**DIVA YAKLAŞIMINA YÖNELİK OLARAK,**

**SIĞIR BRUSELLOZİSİNİN TANISI İÇİN PROTEİN ELDESİ VE HIZLI TANI KİTİ GELİŞTİRİLMESİ**

**PROJE LİDERİ**

Dr. Yasin GÜLCÜ

**ARAŞTIRMACILAR**

 Dr. Aslı SAKMANOĞLU

 Prof. Dr. Uçkun Sait UÇAN

 Doç.Dr. Zafer SAYIN

Öğr. Gör. Dr. Yasemin PINARKARA

Arş. Gör. Ali USLU

Dr. Eray ATIL

Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

# ÖZET

Brusellozis, insan ve hayvanlarda *Brucella* ssp. tarafından oluşturulan bulaşıcı ve genellikle, subakut ve kronik seyirli zoonoz bir enfeksiyondur. Bu enfeksiyona Akdeniz ülkelerinde, Asya kıtasının batısında, Afrika kıtasının bir kısmında, Latin Amerika’da daha sık rastlanılmaktadır. Ülkemizde de enfeksiyon yaygın olarak görülmektedir ve korunmada aşı kullanılmaktadır. Her ne kadar kompetetif ELISA kiti bulunmakta ise de, aşılı ve enfekte hayvan ayrımındaki güçlükler nedeniyle serolojik teşhiste zorluklarla karşılaşılmaktadır. Ayrımın yapılabilmesi için aşı antijeni, test antijeni ve saha suşları arasındaki antijenik benzerliklerinin yada farklılıklarının, DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) yaklaşımı/stratejisine (aşılı-doğal enfekte ayırımı) uygun olarak araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada enfekte ve aşılı hayvanların ayrımında DIVA yaklaşımına uygun olarak kullanılabilecek bir bölgenin belirlenmesi ve sahada uygulanabilir seroloji temelli hızlı teşhis kitinin geliştirilmesi amaçlandı. Çalışmada kullanılan toplamda 122 adet *Brucella abortus* suşu PZR SET1 ile teyit edildi. PZR SET 2 ile delesyon olmayan 40 adet suş olduğu belirlendi. *B. abortus* S19 (S19), *B. abortus* S99 suşları ve *B. abortus* saha izolatlarında, farklı DNA bölgelerinin belirlenmesine yönelik olarak oligonükleotid primerler dizayn edildi ve bu primerler kullanılarak Random Amplified Polimorfik DNA (RAPD) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) analizi gerçekleştirildi*.* RAPD-PZR sonuçlarına göre; *B. abortus* S99, *B. abortus* saha suşlarında 4 adet DNA bandı (850 bp, 550 bp, 400 bp ve 200 bp), *B. abortus* S19 suşunda 3 DNA bandı (550 bp, 400 bp ve 200 bp) ve *B. melitensis* izolatında 1 adet DNA bandı (200 bp) tespit edildi. RAPD-SCAR metodu ile 850 bp büyüklüğündeki bant saf olarak elde edildikten sonra dizi analizi yapıldı. BLAST analizi sonrasında hedef DNA diziliminin *B. abortus* ve *B. melitensis* saha suşlarında var iken *B. abortus* S19’da bulunmadığı belirlendi. Hedef bölgenin tanımlı dizilimler ile benzerliğinin yaklaşık %64 oranında olduğu tespit edildi. Uniprot analizi ile proteinin kromozom I’de yer alan glutathione transferase ailesi içerisinde yer aldığı ve moleküler ağırlığının yaklaşık 30 kDA olduğu belirlendi. DIVA’ya yönelik olarak yapılan çalışma sonuçları ile karşılaştırıldığında şimdiye kadar bildirilen bölgelerden farklı bir bölge olduğu belirlendi. Dizilimi ortak olan hedef DNA rekombinant protein üretimi basamaklarında kullanıldı. SDS-PAGE ve Western blot işlemleri ile rekombinant proteinin çözünür olduğu ve antijenik yapısının doğal antijen ile benzer olabileceği tespit edildi. Dot blot analiz sonuçlarına göre, standardizasyon işlemi ile 100 µg/ml rekombinant antijen ile 1/80 ve üzeri titreye sahip serumlar rekombinant antijenin aşılı hayvan serumları ile negatif sonuç vermesine karşın enfekte hayvan serumları ile pozitif sonuç verdiği belirlendi. ELISA sonuçlarına göre, hedef antijenin humoral immuniteyi uyarım gücünün düşük olmasına bağlı olarak antikor miktarının test edilebilecek güvenilir düzeye ulaşamamasından dolayı aşılı hayvan serumlarından alınabilecek sonuçları olumsuz yönde etkileyebileceği kanaatine varıldı.

**Anahtar kelimeler:** *Brucella abortus,* DIVA, rekombinant protein,seroloji