanyi, J., Marsh, P., Williams, A., Naylor, I., Sireci, G., . . . Salerno, A. (2003). Characterization of lung gamma delta T cells following intranasal infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *The Journal of Immunology*, 170(1), 463-469. doi:10.4049/jimmunol.170.1.463
- Dornand, J., Lafont, V., Oliaro, J., Terraza, A., Castaneda-Roldan, E., & Liautard, J.-P. (2004). Impairment of intramacrophagic *Brucella suis* multiplication by human natural killer cells through a contact-dependent mechanism. *Infection and immunity*, 72(4), 2303-2311. doi:10.1128/iai.72.4.2303-2311.2004
- Doyle, A. G., Halliday, W. J., Barnett, C. J., Dunn, T. L., & Hume, D. A. (1992). Effect of recombinant human macrophage colony-stimulating factor 1 on immunopathology of experimental brucellosis in mice. *Infection and Immunity*, 60(4), 1465-1472. doi: 10.1128/iai.60.4.1465-1472.1992
- Döhmer, P. H., Valguarnera, E., Czibener, C., & Ugalde, J. E. (2014). Identification of a type IV secretion substrate of *Brucella abortus* that participates in the early stages of intracellular survival. *Cellular Microbiology*, 16(3), 396-410. doi:10.1111/cmi.12224
- Drickamer, K. (1999). C-type lectin-like domains. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(5), 585-590. doi:10.1016/s0959-440x(99)00009-3
- Dudal, S., Turriere, C., Bessoles, S., Fontes, P., Sanchez, F., Liautard, J., . . . Lafont, V. (2006). Release of LL-37 by activated human Vgamma9Vdelta2 T cells: a microbicidal weapon against *Brucella suis*. *Journal of immunology*, 177(8), 5533-5539. doi:10.4049/jimmunol.177.8.5533

- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., & Kirschner, M. W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*, 418(6899), 790-793. doi:10.1038/nature00859
- Eiden, A. M., Zhang, S., Gary, J. M., Simmons, J. K., & Mock, B. A. (2016). Molecular Pathways: Increased Susceptibility to Infection Is a Complication of mTOR Inhibitor Use in Cancer Therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(2), 277-283. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3239
- Elfaki, M. G., & Al-Hokail, A. A. (2009). Transforming growth factor beta production correlates with depressed lymphocytes function in humans with chronic brucellosis. *Microbes and Infection*, 11(14-15), 1089-1096. doi:10.1016/j.micinf.2009.08.001
- Ellisen, L. W., Ramsayer, K. D., Johannessen, C. M., Yang, A., Beppu, H., Minda, K., . . . Haber, D. A. (2002). REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species. *Molecular Cell*, 10(5), 995-1005. doi:10.1016/s1097-2765(02)00706-2
- Erdem, H., Elaldi, N., Ak, O., Gulsun, S., Tekin, R., Ulug, M., . . . Agalar, C. (2014). Genitourinary brucellosis: results of a multicentric study. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(11), O847-853. doi:10.1111/1469-0691.12680
- Erdem, H., Elaldi, N., Batirel, A., Aliyu, S., Sengoz, G., Pehlivanoglu, F., . . . Vahaboglu, H. (2015). Comparison of brucellar and tuberculous spondylodiscitis patients: results of the multicenter "Backbone-1 Study". *The Spine Journal*, 15(12), 2509-2517. doi:10.1111/1469-0691.12680
- Erdem, H., Inan, A., Guven, E., Hargreaves, S., Larsen, L., Shehata, G., . . . Nassar, M. (2017). The burden and epidemiology of community-acquired central nervous system infections: a multinational study. *The European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(9), 1595-1611. doi:10.1007/s10096-017-2973-0
- Fernandes, D. M., Jiang, X., Jung, J. H., & Baldwin, C. L. (1996). Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 16(3-4), 193-203. doi:10.1111/j.1574-695X.1996.tb00136.x
- Ficht, T. A. (2002). Discovery of *Brucella* virulence mechanisms using mutational analysis. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), 311-315. doi:10.1016/s0378-1135(02)00216-x
- Fontana, C., Conde-Álvarez, R., Ståhle, J., Holst, O., Iriarte, M., Zhao, Y., . . . Widmalm, G. (2016). Structural Studies of Lipopolysaccharide-defective Mutants from *Brucella melitensis* Identify a Core Oligosaccharide Critical in Virulence. *The*

Journal of biological chemistry, 291(14), 7727-7741.
doi:10.1074/jbc.M115.701540

- Franco, M. P., Mulder, M., Gilman, R. H., & Smits, H. L. (2007). Human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(12), 775-786. doi:10.1016/s1473-3099(07)70286-4
- Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., & Ferrara, G. B. (2002). Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of Experimental Medicine*, 196(4), 459-468. doi:10.1084/jem.20020121
- Gao, N., Jennings, P., Guo, Y., & Yuan, D. (2011). Regulatory role of natural killer (NK) cells on antibody responses to *Brucella abortus*. *Innate Immunity*, 17(2), 152-163. doi:10.1177/1753425910367526
- Garcell, H. G., Garcia, E. G., Pueyo, P. V., Martín, I. R., Arias, A. V., & Alfonso Serrano, R. N. (2016). Outbreaks of brucellosis related to the consumption of unpasteurized camel milk. *The Journal of Infection and Public Health*, 9(4), 523-527. doi:10.1016/j.jiph.2015.12.006
- Giambartolomei, G. H., Delpino, M. V., Cahanovich, M. E., Wallach, J. C., Baldi, P. C., Velikovsky, C. A., & Fossati, C. A. (2002). Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to *Brucella* cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis. *Journal of Infectious Diseases*, 186(2), 252-259. doi:10.1086/341449
- Giambartolomei, G. H., Scian, R., Acosta-Rodríguez, E., Fossati, C. A., & Delpino, M. V. (2012). *Brucella abortus*-Infected Macrophages Modulate T Lymphocytes to Promote Osteoclastogenesis via IL-17. *The American Journal of Pathology*, 181(3), 887-896. . doi:https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.05.029
- Goenka, R., Guirnalda, P. D., Black, S. J., & Baldwin, C. L. (2012). B Lymphocytes provide an infection niche for intracellular bacterium *Brucella abortus*. *The Journal of infectious diseases*, 206(1), 91-98. doi:10.1093/infdis/jis310
- Goenka, R., Parent, M. A., Elzer, P. H., & Baldwin, C. L. (2011). B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus*. *Journal of Infectious Diseases*, 203(8), 1136-1146. doi:10.1093/infdis/jiq171
- Grilló, M. J., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., Moriyón, I., & Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Veterinary Research*, 43(1), 29. doi:10.1186/1297-9716-43-29

- Guerrier, G., Daronat, J. M., Morisse, L., Yvon, J. F., & Pappas, G. (2011). Epidemiological and clinical aspects of human *Brucella suis* infection in Polynesia. *Epidemiology and Infection*, 139(10), 1621-1625. doi:10.1017/s0950268811001075
- Gul, H., & Erdem, H. (2019). Brucellosis (*Brucella* Species). In R. D. John Bennett, Martin J. Blaser (Ed.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (9 ed., Vol. 2, pp. 2753-2758). Philadelphia: Elsevier.
- Gul, H. C., Erdem, H., & Bek, S. (2009). Overview of neurobrucellosis: a pooled analysis of 187 cases. *The International Journal of Infectious Diseases*, 13(6), e339-343. doi:10.1016/j.ijid.2009.02.015
- Haesen, D., Sents, W., Lemaire, K., Hoorne, Y., & Janssens, V. (2014). The Basic Biology of PP2A in Hematologic Cells and Malignancies. *Frontiers in Oncology*, 4, 347. doi:10.3389/fonc.2014.00347
- Halling, S. M., Peterson-Burch, B. D., Bricker, B. J., Zuerner, R. L., Qing, Z., Li, L. L., . . . Olsen, S. C. (2005). Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Journal of Bacteriology*, 187(8), 2715-2726.
- Hirao, N., Sato, S., Gotoh, T., Maruoka, M., Suzuki, J., Matsuda, S., . . . Tani, K. (2006). NESH (Abi-3) is present in the Abi/WAVE complex but does not promote c-Abl-mediated phosphorylation. *FEBS Letters*, 580(27), 6464-6470. doi:10.1016/j.febslet.2006.10.065
- Hoffmann, S. C., Schellack, C., Textor, S., Konold, S., Schmitz, D., Cerwenka, A., . . . Watzl, C. (2007). Identification of CLEC12B, an inhibitory receptor on myeloid cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22370-22375. doi:10.1074/jbc.M704250200
- Holland, J. J., & Pickett, M. J. (1958). A cellular basis of immunity in experimental *Brucella* infection. *The Journal of experimental medicine*, 108(3), 343-360. doi:10.1084/jem.108.3.343
- Hong, P. C., Tsolis, R. M., & Ficht, T. A. (2000). Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infection and Immunity*, 68(7), 4102-4107. doi:10.1128/iai.68.7.4102-4107.2000
- Hossain, S., Dubielecka, P. M., Sikorski, A. F., Birge, R. B., & Kotula, L. (2012). Crk and ABI1: binary molecular switches that regulate abl tyrosine kinase and signaling to the cytoskeleton. *Genes Cancer*, 3(5-6), 402-413. doi:10.1177/1947601912460051
- Huang, L.-Y., Ishii, K. J., Akira, S., Aliberti, J., & Golding, B. (2005). Th1-Like Cytokine Induction by Heat-Killed *Brucella abortus* Is Dependent on Triggering of

- TLR9. *The Journal of Immunology*, 175(6), 3964-3970. doi:10.4049/jimmunol.175.6.3964
- Ichigotani, Y., Fujii, K., Hamaguchi, M., & Matsuda, S. (2002). In search of a function for the E3B1/Abi2/Argbp1/NESH family (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 9(6), 591-595.
- Ichigotani, Y., Yokozaki, S., Fukuda, Y., Hamaguchi, M., & Matsuda, S. (2002). Forced Expression of NESH Suppresses Motility and Metastatic Dissemination of Malignant Cells. *Cancer Research*, 62(8), 2215-2219.
- Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L. B., Steffen, A., . . . Scita, G. (2004). Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nature Cell Biology*, 6(4), 319-327. doi:10.1038/ncb1105
- Ito, S., Sakai, A., Nomura, T., Miki, Y., Ouchida, M., Sasaki, J., & Shimizu, K. (2001). A Novel WD40 Repeat Protein, WDC146, Highly Expressed during Spermatogenesis in a Stage-Specific Manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(3), 656-663. doi:https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4163
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5(10), 987-995. doi:10.1038/ni1112
- Jimenez de Bagues, M.-P., Dudal, S., Dornand, J., & Gross, A. (2005). Cellular bioterrorism: how Brucella corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 114(3), 227-238. doi:10.1016/j.clim.2004.07.010
- Kaplan-Türköz, B., Koelblen, T., Felix, C., Candusso, M.-P., O'Callaghan, D., Vergunst, A. C., & Terradot, L. (2013). Structure of the Toll/interleukin 1 receptor (TIR) domain of the immunosuppressive Brucella effector BtpA/Btp1/TcpB. *FEBS Letters*, 587(21), 3412-3416. doi:https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.09.007
- Kaplan, M. (2005). STAT4: A Critical Regulator of Inflammation In Vivo. *Immunologic research*, 31, 231-242. doi:10.1385/IR:31:3:231
- Karaali, Z., Baysal, B., Poturoglu, S., & Kendir, M. (2011). Cutaneous manifestations in brucellosis. *Indian journal of dermatology*, 56(3), 339-340. doi:10.4103/0019-5154.82505
- Kerrinnes, T., Young, B. M., Leon, C., Roux, C. M., Tran, L., Atluri, V. L., . . . Tsohis, R. M. (2015). Phospholipase A1 modulates the cell envelope phospholipid content of Brucella melitensis, contributing to polymyxin resistance and pathogenicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(11), 6717-6724. doi:10.1128/AAC.00792-15

- Kilic, S. S., Akbulut, H. H., Ozden, M., & Bulut, V. (2009). Gamma/delta T cells in patients with acute brucellosis. *Clinical and Experimental Medicine*, 9(2), 101-104. doi:10.1007/s10238-008-0021-1
- Kinikli, S., Turkcapar, N., Kucukay, M. B., Keskin, G., & Kinikli, G. (2005). In vitro nonspecific mitogenic response of T-cell subsets in acute and chronic brucellosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 52(3), 229-233. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2005.02.016
- Klumpp, S., & Krieglstein, J. (2002). Serine/threonine protein phosphatases in apoptosis. *Current Opinion in Pharmacology*, 2(4), 458-462. doi:10.1016/s1471-4892(02)00176-5
- Koruk, S. T., Erdem, H., Koruk, I., Erbay, A., Tezer-Tekce, Y., Erbay, A. R., . . . Savasci, U. (2012). Management of Brucella endocarditis: results of the Gulhane study. *The International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(2), 145-150. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.04.009
- Kreutzer, D. L., Dreyfus, L. A., & Robertson, D. C. (1979). Interaction of polymorphonuclear leukocytes with smooth and rough strains of Brucella abortus. *Infection and immunity*, 23(3), 737-742. doi:10.1128/iai.23.3.737-742.1979
- Krishna, S. S., Majumdar, I., & Grishin, N. V. (2003). Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Research*, 31(2), 532-550. doi:10.1093/nar/gkg161
- Kuballa, P., Nolte, W. M., Castoreno, A. B., & Xavier, R. J. (2012). Autophagy and the immune system. *Annual Review of Immunology*, 30, 611-646. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074948
- Kubota, K. (2010). Innate IFN-gamma production by subsets of natural killer cells, natural killer T cells and gammadelta T cells in response to dying bacterial-infected macrophages. *The Scandinavian Journal of Immunology*, 71(3), 199-209. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02366.x
- Laity, J. H., Lee, B. M., & Wright, P. E. (2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(1), 39-46. doi:10.1016/s0959-440x(00)00167-6
- Lambrecht, C., Haesen, D., Sents, W., Ivanova, E., & Janssens, V. (2013). Structure, regulation, and pharmacological modulation of PP2A phosphatases. *Methods in Molecular Biology*, 1053, 283-305. doi:10.1007/978-1-62703-562-0_17
- Lamontagne, J., Forest, A., Marazzo, E., Denis, F., Butler, H., Michaud, J. F., . . . Paramithiotis, E. (2009). Intracellular adaptation of Brucella abortus. *Journal of Proteome Research*, 8(3), 1594-1609. doi:10.1021/pr800978p

- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2005). Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current Opinion in Microbiology*, 8(1), 60-66. doi:10.1016/j.mib.2004.12.003
- Lecároz, C., Blanco-Prieto, M. J., Burrell, M. A., & Gamazo, C. (2006). Intracellular killing of Brucella melitensis in human macrophages with microsphere-encapsulated gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(3), 549-556. doi:10.1093/jac/dkl257
- Li, J., Li, Y., Wang, Y., Huo, N., Wan, H., Lin, X., . . . Zhao, H. (2014). Renal abscess caused by Brucella. *The International Journal of Infectious Diseases*, 28, 26-28. doi:10.1016/j.ijid.2014.07.019
- Li, Y.-H., & Liu, T.-B. (2020). Zinc Finger Proteins in the Human Fungal Pathogen Cryptococcus neoformans. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1361. doi:10.3390/ijms21041361
- Lin, X. H., Walter, J., Scheidtmann, K., Ohst, K., Newport, J., & Walter, G. (1998). Protein phosphatase 2A is required for the initiation of chromosomal DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14693-14698. doi:10.1073/pnas.95.25.14693
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D., & Shuai, K. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), 10626-10631. doi:10.1073/pnas.95.18.10626
- Macedo, G. C., Magnani, D. M., Carvalho, N. B., Bruna-Romero, O., Gazzinelli, R. T., & Oliveira, S. C. (2008). Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control Brucella abortus infection. *The Journal of Immunology*, 180(2), 1080-1087. doi:10.4049/jimmunol.180.2.1080
- Mackaness, G. B. (1964). The Immunological Basis Of Acquired Cellular Resistance. *Journal of Experimental Medicine*, 120(1), 105-120. doi:10.1084/jem.120.1.105
- MacKenzie, C. R., Hadding, U., xe, & Ubener, W. (1998). Interferon-Induced Activation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Cord Blood Monocyte-Derived Macrophages Inhibits the Growth of Group B Streptococci. *The Journal of Infectious Diseases*, 178(3), 875-878. https://doi.org/10.1086/515347
- Mancini, F. R., Bella, A., Graziani, C., Marianelli, C., Mughini-Gras, L., Pasquali, P., . . . Busani, L. (2014). Trends of human brucellosis in Italy, 1998–2010. *Epidemiology and Infection*, 142(6), 1188-1195. doi:10.1017/S0950268813002227

- Manson-Bahr, P., & Willoughby, H. (1929). A Critical Study Of Undulant Fever: From A Series Of Six Cases In The Hospital For Tropical Diseases, London. *British Medical Journal*, 1(3561), 633-635. doi:10.1136/bmj.1.3561.633
- Manterola, L., Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Barquero-Calvo, E., de Miguel, M.-J., Moriyón, I., . . . Moreno, E. (2007). BvrR/BvrS-Controlled Outer Membrane Proteins Omp3a and Omp3b Are Not Essential for *Brucella abortus* Virulence. *Infection and Immunity*, 75(10), 4867-4874. doi:10.1128/iai.00439-07
- Martirosyan, A., & Gorvel, J. P. (2013). *Brucella* evasion of adaptive immunity. *Future Microbiol*, 8(2), 147-154.
- Martirosyan, A., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunological Reviews*, 240(1), 211-234. doi:10.2217/fmb.12.140
- Matsuda, S., Ichigotani, Y., Okumura, N., Yoshida, H., Kajiya, Y., Kitagishi, Y., & Shirafuji, N. (2008). NESH protein expression switches to the adverse effect of imatinib mesylate. *Molecular oncology*, 2(1), 16-19. doi:10.1016/j.molonc.2008.03.003
- Mellor, A. L., Lemos, H., & Huang, L. (2017). Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tolerance: Where Are We Now? *Frontiers in immunology*, 8, 1360-1360. doi:10.3389/fimmu.2017.01360
- Mermut, G., Özgenç, O., Avcı, M., Olut, A. I., Öktem, E., Genç, V. E., . . . Coskuner, S. A. (2012). Clinical, Diagnostic and Therapeutic Approaches to Complications of Brucellosis: An Experience of 12 Years. *Medical Principles and Practice*, 21(1), 46-50. doi:10.1159/000331588
- Miyazaki, K., Matsuda, S., Ichigotani, Y., Takenouchi, Y., Hayashi, K., Fukuda, Y., . . . Hamaguchi, M. (2000). Isolation and characterization of a novel human gene (NESH) which encodes a putative signaling molecule similar to e3B1 protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1493(1-2), 237-241. doi:10.1016/s0167-4781(00)00158-5
- Moon, Y. W., Hajjar, J., Hwu, P., & Naing, A. (2015). Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *The Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 3, 51. doi:10.1186/s40425-015-0094-9
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*, 136(7), 2348-2357.
- Mumby, M. (2007). PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell*, 130(1), 21-24. doi:10.1016/j.cell.2007.06.034

- Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2013). Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends in immunology*, 34(3), 137-143. doi:10.1016/j.it.2012.10.001
- Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., & Mellor, A. L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *The Journal of experimental medicine*, 189(9), 1363-1372. doi:10.1084/jem.189.9.1363
- Myeni, S., Child, R., Ng, T. W., Kupko, J. J., 3rd, Wehrly, T. D., Porcella, S. F., . . . Celli, J. (2013). Brucella modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins. *PLOS Pathogens*, 9(8), e1003556. doi:10.1371/journal.ppat.1003556
- Nyirenda, T. S., Seeley, A. E., Mandala, W. L., Drayson, M. T., & MacLennan, C. A. (2010). Early interferon- γ production in human lymphocyte subsets in response to nontyphoidal Salmonella demonstrates inherent capacity in innate cells. *PLoS One*, 5(10), e13667. doi:10.1371/journal.pone.0013667
- O'Callaghan, D., Cazevielle, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M. L., Bourg, G., Foulongne, V., . . . Ramuz, M. (1999). A homologue of the Agrobacterium tumefaciens VirB and Bordetella pertussis Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of Brucella suis. *Molecular Microbiology*, 33(6), 1210-1220. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01569.x
- Obojes, K., Andres, O., Kim, K. S., Däubener, W., & Schneider-Schaulies, J. (2005). Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates cell type-specific anti-measles virus activity of gamma interferon. *Journal of virology*, 79(12), 7768-7776. doi:10.1128/jvi.79.12.7768-7776.2005
- Oliaro, J., Dudal, S., Liautard, J., Andrault, J. B., Liautard, J. P., & Lafont, V. (2005). Vgamma9Vdelta2 T cells use a combination of mechanisms to limit the spread of the pathogenic bacteria Brucella. *Journal of Leukocyte Biology*, 77(5), 652-660. doi:10.1189/jlb.0704433
- Oliveira, S. C., de Almeida, L. A., Carvalho, N. B., Oliveira, F. S., & Lacerda, T. L. S. (2012). Update on the role of innate immune receptors during Brucella abortus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 148(1-2), 129-135. doi:10.1016/j.vetimm.2011.05.036
- Oliveira, S. C., & Splitter, G. A. (1995). CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular Brucella abortus infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. *European Journal of Immunology*, 25(9), 2551-2557. doi:10.1002/eji.1830250922
- Ottones, F., Dornand, J., Naroeni, A., Liautard, J. P., & Favero, J. (2000). V gamma 9V delta 2 T cells impair intracellular multiplication of Brucella suis in autologous monocytes through soluble factor release and contact-dependent cytotoxic

- effect. *The Journal of Immunology*, 165(12), 7133-7139. doi:10.4049/jimmunol.165.12.7133
- Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., & Tsianos, E. (2005). Brucellosis. *The New England Journal of Medicine*, 352(22), 2325-2336. doi:10.1056/NEJMra050570
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., & Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(2), 91-99. doi:10.1016/s1473-3099(06)70382-6
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*, 357(9270), 1777-1789. doi:10.1016/s0140-6736(00)04904-7
- Paulsen, I. T., Seshadri, R., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Read, T. D., . . . Fraser, C. M. (2002). The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 13148-13153. doi:10.1073/pnas.192319099
- Prendergast, G. C., Smith, C., Thomas, S., Mandik-Nayak, L., Laury-Kleintop, L., Metz, R., & Muller, A. J. (2014). Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(7), 721-735. doi:10.1007/s00262-014-1549-4
- Qin, Q.-M., Pei, J., Ancona, V., Shaw, B. D., Ficht, T. A., & de Figueiredo, P. (2008). RNAi screen of endoplasmic reticulum-associated host factors reveals a role for IRE1alpha in supporting *Brucella* replication. *PLoS pathogens*, 4(7), e1000110-e1000110. doi:10.1371/journal.ppat.1000110
- Radhakrishnan, G. K., Yu, Q., Harms, J. S., & Splitter, G. A. (2009). *Brucella* TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP. *The Journal of biological chemistry*, 284(15), 9892-9898. doi:10.1074/jbc.M805458200
- Rafiei, A., Ardestani, S. K., Kariminia, A., Keyhani, A., Mohraz, M., & Amirkhani, A. (2006). Dominant Th1 cytokine production in early onset of human brucellosis followed by switching towards Th2 along prolongation of disease. *The Journal of Infection*, 53(5), 315-324. doi:10.1016/j.jinf.2005.11.024
- Rambow-Larsen, A. A., Rajashekara, G., Petersen, E., & Splitter, G. (2008). Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *Journal of bacteriology*, 190(9), 3274-3282. doi:10.1128/JB.01915-07
- Rittig, M. G., Alvarez-Martinez, M. T., Porte, F., Liautard, J. P., & Rouot, B. (2001). Intracellular survival of *Brucella* spp. in human monocytes involves

conventional uptake but special phagosomes. *Infection and Immunity*, 69(6), 3995-4006. doi:10.1128/iai.69.6.3995-4006.2001

- Rodríguez-Zapata, M., Matías, M. J., Prieto, A., Jonde, M. A., Monserrat, J., Sánchez, L., . . . Alvarez-Mon, M. (2010). Human brucellosis is characterized by an intense Th1 profile associated with a defective monocyte function. *Infection and immunity*, 78(7), 3272-3279. doi:10.1128/IAI.01385-09
- Rolando, I., Olarte, L., Vilchez, G., Lluncor, M., Otero, L., Paris, M., . . . Gotuzzo, E. (2008). Ocular manifestations associated with brucellosis: a 26-year experience in Peru. *Clinical Infectious Diseases*, 46(9), 1338-1345. doi:10.1086/529442
- Rossetti, C. A., Drake, K. L., & Adams, L. G. (2012). Transcriptome analysis of HeLa cells response to *Brucella melitensis* infection: a molecular approach to understand the role of the mucosal epithelium in the onset of the *Brucella* pathogenesis. *Microbes and Infection*, 14(9), 756-767. doi:10.1016/j.micinf.2012.03.003
- Rossetti, C. A., Drake, K. L., Siddavatam, P., Lawhon, S. D., Nunes, J. E. S., Gull, T., . . . Adams, L. G. (2013). Systems biology analysis of *Brucella* infected Peyer's patch reveals rapid invasion with modest transient perturbations of the host transcriptome. *PLoS One*, 8(12), e81719-e81719. doi:10.1371/journal.pone.0081719
- Roux, C. M., Rolán, H. G., Santos, R. L., Beremand, P. D., Thomas, T. L., Adams, L. G., & Tsolis, R. M. (2007). *Brucella* requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. *Cellular Microbiology*, 9(7), 1851-1869. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00922.x
- Rytinki, M. M., Kaikkonen, S., Pehkonen, P., Jääskeläinen, T., & Palvimo, J. J. (2009). PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(18), 3029-3041. doi:10.1007/s00018-009-0061-z
- Sada-Ovalle, I., Chiba, A., Gonzales, A., Brenner, M. B., & Behar, S. M. (2008). Innate invariant NKT cells recognize *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages, produce interferon-gamma, and kill intracellular bacteria. *PLOS Pathogens*, 4(12), e1000239. doi:10.1371/journal.ppat.1000239
- Salcedo, S. P., Marchesini, M. I., Degos, C., Terwagne, M., Von Bargen, K., Lepidi, H., . . . Gorvel, J.-P. (2013). BtpB, a novel *Brucella* TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 28. doi:10.3389/fcimb.2013.00028.
- Salcedo, S. P., Marchesini, M. I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., . . . Gorvel, J.-P. (2008). *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS pathogens*, 4(2), e21-e21. doi:10.1371/journal.ppat.0040021

- Salmerón, I., Rodríguez-Zapata, M., Salmerón, O., Manzano, L., Vaquer, S., & Alvarez-Mon, M. (1992). Impaired Activity of Natural Killer Cells in Patients with Acute Brucellosis. *Clinical Infectious Diseases*, 15(5), 764-770. doi:10.1093/clind/15.5.764
- Sanaei Dashti, A., & Karimi, A. (2013). Skeletal Involvement of *Brucella melitensis* in Children: A Systematic Review. *The Iranian Journal of Medical Sciences*, 38(4), 286-292.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6), 596-603. doi:10.1016/j.ceb.2005.09.009
- Scholz, H., Hubalek, Z., Nesvadbova, J., Tomaso, H., Vergnaud, G., Le Flèche, P., . . . Pfeiffer, M. (2008). Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerging infectious diseases*, 14(8), 1316-1317. doi:10.3201/eid1408.080286
- Scholz, H., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., . . . De, B. K. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *The International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 4), 801-808. doi:10.1099/ijs.0.011148-0
- Sekino, S., Kashiwagi, Y., Kanazawa, H., Takada, K., Baba, T., Sato, S., . . . Tani, K. (2015). The NESH/Abi-3-based WAVE2 complex is functionally distinct from the Abi-1-based WAVE2 complex. *Cell communication and signaling : CCS*, 13, 41-41. doi:10.1186/s12964-015-0119-5
- Sengupta, D., Koblansky, A., Gaines, J., Brown, T., West, A. P., Zhang, D., . . . Ghosh, S. (2010). Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(2), 956-964. doi:10.4049/jimmunol.0902008
- Shaffer, A. L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N. N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., . . . Staudt, L. M. (2004). XBP1, Downstream of Blimp-1, Expands the Secretory Apparatus and Other Organelles, and Increases Protein Synthesis in Plasma Cell Differentiation. *Immunity*, 21(1), 81-93. doi:https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.010
- Sharrocks, A. D. (2006). PIAS proteins and transcriptional regulation--more than just SUMO E3 ligases? *Genes & Development*, 20(7), 754-758. doi:10.1101/gad.1421006
- Shoshani, T., Faerman, A., Mett, I., Zelin, E., Tenne, T., Gorodin, S., . . . Feinstein, E. (2002). Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 22(7), 2283-2293. doi:10.1128/mcb.22.7.2283-2293.2002

- Siengsan-Lamont, J., & Blacksell, S. D. (2018). A Review of Laboratory-Acquired Infections in the Asia-Pacific: Understanding Risk and the Need for Improved Biosafety for Veterinary and Zoonotic Diseases. *Tropical medicine and infectious disease*, 3(2), 36. doi:10.3390/tropicalmed3020036
- Silva, F. P., Hamamoto, R., Nakamura, Y., & Furukawa, Y. (2005). WDRPUH, a novel WD-repeat-containing protein, is highly expressed in human hepatocellular carcinoma and involved in cell proliferation. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 7(4), 348-355. doi:10.1593/neo.04544
- Skendros, P., & Boura, P. (2013). Immunity to brucellosis. *Revue scientifique et technique*, 32(1), 137-147. doi:10.20506/rst.32.1.2190
- Skendros, P., Boura, P., Kamaria, F., & Raptopoulou-Gigi, M. (2006). CD80/CD28 co-stimulation in human brucellosis. *Clinical & Experimental Immunology*, 146(3), 400-408. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03223.x
- Skendros, P., & Mitroulis, I. (2012). Host cell autophagy in immune response to zoonotic infections. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 910525. doi:10.1155/2012/910525
- Skendros, P., Pappas, G., & Boura, P. (2011). Cell-mediated immunity in human brucellosis. *Microbes and Infection*, 13(2), 134-142. doi:10.1016/j.micinf.2010.10.015
- Skendros, P., Sarantopoulos, A., Tselios, K., & Boura, P. (2008). Chronic brucellosis patients retain low frequency of CD4⁺ T-lymphocytes expressing CD25 and CD28 after Escherichia coli LPS stimulation of PHA-cultured PBMCs. *Clinical & developmental immunology*, 2008, 327346-327346. doi:10.1155/2008/327346
- Skyberg, J. A., Thornburg, T., Rollins, M., Huarte, E., Jutila, M. A., & Pascual, D. W. (2011). Murine and bovine $\gamma\delta$ T cells enhance innate immunity against *Brucella abortus* infections. *PLoS One*, 6(7), e21978. doi:10.1371/journal.pone.0021978
- Smith, J. A., Khan, M., Magnani, D. D., Harms, J. S., Durward, M., Radhakrishnan, G. K., . . . Splitter, G. A. (2013). *Brucella* induces an unfolded protein response via TcpB that supports intracellular replication in macrophages. *PLOS Pathogens*, 9(12), e1003785. doi:10.1371/journal.ppat.1003785
- Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C. M., & Ellisen, L. W. (2005). Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), 5834-5845. doi:10.1128/mcb.25.14.5834-5845.2005
- Solera, J. (2010). Update on brucellosis: therapeutic challenges. *The International Journal of Antimicrobial Agents*, 36 Suppl 1, S18-20. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.06.015

- Spera, J. M., Ugalde, J. E., Mucci, J., Commerci, D. J., & Ugalde, R. A. (2006). A B lymphocyte mitogen is a *Brucella abortus* virulence factor required for persistent infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), 16514-16519. doi:10.1073/pnas.0603362103
- Starr, T., Child, R., Wehrly, T. D., Hansen, B., Hwang, S., López-Otin, C., . . . Celli, J. (2012). Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host & Microbe*, 11(1), 33-45. doi:10.1016/j.chom.2011.12.002
- Svetić, A., Jian, Y. C., Lu, P., Finkelman, F. D., & Gause, W. C. (1993). *Brucella abortus* induces a novel cytokine gene expression pattern characterized by elevated IL-10 and IFN-gamma in CD4+ T cells. *International Immunology*, 5(8), 877-883. doi:10.1093/intimm/5.8.877
- Thornes, R. D., Early, A. M., Hogan, B. L., & Reen, D. (1982). Chronic brucellosis--clinical response to reduction of suppressor T lymphocytes by cyclophosphamide/prednisone. *The Irish Medical Journal*, 75(11), 423-424.
- Troy, S. B., Rickman, L. S., & Davis, C. E. (2005). Brucellosis in San Diego: epidemiology and species-related differences in acute clinical presentations. *Medicine (Baltimore)*, 84(3), 174-187. doi:10.1097/01.md.0000165659.20988.25
- Tuon, F. F., Gondolfo, R. B., & Cerchiari, N. (2017). Human-to-human transmission of *Brucella* - a systematic review. *Tropical Medicine & International Health*, 22(5), 539-546. doi:10.1111/tmi.12856
- Ulu-Kilic, A., Karakas, A., Erdem, H., Turker, T., Inal, A. S., Ak, O., . . . Alabay, S. (2014). Update on treatment options for spinal brucellosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(2), O75-82. doi:10.1111/1469-0691.12351
- Ulu-Kilic, A., Metan, G., & Alp, E. (2013). Clinical presentations and diagnosis of brucellosis. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 8(1), 34-41.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., . . . Van den Eynde, B. J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature Medicine*, 9(10), 1269-1274. doi:10.1038/nm934
- Velásquez, L. N., Delpino, M. V., Ibañez, A. E., Coria, L. M., Miraglia, M. C., Scian, R., . . . Barrionuevo, P. (2012). *Brucella abortus* induces apoptosis of human T lymphocytes. *Microbes and infection*, 14(7-8), 639-650. doi:10.1016/j.micinf.2012.02.004

- Viadas, C., Rodríguez, M. C., Sangari, F. J., Gorvel, J. P., García-Lobo, J. M., & López-Goñi, I. (2010). Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS One*, 5(4), e10216. doi:10.1371/journal.pone.0010216
- Wang, Z., Bie, P., Cheng, J., Wu, Q., & Lu, L. (2015). In vitro evaluation of six chemical agents on smooth *Brucella melitensis* strain. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14, 16-16. doi:10.1186/s12941-015-0077-1
- Watarai, M., Makino, S., Fujii, Y., Okamoto, K., & Shirahata, T. (2002). Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cellular Microbiology*, 4(6), 341-355. doi:10.1046/j.1462-5822.2002.00195.x
- Weeks, J. N., Galindo, C. L., Drake, K. L., Adams, G. L., Garner, H. R., & Ficht, T. A. (2010). *Brucella melitensis* VjbR and C12-HSL regulons: contributions of the N-dodecanoyl homoserine lactone signaling molecule and LuxR homologue VjbR to gene expression. *BMC Microbiology*, 10, 167. doi:10.1186/1471-2180-10-167
- Weiss, D. S., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A., & Moreno, E. (2005). MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*, 73(8), 5137-5143. doi:10.1128/iai.73.8.5137-5143.2005
- Weynants, V., Walravens, K., Didembourg, C., Flanagan, P., Godfroid, J., & Letesson, J. J. (1998). Quantitative assessment by flow cytometry of T-lymphocytes producing antigen-specific gamma-interferon in *Brucella* immune cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 66(3-4), 309-320. doi:10.1016/s0165-2427(98)00205-0
- Wyckoff, J. H., & Potts, R. D. (2007). Killing of *Brucella* antigen-sensitized macrophages by T lymphocytes in bovine brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 120(3-4), 148-159. doi:10.1016/j.vetimm.2007.08.004
- Yagupsky, P., Morata, P., & Colmenero, J. D. (2019). Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1), e00073-00019. doi:10.1128/cmr.00073-19
- Zaitseva, M. B., Golding, H., Betts, M., Yamauchi, A., Bloom, E. T., Butler, L. E., . . . Golding, B. (1995). Human peripheral blood CD4⁺ and CD8⁺ T cells express Th1-like cytokine mRNA and proteins following in vitro stimulation with heat-inactivated *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*, 63(7), 2720-2728. doi:10.1128/iai.63.7.2720-2728.1995
- Zelensky, A. N., & Gready, J. E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *The FEBS Journal*, 272(24), 6179-6217. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x

Zhan, Y., Kelso, A., & Cheers, C. (1995). Differential activation of Brucella-reactive CD4⁺ T cells by Brucella infection or immunization with antigenic extracts. *Infection and immunity*, 63(3), 969-975. doi:10.1128/IAI.63.3.969-975.1995



7. SİMGELER VE KISALTMALAR

°C: Santigrad derece
Ab: Antikor
ABI3: Human ABI Gene Family Member 3
Ag: Antijen
AP-1: Aktive edici protein-1
ASH: Antijen sunan hücre
ATF-6: Aktive transkripsiyon faktörü-6
BCV: Brucella içeren vakuol
BOS: Beyin omurilik sıvısı
BvrR/BvrS: Brucella virülans ilişkili regülatör/sensör protein
CD: Farklılaşma kümesi
CDC: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CFT: Kompleman Fiksasyon Testi
CLEC12B: Human C-Type Lectin Domain Family 12, Member B
CPSF: Bölünme ve poliadenilasyon spesifik faktör
DAMPs: Patojen ile ilişkili moleküler paternler
DDIT4L: Human DNA Damage Inducible Transcript 4 Like
DH: Dendritik hücre
DNA: Deoksiribonükleik asit
ELISA: Enzim bağlı immünosorbent deneyi
ER: Endoplazmik retikulum
PI3K: Fosfotidilinozitol 3-kinaz
GTPaz: Guanozintrifosfataz
GIS: Gastrointestinal Sistem
HKBA: Isıtma ile öldürülmüş brucella hücreleri
HRP: Horse radish peroxidase
IDO: Human indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase
IFN: İnterferon
IRF: interferon regülatör faktör
Ig: İmmünglobulin
IL: İnterlökin
ILC: Doğal lenfoid hücre
IRF: İnterferon düzenleyici faktör
IRE1α: Inositol-requiring enzyme 1 α
ITIM: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
KFT: Kompleman Fiksasyon Testi
KKPY: Konak katlanmamış protein yanıtı
LAMP-1: Lysosome-associated membrane protein-1
LEMB: lizozom eşlikçi membran protein-1
LFA: Lateral flow assay

LPS: Lipopolisakkarit
2-ME: 2-Mercapto Ethanol’lü Aglütinasyon Testi
MAPK: Mitojen aktive edici protein kinaz
Mbp: Mega base pair
MHC: Majör doku uyumluluk kompleksi
mL: Mililitre
MALDI-TOF: The matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry
MSS: Merkezi Sinir Sistemi
mTOR: The Mammalian Target of Rapamycin
MyD88: Myeloid farklılaşma birincil yanıtı 88
NAATs: Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri
NF- κ B: Nükleer faktör kappa B
ng/L: Nanogram/litre
NK: Doğal öldürücü hücre
NKT: Doğal öldürücü T hücre
NLR: NOD benzeri reseptörler
nm: nanometre
UPR: Unfolded Protein Response
NLR: NOD benzeri reseptörler
PAMPs: Patojen ilişkili moleküler paternler
PAR: poly-ADP-ribose
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
PERK: Protein kinase RNA-like ER kinase
PIAS: Protein inhibitor of activated STAT4
pg/mL: Pikogram/ mililitre
PKMH: Periferik kan mononükleer hücre
PIP3: Phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate
PIPK: Fosfotidilinozitol 3-kinaz
PrpA: Proline racemase protein A
PP2A: Protein fosfataz-2A
PPP2R4: Human Protein Phosphatase 2A Activator Regulatory Subunit 4
PRR: Patern tanıyıcı reseptör
RBT: Rose Bengal Testi
REDD1: Regulated in development and DNA damage response 1
RNA: Ribonükleik asit
RPM: Her dakikadaki devir
SR: Scavenger receptors
SAT: Standart Tüp Aglütinasyon Testi
SH-3: Src homology 3
STAT: Signal transducer and activator of transcription
STL: Sitotoksik T lenfosit
SUMO: Small ubiquitin-like modifier
T4SS: Tip Dört Sekresyon Sistemi
Teff: T efektör hücre
TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü-beta
Th: T helper (yardımcı)
TLRs: Toll-benzeri reseptörler

TIR: Toll/IL-1 receptor
TIRAP: Toll/IL-1 receptor - domain containing adaptor
TMP-SMX: Trimetoprim Sulfametoksazol
TNF: Tümör nekroz faktör
Treg: T regülatör hücre
U/L: Ünite/litre
ULK1: Unc-51-like kinase 1
XBP1: X box binding protein I
vjbR: The LuxR-like transcriptional regulator
WDR33: Human WD repeat-containing protein 33
ZFP: Zinc finger proteins
µl: Mikrolitre
µm: Mikrometre



8. TEŞEKKÜR

İmmünoloji Ana Bilim Dalı'nda eğitime başladığımdan bu yana bilgilerinden ve tecrübelerinden istifade ettiğim; azmini, enerjisini ve çalışkanlığını örnek aldığım desteğini hep yanımda hissettiğim değerli tez danışmanı hocam Prof. Dr. Ferah BUDAK'a; eğitimimde önemli katkıları olan bilimselliği ile bizlere örnek olan İmmünoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL'a, bizlere temel laboratuvar yöntemlerini öğretten ve hep şefkatle yaklaşan değerli hocam Prof. Dr. Güher Göral'a, çalışmanın her aşamasında bizlere destek olan ve yol gösteren Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Halis AKALIN'a, tez çalışmam sırasında ve birçok alanda yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Dr. Pınar HIZ ELLERGEZEN'e, yine tez çalışmalarım sırasında özellikle laboratuvar aşamasında bana çok yardımcı olan Muhammed Ali KIZMAZ, Figen AYMAK ve Abdurrahman ŞİMŞEK'e, tanımaktan ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum tüm doktora, yüksek lisans öğrencileri ve diğer İmmünoloji Ana Bilim Dalı çalışanlarına, desteğini ve sevgisini her zaman yanımda hissettiğim aileme ve bugünlere gelmemizi sağlayan bizlere destek olan tüm hoca, dost, arkadaş ve çalışanlara teşekkür ederim.

Eren ÇAĞAN
Haziran 2022

9. ÖZGEÇMİŞ

İlk ve orta öğretimini Ordu'da tamamladıktan sonra, 1996 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi'ni kazanıp 2002 yılında aynı fakülteden mezun olmuştur. 2002-2007 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi'nde Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanlık eğitimi almıştır. 2008 yılında 6 ay süre ile Van/Muradiye Devlet Hastanesinde Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları uzmanı olarak görev yapmıştır. 2008-2009 yıllarında bir yıl kadar Çocuk Nöroloji eğitimi almıştır. 2009 yılında 3 ay süre ile Fatsa Devlet Hastanesi'nde, 2010 yılında 9 ay süre ile Kartal Yakacık Kadın Doğum ve Çocuk Hastanesinde Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları uzmanı olarak çalışmıştır. 2010- 2013 yılları arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 3 yıl süre ile Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları uzmanlık eğitimi almıştır. 2014 yılında 8 ay süre ile Gaziantep Çocuk Hastanesinde Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları uzmanı olarak çalışmıştır. Kasım 2014'den bu yana Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları uzmanı olarak çalışmaktadır.

2018 yılında dokuz ay süre ile İngiltere'de dil eğitimi almıştır. Ağustos 2020'de Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları alanında Doçent unvanı almıştır. 2014'den bu yana Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı'nda İmmünoloji doktorası yapmaktadır.