



**T.C.**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**KLİNİK BAKTERİYOLOJİ ve ENFEKSİYON HASTALIKLARI**  
**ANABİLİM DALI**

**BRUSELLOZ'DA SPESİFİK T HÜCRE YANITININ**  
**REGÜLASYONU**

**Dr. Esra Kazak**

**UZMANLIK TEZİ**

**BURSA-2006**



**T.C.**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**KLİNİK BAKTERİYOLOJİ ve ENFEKSİYON HASTALIKLARI**  
**ANABİLİM DALI**

**BRUSELLOZ'DA SPESİFİK T HÜCRE YANITININ**  
**REGÜLASYONU**

**Dr. Esra Kazak**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Doç. Dr. H. Barbaros Oral**

**BURSA-2006**



## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii-iii
SUMMMARY.....	iv-v
GİRİŞ.....	1 - 28
GEREÇ VE YÖNTEM.....	29 - 31
BULGULAR.....	32 - 43
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44 - 50
EK.....	51
KAYNAKLAR.....	52- 56
TEŞEKKÜR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	58

## ÖZET

Brucella, insanlarda endokardit, artrit, osteomyelit, menenjitte yol açan gram negatif hücre içi bakteridir. Hastalığın kronikleşme riski ve yüksek morbiditesi nedeni ile etkili aşı ve yeni tanı reaktanlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla Brucella antijenlerinden yeni sentetik peptitler geliştirilmiş ve hayvan modellerinde denenmiştir. Ancak bu peptidlere karşı insan immün sisteminin yanıtına ait yeterli çalışma yoktur.

Çalışmamızda *B. abortus*'dan elde edilen L7/L12 ve GAPDH peptitlerine karşı Bruselloz'lu hastaların periferik kan lenfositlerinin profilleri ve sitokin yanıtının araştırılması amaçladık. Akut Bruselloz'lu ve sağlıklı hastaların kan lenfositlerinde bu antijenlere yanıt olarak ortaya çıkan lenfosit alt gruplarındaki değişiklikleri akım sitometrisi ile ve hücre dışı sitokin üretimini bu hücrelerin kültür süpernatantlarında ELISA yöntemi ile araştırdık.

Çalışmaya 25 Akut Bruselloz hastası ve 15 sağlıklı birey alındı. Bu kişilerden elde edilen periferik mononükleer hücreler PHA, L7/L12, GAPDH ile uyarıldıktan sonra lenfosit alt grupları ve hücre dışı sitokin (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10) miktarı ölçüldü. Uyarı sonucu Bruselloz'lu hastalarda hücre dışı IFN- $\gamma$  seviyeleri yüksek tespit edildi. Gruplar arasında uyarı sonrası IL-4, IL-10 seviyeleri arasında farklılık yoktu. Çalışmada ayrıca CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD152<sup>+</sup>(CTLA4), CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> lenfosit dağılımı araştırıldı. Bu peptidler ile uyarı sonucunda hastalarda CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> lenfosit oranının arttığı saptandı. Ancak diğer lenfosit alt gruplarının dağılımında hasta ve sağlıklı gruplar arasında farklılık tespit edilmedi.

Bu çalışmalarda elde edilen veriler ışığında Bruselloz'da koruyucu immüniteden Th1 tip immünitenin sorumlu olduğunu, GAPDH ve/veya

L7/L12'nin yeni Bruselloz aşı preparasyonlarında; bu peptitler ile uyarıyı takiben IFN- $\gamma$  yapımını temel alan spesifik hücresel immün yanıtı ölçen immünolojik tanı testlerinde kullanılabileceğini söyleyebiliriz. Bununla birlikte GAPDH ve L7/L12'nin kompleks immünomodölatör etkilerini açıklığa kavuşturacak yeni ve daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: Akut Bruselloz, GAPDH, L7/L12, Sitokin, Lenfosit Alt Grupları, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10.

## **SUMMMARY**

### **The Regulation Of Spesific T Cell Response In Brucellosis**

Brucella is a gram-negative intracellular bacterium that leads to endocarditis, arthritis, meningitidis and osteomyelitis in humans. Because of the chronicity risk of the disease and high morbidity, there are requirements for effective vaccines and spesific diagnostic reagents to eradicate brucellosis. For that purpose novel synthetic peptides derived from Brucella antigens were generated and tested in animal models. However there is a little known about the human immune response to these peptides.

In this study we investigated the profiles of the peripheral blood lymphocytes and cytokine responses of Acute Brucellosis patients and healthy subjects in response to two novel peptides derived from Brucella; GAPDH and L7/L12 by evaluating changes in lymphocyte subpopulations and by measuring the amount of cytokine productions in culture supernatants using flow cytometry and ELISA, respectively.

Twenty-five Acute Brucellosis patients and fifteen healthy subjects were included in the study. The peripheral blood mononuclear cells obtained from Acute Brucellosis patients (study group) and healthy subjects (control group) were stimulated with PHA, L7/L12, GAPDH prior to the measurement of extracellular cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10) and evaluation of the lymphocytes subgroups. As a result of stimulation, extracellular IFN- $\gamma$  levels increased in brucellosis patients. There were no differences in the levels of IL-4, IL-10 under the stimulation with these peptides between the groups. Also CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD152<sup>+</sup>(CTLA4), CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> lymphoctes were counted. The CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> counts in patients increased under the stimulation with L7/L12, GAPDH. However there were

no statistically significant differences in the other lymphocytes subpopulations between the healthy and patient groups.

In the light of the data obtained in our study, it can be suggested that Th1 type specific cellular immunity is responsible for protective immunity in Brucellosis. The more potent vaccines may be developed by including L7/L12, GAPDH and diagnostic tests using these peptides may be evaluated. However, there are needs for new and further studies which reveals the complex immunomodulatory effects of GAPDH and L7/L12.

Key Words: Acute Brucellosis, GAPDH, L7/L12, Cytokine, Lymphocyte Subpopulation, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10



## GİRİŞ

Bruselloz, Brucella cinsi bakterilerin neden olduğu, esas olarak ot yiyen evcil ve vahşi hayvanların, insanlara geçebilen bir hastalığıdır (1,2). Hastalık, insanlara hasta hayvanların vücut sıvıları, idrar, et, süt ve bu süt ile hazırlanan süt ürünleri, gebelik materyalleri aracılığı ile geçer ve daha ziyade bir meslek hastalığıdır (1-4). Bruselloz, hayvanlarda yavru atımı, süt ve et verim kaybına neden olur; insanlarda ise akut başlangıçlı yüksek ateş, gece terlemesi, eklem ağrısı gibi belirti ve bulgular ile seyredildiği gibi; sinsi başlangıçlı, romatizmal ve psikiyatrik hastalıkları taklit eden atipik belirti ve bulgular ile de seyredebilir (1-3).

İlk defa Malta adasında bulunan olguların bildirilmesinden dolayı “Malta Humması, Akdeniz Humması, Gibraltar Humması”, tipik ateş trasesi nedeni ile “Ondülan Ateş”, koyunlardan bulaşabildiği için “Mal Hastalığı” veya “Koyun Hastalığı” da denilen Bruselloz hastalığının etkeni ilk olarak 1886’da David Bruce tarafından Malta ateşine maruz kalan 5 fatal olgunun dalaklarından izole edilerek, “Micrococcus” sınıfına dahil edilmiştir (1-4). 10 yıl sonra Danimarka’lı veteriner B.Bang, tekrarlayan düşük öyküsü olan sığırların plasenta ve fetüslerinde mikroorganizmayı izole ederek “Bacillus of abortion” olarak isimlendirmiştir (2). 1917’de A.C.Evans, Bruce’in tanımladığı organizma ile Bang’in tanımladığı organizmanın aynı olduğunu tespit ederek mikroorganizmayı Bruce’ün anısına tekrar isimlendirinceye kadar Malta ateşi ve Bang hastalığının etkenleri arasındaki ilişki fark edilmemiştir (1,2).

Hastalığın yol açtığı ekonomik kayıp ve işgücü kaybının yanı sıra, mikroorganizmanın aerosoller ile bulaşabilmesi nedeni ile biyolojik savaş ajanı olarak kullanılma riski aşı ve tanıda farklı tetkiklerin geliştirilmesini gerekli kılmıştır (2).

## Patojen

Filogenetik olarak *Brucella* spp, serbest olarak toprakta yaşayan organizmalar ile ortak orjine sahip olup, 16S rRNA sekansına ve dış membran proteinlerinin analizine dayanarak, Proteobacteria sınıfının  $\alpha_2$  alt sınıfına dahil edilmiştir (1,5). Mikroorganizma 0,6  $\mu\text{m}$  en, 1,5  $\mu\text{m}$  boyunda, spor oluşturmeyen, katalaz (+), hücre içi üreyen Gr(-) kokobasildir (1,2,4). Genel olarak oksidaz pozitif olup, üreaz aktivitesi, H<sub>2</sub>S üretimi ise değişken olan *Brucella* türleri patojenitedeki ve konak tercihindeki farklılıklara göre *B.abortus*, *B.melitensis*, *B.suis*, *B.ovis*, *B.canis*, *B.neotomae*, *B.maris* olarak sınıflandırılır (1,2,4). Bu türler içinde sadece *B.abortus*, *B.melitensis*, *B.suis* ve *B.canis* insanda enfeksiyon yaparken, *B.ovis*, *B.neotomae* ile insanda enfeksiyon bildirilmemiştir (2).

Bakteri pepton içeren ve kan veya serum ile zenginleştirilmiş herhangi bir kültür ortamında üreyebilir, bazı türler için tiamin, niacin, nikotik asit, biotin ve bazı vitaminler gerekebilir (1,3). Klinik örnekler 30 gün ve üstü izolasyon süresine ihtiyaç duyar (1). *Brucella* türleri aerobik ortamda çoğalırken, *B.abortus*'un çoğu biyovarının primer izolasyonu için %5-10'luk karbondioksit gereklidir (2,3). *Brucella* cinsi bakterilerin tercih ettikleri konak, besiyeri, metabolik ve antijenik karakterlerine göre *B.abortus* için 9, *B.melitensis* için 3, *B.suis* için 4 biyovar tanımlanmıştır (1). Moleküler teknikler kullanılarak yapılan DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları, suşlar arasında % 95'den fazla homoloji olduğunu ve aslında özgün konağa adapte olmuş evrimsel bağlara uyan alt türler ile *Brucella* cinsi bakterilerin monospesifik bir cins olduğunu düşündürmüştür (1).

Bakterinin bilinen bir ekzotoksini yoktur (3). *Brucella* cinsi bakterilerde pek çok dış ve iç membran, sitoplazmik, periplazmik antijen tanımlanmış, özellikleri saptanmıştır. Bunların çoğu koruyucu immüniteyi uyarmada önemli olabilir. Ancak *Brucella*'nın baskın olan, major hücre duvar antijeni ve virülans faktörü, ilk olarak Wilson ve Miles tarafından tanımlanan A ve M antijenleri içeren smooth-lipopolisakkarit (S-LPS)'tir (1,2). *Brucella*'nın dış zarının

lipopolisakkarit (LPS) komponenti hem yapısal, hem fonksiyonel olarak diğer gram (-) bakterilerinkinden farklıdır (2). Brucella LPS'sindeki intrensek heterojenisitenin tespiti onun kimyasal yapısı ve biyolojik davranışını açıklamada yararlı olacaktır. Bu da LPS'nin enfeksiyon ve aşılama da önemli bir antijen olmasından, Bruselloz'un tanısı ile immünolojik çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmasından dolayı önemlidir.

## Epidemiyoloji

Bruselloz bir zoonozdur. Hastalık hayvanlarda süt verimini azaltmanın yanı sıra, düşükler nedeni ile de ekonomik kayba neden olur. Brucella'nın hayvanlarda, üreme organlarında lokalizasyonu düşük ve sterilite ile karşımıza çıkmasının nedenidir. Gebe hayvanların kotiledonlarında yerleşen bakterinin meydana getirdiği enfeksiyon, fetüsün yeterli beslenmesini engelleyerek, ana karnında ölüme ve düşüğe neden olur (1). Hayvanların fetüs zarlarında bakteri için bir gelişme faktörü olan eritrol yapısında bir madde saptanmış olup, gebe hayvanların Bruselloz'a duyarlı olmaları bu şekilde açıklanmaktadır (1,3). İnsan plasentasında ise eritrol bulunmaması nedeni ile insanlarda bu enfeksiyonda düşüğe rastlanmaz (3). Hayvanlarda mikroorganizma lenf nodülleri, dalak, karaciğer retiküloendotelial hücreleri ve ürogenital sisteme yerleşir. Hayvanların süt ve idrarında çok miktarda bulunan mikroorganizmanın hayvan sütüne bulaşı mastit ve genital akıntıdan karışma şeklindedir (4).

*B.abortus*, esas olarak sığırlarda bulunur, ancak deve, Tibet öküzleri gibi türlerin de lokal önemi olabilir (1). *B.melitensis* bulaşında en belirgin kaynak keçi ve koyunlardır. Çünkü özellikle keçiler 6-7 ay bakteriyi çevreye bulaştırmaktadır. Koyunlarda bazen *B.abortus* ve *B.suis* enfeksiyona neden olabilir (3). *B.suis* biyovar 1-3, vahşi ve evcil domuzlarda ortaya çıkar ve mezbaha ilişkili insan hastalığına neden olur. Domuzlarda *B.abortus* ve *B.melitensis* de hastalık oluşturmaktadır (1,3). Nadir olarak bazı Güney Amerika ülkelerinde, *B.suis* biyovar 1 sığırlarda da izlenir, insan

enfeksiyonunun diğerk bir kaynağını oluşturur (1). *B.canis*, köpeklerde genital enfeksiyonlara neden olur ve insan da nadiren hastalığa sebep olur (1,2).

Bruselloz her yıl binlerce insanı etkileyerek işgücü kaybı ve fiziksel yetersizliğe neden olmaktadır. Enfeksiyonun hayvanlardan insanlara bulaş yolu içinde; hayvanlar ve sekresyonlarına ciltteki kesik ve sıyrıklar yoluyla, düşüğe müdahale yada kesim sırasında direkt, indirekt temas, enfekte aerosollerin inhalasyonu, konjunktiva yoluyla inokülasyon, pastörize olmayan süt ürünlerin alınması sayılabilir (1-3). Et rnleri, çiğ yenmemelerinden ve kas dokusunda mikroorganizmanın sayısının az olmasından dolayı enfeksiyonun bulaşında nadir bir kaynaktır (1). İnsandan insana bulaş nadirdir, ancak *B.melitensis* biyotip 2 ve 3 ile enfekte iki ayrı laboratuvar personelinin eşlerinde de Bruselloz izlenmiştir (3). Bu gibi nadir olgularda bulaşın cinsel yolla olabileceği dşnlmş, nitekim etken sperm örneklerinden izole edilmiştir (1).

İnsanlarda hastalığın insidansı koyun, keçi, sığırlardaki enfeksiyon ve enfekte hayvan ile bunların ürünlerine maruziyet ile ilişkilidir. Etken çoğu ülkede özellikle peynir gibi pastörize edilmemiş süt ürünlerinin tüketilmesi ile bulaşır. Bruselloz A.B.D. gibi pastörize süt ürünlerinin tüketildiği ülkelerde ise daha çok veteriner, mezbaha çalışanı, ifti ve laboratuvar alışanlarında “meslek hastalığı” olarak görülür (2).

*Brucella* laboratuvar ortamında oldukça enfeksiyzdr. Bakteri 60°C’de 10 dakikada, %1’lik fenol eriyiğinde 15 dakikada tahrip olur (3). Normal mide asidi bakteriyi öldürebilir. 4-8°C’de saklanan keçi peynirinde 6 aydan uzun süre, düşük yapmış hayvan fetüsünde 75 gün, enfekte sütten yapılmış dondurmada 30 gün, %10 tuz içeren salamura peynirde 45 gün, %17 tuz içerisindeki peynirde 1 ay yaşayabilir (3,4). Etken ısı ve pastörizasyona duyarlıdır. Tulum ve kaşar peyniri uzun süre bekletildiği, yoğurt asiti fazla olduğu için hastalığı bulaştıramaz (6).

Hastalık özellikle Akdeniz’de, Arap yarımadası, Hindistan’da, Meksika, Orta ve Güney Amerika’nın bir bölümünde daha yaygın olacak şekilde, tüm dünyada görülebilir (1). Ülkemizde Bruselloz’a ait seropozitiflik oranı %2-6 olarak belirlenmiştir. Hastalığın morbiditesi yüksek olmasına rağmen mortalitesi düşüktür (<%2). Hastalık 15-35 yaş arasında ve yaz mevsiminde 4 kat daha fazla görülür. Ülkemizde en sık bulaş taze peynir ve çiğ süt kaynaklı krema tüketimi ile olur (4). Kırsal kesimlerde *B.melitensis*, büyük şehirlerde *B.abortus* enfeksiyonu daha çok görülür. Başta Konya olmak üzere Diyarbakır ve Şanlıurfa hastalığın en sık görüldüğü illerdir (3,4).

### **Klinik Bulgular**

Bruselloz’un klinik bulguları çeşitli, seyri ise değişkendir (2). Hastalık akut, sistemik ateşli hastalık, kronik enfeksiyon veya lokalize enflamatuvar süreç olarak kendisini gösterebilir (2). Başlangıç akut ya da sinsi olabilir. İnkübasyon periyodu 3 gün ile haftalar arasında değişmekle birlikte, genellikle semptomlar etkenin alınmasından 2-4 hafta sonra başlar (1,2).

Bruselloz *Brucella* türlerine bağlı olarak farklı şekillerde görülebilir. *B.melitensis* diğerlerine nazaran daha ciddi sistemik hastalığa neden olurken, *B.suis* daha çok lokalize, süpüratif hastalığa neden olur (2). Genel olarak hastalık kendisini ateş, terleme, iştahsızlık, baş ağrısı, sırt ağrısı gibi özgül olmayan semptomlar ile gösterir. Uzun süre tedavi edilmemiş hastalarda (özellikle *B.melitensis* enfeksiyonlarında) ateş 10-15 gün 38-39°C veya daha yükseğe çıktıktan sonra basamak basamak azalarak iki hafta içinde normale iner ve 3-10 günlük bir ateşsiz dönem sonrası ateş tekrar yükselir (ondülan ateş) (1,3). Ek olarak kemik, eklem veya genitoüriner sistemin fokal enfeksiyonu lokal ağrıya neden olabilir. Öksürük, plöritik göğüs ağrısı da bildirilmiştir. Aerosoller ile enfekte hastaların semptomları diğer yollar ile enfekte olanlarınkinden farklı değildir. Bruselloz’lu hastalarda depresyon, huzursuzluk gibi nöropsikiyatrik semptomlar yaygındır (2). Somatik şikayetlerin yoğunluğuna rağmen, fizik muayene bulguları azdır (1).

Bruselloz, vücudun herhangi bir organ veya sistemini içeren sistemik bir enfeksiyondur. Bu hastaları semptomların uzunluğu, ciddiyetine göre akut, kronik, subakut olarak kategorize etmek güçtür (1). Akut hastalarda en sık rastlanan fizik muayene bulguları splenomegali, hepatomegali, vertebralar üzerine basmakla hassasiyettir. Bu olguların tedavi edilmeyen bir bölümü subakut döneme geçebilir. Subakut hastalarda en belirgin bulgular yorgunluk, sinirlilik, bel, baş ağrısı, ondulan ateştir (3). Hastalığın 1 yıldan uzun sürmesi halinde kronikleştiği farzedilir (1,3). Akut ve kronik formları ayırdetmenin güçlüğü yayınlarda belirtilmiştir (1). Kronik hastalık kendisini dört şekilde gösterir: *i.* Hastalık çoğunlukla asemptomatiktir ve sinsi seyir izleyebilir (3). *ii.* Akut hastalığı takiben tekrarlayan nöksler olabilir. Genellikle ateş (olguların %25-50'sinde), halsizlik, sinirlilik, başağrısı, depresyon belirtileri ve kilo kaybı ön plandadır (3). Lenfadenopati, hepatomegali yada splenomegali izlenebilmesine karşın fizik muayene bulguları genellikle normaldir (2). *iii.* Lokalize organ tutulumları olabilir. Spesifik organ tutulumu baskın olduğunda, hastalık genellikle "fokal" veya "lokalize" olarak tanımlanır. Sıklıkla eklem, kemik, karaciğer, dalak ve böbreklerde süpüratif lezyon gibi derinde enfeksiyon odağı olarak karşımıza çıkar (1). *iv.* Antimikrobik tedaviye yanıtızsızlık olabilir. Relapslar özellikle tedavi erken kesildiğinde siktir, genellikle tedavinin kesilmesinden 3-6 ay içinde ortaya çıkar. Relapslar, antibiyotik direncinden kaynaklanmaz. Nitekim relapslarda izole edilen suşların duyarlılığı, orijinal suşlarındakinden farksızdır (1).

Pek çok organı etkileyen Bruselloz'un sistemlere göre yaptığı klinik bulgulara göz atacak olursak;

Gastrointestinal Sistem; Hastaların %70'inde anoreksiya, bulantı, kusma, ishal, kabızlık, karın ağrısı gibi bu sisteme ait şikayetler izlenir (1). Karaciğer, retiküloendotelial sistem (RES)'in en büyük organı olduğu için brusellozda tutulum oranı yüksektir. Ancak hepatik lezyonlar antimikrobiyal tedavi ile iyileşir, enflamasyonun ciddiyetine rağmen hepatit C veya alkol alışkanlığı gibi

durumlar hariç siroz oluşmaz. Hepatitin dışında akut kolesistit, pankreatit ve spontan bakteriyel peritonit de olabilir (1).

İskelet Sistemi; Osteoartiküler komplikasyonlar Bruselloz'da çok yaygındır (olguların %20-60'ında) (1). Eklem ve kemik lezyonlarının spektrumu; artrit, spondilit, osteomyelit, tenosinovit, bursiti içerir. Kalça, diz, ayak bileği, gibi büyük eklemler daha çok tutulurlar (2). Sakroileit en yaygın bildirilen komplikasyondur (1). Grafilerde sakroiliak eklem tutulumu halinde de eklem aralığında daralma ve düzensizleşme olup olmadığının aranması gerekir; bu tutulumu "Akdeniz Koksalsjisi" denilmektedir. Nadiren paravertebral apseler oluşur (4).

Sinir Sistemi; Bruselloz'da depresyon ve dikkat bozukluğu yaygın olmasına karşın, Santral Sinir Sistemi (SSS)'nin direkt invazyonu %5'ten az olguda izlenir. Sinir sistemi komplikasyonu içinde menenjit, ensefalit, miyelit, radikulonörit, beyin apsesi, epidural apse, demiyelinizasyona neden olan sendromlar ve menengovasküler sendromlar sayılabilir. Akut yada kronik menenjit SSS'nin en yaygın komplikasyonudur (1).

Kardiyovasküler Sistem; Hem doğal, hem protez kapakta bildirilen endokardit olguların %2'sinden azında izlenir. Ancak Bruselloz ilişkili ölümlerin %80'ini kapsar (2). Aortik kapak, mitral kapaktan daha sık tutulur (1) Perikardit, endokarditin komplikasyonu olabildiği gibi, primer enfeksiyon olarak da gelişebilir (1).

Solunum Sistemi; Hastaların dörtte biri öksürük, dispne, plöritik ağrı gibi solunum yoluna ait şikayetler ile başvururlar. Solunum sistemi tutulumu nezle benzeri semptomlardan bronşit, bronkopnömoni, akciğer nodülü, apse, plevral efüzyona kadar farklı bulgular ile kendisini gösterebilir (1,2,4).

Genitoüriner Sistem; Piyelonefrit, sistit, erkeklerde epididimoorşit görülebilir. İntersitiyel nefrit, eksüdatif glomerulonefrit, IgA nefropatisi bildirilmiştir (1).

Ayrıca, anemi, lökopeni, trombositopeni, pıhtılaşma bozuklukları ile karakterize hematolojik bozukluklar; Papül, ülser, cilt apsesi, eritema nodozum, peteşi ve purpura gibi döküntülü cilt lezyonları; ve üveit, kronik iridosiklit, keratit, multifokal koroidit, optik nörit gibi göze ait bozukluklara sebep olabilir (1,4).

Bu kadar yaygın organ tutulumu ve klinik formlara rağmen hastalık mezbaha işçileri, veterinerlerde asemptomatik geçebilir veya klinik semptomlar ortaya çıkmadan önce serolojik bulgular pozitifleşebilir (3).

### **Tanı**

Semptomlar özgül olmadığı için, öykü tanıda en önemli araçtır (1,2). Dolayısıyla, hasta hayvanlar ile temas, hastalığın yaygın olduğu bölgelere seyahat, pastörize edilmemiş süt gibi yüksek riskli yiyecek alımını içeren ayrıntılı öykü önemlidir. Lökosit sayısı sıklıkla normal veya düşük, eritrosit sedimentasyon hızı değişkendir (1). Bakterinin hemen hemen tüm vücutta ve hücre içinde bulunması tanıda zorluk ve karışıklığa neden olur. İlk atakta teşhis nispeten daha kolay olsa da, kronik, nüks veya lokalize Bruselloz'da tanıya ulaşmak güçtür. Bu nedenle Bruselloz'un kesin tanısı ancak laboratuvara dayanılarak konulabilmektedir (1,3).

Etken kan, kemik iliği ve diğer dokulardan izole edildiğinde tanı netleşir. Bakteri kan ve kemik iliği dışında, lenf nodülü, dalak, karaciğer, beyin omurilik sıvısı, genital salgı, süt ve irinden elde edilebilir (3). Kandan izolasyon oranı inkübasyon süresince kullanılan metoda bağlı olarak değişir. Tanıda Bruselloz düşünüldüğünde laboratuvar, kültürleri en az 4 hafta bekletmesi için uyarılmalıdır (1). Kemik iliği kültürleri daha duyarlıdır. Bu neden ile Bruselloz



düşünülen, ancak kan kültüründe etkenin izole edilemediği durumlarda kemik iliği kültürü önerilmektedir (1).

Bakteriyolojik doğrulama yokluğunda tanı, etkene karşı oluşan antikorun tespitine dayanır. Wright-Tüp aglütinasyon testi (Standard Aglütinasyon testi; SAT) en sık kullanılan standart metoddur (1). Bu test serumun öldürülmüş mikroorganizmaları aglütine edebilme yeteneğine dayanır ve anti-O-polisakkarit antikorunun varlığını yansıtır (2). Aktif enfeksiyonda tanı koydurucu titre genelde 1:160 üstündedir (1-4). Daha düşük titreler tanı koydurucu değildir ve testin bir süre (10-14 gün) sonra tekrarlanmasında 4 kat titre artışı izlenir. Ancak çoğu hasta klinik bulguları gösterdiği sırada yüksek titrelerle sahiptir ve titrede 4 kat artış olmayabilir (2). Hastalığın erken dönemlerinde IgM artar, üç ayda en yüksek düzeye ulaşırlar, daha sonra azalır (2). Başarılı tedavi sonrası yıllarca 1/20 gibi düşük titrelerde kalır. Hastalığın başlangıcından üç hafta sonra IgG antikorları yükselmeye başlar; 6-8 haftada en yüksek düzeye ulaşırlar. Ancak hastalığın iyileşmesi ile hızla kandan kaybolurlar ve reaktivasyon durumunda tekrar ortaya çıkarlar (3). Dolayısıyla bir reaktivasyon belirtisi olarak kabul edilebilir. İmmünglobulin titrelerinde düşmede zayıflama relaps veya kronik enfeksiyonda prognostik değere sahiptir. Kronik enfeksiyonun akut alevlenmesinden şüphe ediliyorsa, IgG'nin aglütinasyon titresinin gösterilmesi gerekir. Bu amaçla total titrenin IgM'e ait kısmı, 2-Merkaptoetanol (ME) veya Rivanol ile IgM'i monomerlere ayırmak sureti ile yok edilir ve yüksek titrede IgG saptanması ile tanı konabilir (2). Bazen, blokan antikorların varlığı negatif reaksiyona neden olur. Eğer test negatif sonuçlanırsa ve klinik olarak hastalığı destekleyen bulgular var ise Coombs (anti human globulin) serumu ilavesi ile tekrarlanır, blokan antikorların bağlanması ve görünür aglütinasyon oluşması sağlanır (1,4). SAT'daki yanlış pozitif reaksiyonlar *Yersinia*, *V.cholerae*, *F.tularensis* etkenine karşı oluşan çapraz reaksiyonlardan kaynaklanır (1,4).

*B.abortus* 99S suşunun tamponlu eriyikteki süspansiyonunun boyalı antijen olarak kullanıldığı lam aglütinasyon testi olan Rose Bengal testi, hızlı

tarama metodudur. Ancak (+) sonuçlar SAT ile konfirme edilmelidir (4). Benzer şekilde tam kan ile çalışılabilen SPOT testi de çabuk sonuç veren testlerden biridir. Özellikle kitle taramalarında kullanılır (3).

Brucella enfeksiyonlarının serolojik tanısında lökosit tarafından fagosite edilen ortalama bakteri sayısının değerlendirildiği opsonositofajik test; antijene spesifik IgM, IgG ve IgA'nın saptanabildiği ELISA testleri; immunocapture aglütinasyon testi olan Brucellacapt gibi yöntemler de kullanılabilir (3).

Tanıda diğer yöntemde ise bakterilerden elde edilmiş, saflaştırılmış nükleoprotein kompleksinden oluşmuş "Brucellergen" deri içine enjekte edilir (4). Bu test Brucella'nın öldürülmüş kültürleri veya 21 günlük kültür süzüntüleri (Mellitin-Abortin) ile de yapılır (3). 24 saat içinde kızartı, ödem, sertlik şeklinde izlenen reaksiyon varsa, bu kişiler Brucella'ya karşı aşırı duyarlı kabul edilerek test pozitif olarak değerlendirilir (3,4). Ancak testin negatif olması Bruselloz'dan uzaklaştırmaz (3).

PCR yöntemine dayalı testler, günümüzde diğer zor ve geç üreyen bakterilerde olduğu gibi Brucella türlerinin tanısında da yerini almaktadır. Geleneksel tanı yöntemleri ile tedavi sonrası iyileşmenin değerlendirilmesi oldukça zordur. PCR yönteminde ise nüks olgularında kan örneklerinde çok az sayıda bulunan Brucella bakterilerinin bile varlığı gösterilebilmektedir (3).

## **Korunma**

*B.melitensis* ve *B.suis*'in, *B.abortus* ve *B.canis*'ten daha virülan olduğu düşünülmektedir. En virülan ve ağır hastalıktan sorumlu olan *B.melitensis* iken, en az virülansa sahip olan *B.abortus*'tur. Ancak atenüe aşı suşları dahil herhangi bir suş ile enfeksiyon insanlarda ciddi enfeksiyon ile sonuçlanabilir (1). Bu nedenle hastalıktan korunma çok önemlidir ve insan brusellozundan korunma hayvanlarda hastalığın kontrol altına alınması ve eliminasyonuna bağlıdır. Risk altındaki kişilerin eldiven, uzun kollu önlük, gözlük kullanması,

sütlerin pastörizasyonu, taze peynir yapımında peynirlerin yeterince tuzlanması ve en az iki ay bekletilmesi, tenekelerin üzerinde mayalanma tarihlerinin bulunması, etlerin iyice pişirilmesi ve bruselloz olgularının sağlık müdürlüklerine bildirilmesi önerilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü bu hastalık ile mücadelede hayvanların hastalıktan korunması, testler ile hasta hayvanların belirlenip, kesilmesini, 4-8 aylık dişi danaların aşılmasını önermektedir (3).

Hayvanlarda *B.abortus* (Suş 19) ve *B.melitensis* (Suş Rev-1) için etkili atenüe canlı aşılar mevcuttur (1). Ancak *B.suis* veya *B.canis* için etkili aşı yoktur. Suş 19 ve Rev-1'in yanlılıkla insanlarca alınmasının insan brusellozuna neden olduğu nadir de olsa bildirilmiştir (1). *B.abortus* suş RB51 ile üretilen aşı sığırlarda tercih edilen aşıdır. Bu suş sığırları antikor yanıtı uyarmaksızın korur, ayrıca insanlar için virülanstan yoksundur ve yanlılıkla alınmasına rağmen insan RB51 enfeksiyon olgusu bildirilmemiştir (1). İnsanlarda ise Bruselloz'a karşı etkili aşı henüz geliştirilememiştir (2).

Hastalığın işgücü kaybına neden olması, kronik seyir izlemesi, nükslerin görülmesi, epidemik potansiyeli, sık karşılaşılan bir meslek hastalığı olması, mevcut aşuların güvenli olmaması ve özellikle biyolojik silah olarak kullanılma riskinin olması aşı geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Bununla birlikte bazı hastaların iyileşirken, diğerlerinde tedaviye rağmen hastalığın kronikleşmesinin açıklanabilmesi, tanı ve tedavideki sıkıntıları aşabilmek için hastalığın patogenezinin ve konak immün sisteminin etkene yanıtının incelenmesi, etkene ait antijenik yapıların açığa çıkarılması önemlidir. Bu neden ile patogenez ve konak immün sisteminin hücre içi bir bakteri olan *Brucella*'ya karşı yanıtını ayrıntılı değerlendirmek yerinde olacaktır.

### **Bruselloz'da İmmün Yanıt**

İmmün sistemin gelişimi için en iyi itici güç konak ile mikroorganizma arasındaki süregelen çatışmadır. Bu çatışma kimi zaman konak, kimi zaman da mikroorganizma lehine sonuçlanır (7). Ancak mikroorganizma, hücre

içinde kendisine immün sistemden kaçabileceği koruyucu bir alan bulunduğu, immün sistem, mikroorganizmanın çoğalmasını kontrol etse de ortadan kaldıramaz.

Hücre içinde yaşama, koruyucu immün yanıtın tipini de belirgin etkiler. Hücre içi bakteri, antikor ve özgül olmayan humoral efektör moleküller ile nadiren ilişki kurar; daha ziyade hücre içinde bir takım işlemlerden geçirilerek antijenik peptidler halinde MHC molekülleri tarafından T lenfositlere sunulur. Yani hücre içi bakteriler ile gerçekleştirilen enfeksiyonların bir diğer özelliği konağın antikorlardan çok T hücreleri aracılı immünolojik mekanizmalar kullanılarak savunulmasıdır. Bu T hücrelerinin en önemli görevi, enfekte makrofajlarda, etkili antibakteriyel fonksiyonların aktivasyonu, başka bir deyişle mononükleer fagositin major efektör hücreye dönüşmesidir (7). Sıklıkla hücre içi bakteriler makrofaj içinde yaşamaya devam eder. Aktive makrofajlar ile bu mikroorganizmalar arasındaki bu sürekli savaş bölgesinde karakteristik doku yanıtı olarak granülomatöz reaksiyon gelişir (7).

Hücre içi bakterilerin bir kısmı konak hücresinde yaşamaya iyi adapte olmalarına rağmen, nadiren hücre dışında da bulunurlar. Mononükleer fagositleri yaşamak için tercih ederler ancak diğer konak hücrelerini de enfekte edebilirler. "Fakültatif hücre içi bakteri" olarak nitelendirilen bu bakteriler içinde sayılan *Brucella* spp, nötrofiller tarafından öldürmeye dirençli, makrofajlarda ve profesyonel olmayan fagositlerde çoğalabilen, konak hücreleri ile uzun süreli ilişki kurabilen bir patojendir (5,7).

## **Doğal İmmünite**

Doğal immün yanıt, patojenlere karşı, enfeksiyonun erken dönemlerinde ortaya çıkan, özgül olmayan ilk immün yanıtıdır (7). Bruselloz'da doğal immünitenin başlıca rolü, başlangıçtaki virülan bakterinin sayısını azaltmak ve konakta Th1 immün yanıtı oluşturmak için ortam hazırlamaktır (5).

Vücuda mukozadan giren hücre içi bakteriler için mukozada gerçekleşen lokal immünite önemli bir bariyerdir. Bu bölgede immüniteye spesifik IgA, M hücreleri, intraepitelyal lenfositler (çoğunlukla  $\gamma\delta$  T lenfositler), lamina propria lenfositleri ve lokal lenfoid follikül hücreleri katılır (7).

Bruselloz immünitesine katılan doğal immün sistemin hücrelerini tek tek inceleyecek olursak;

### **Nötrofiller**

Nötrofiller kan hücrelerinin %50-70'ini kapsayan, kısa ömürlü hücrelerdir. En önemli fonksiyonları fagositozudur (5). Nötrofiller muhtemelen insanda Bruselloz ile mücadelede ilk ortaya çıkan immün sistem hücreleridir (8). Nötrofiller kemotaksis ile mikroorganizmanın giriş bölgesine hücum eder (7). Virülan ve atenüe Brucella suşlarının nötrofiller ile hızlı fagositozu, antikor ve kompleman ile opzonizasyonun ardından gerçekleşir. Opzonize olmamış Brucella spp, fagositik hücreler ile zayıf şekilde sindirilir. Bu durum opzonizasyonun fagositoz için gerekli olduğunu düşündürür (5,8). Ancak mikroorganizmanın nötrofil içindeki bakteri öldürücü mekanizmalara direnç gösterdiği izlenmiştir. Bunu sağlayan mekanizmalar tam olarak anlaşılacak ile birlikte bu faktörler arasında adenin, guanin monofosfat üretimi ile nötrofillerin degranülasyonunun önlenmesi ve Cu-Zn superoksid dismutaz üretimi sayılabilir (1,5,8).

Daha ayrıntılı belirtecek olursak; nötrofiller, mikroorganizmayı öldürmek için miyeloperoksidaz-hidrojenperoksid-halid sistemini kullanır. Miyeloperoksidazın salınımı için, primer ve sekonder nötrofil granüllerinin degranülasyonu gereklidir (5,8). Bu da Brucella'da reaktif oksijen metabolitleri (ROM) ve reaktif nitrojen metabolitleri (RNM)'e karşı olduğu gibi hipohalid, laktoferrin, bakteriyel permeabilite artırıcı faktör, serprocidin, fosfolipaz A<sub>2</sub>,

cathelicidin, lizozom ve defensinlere karşı gelişen antimikrobiyal direnç mekanizmalarının mevcut olabileceğini gösterir. Örneğin *B.abortus*, GMP ve adenin salgısı ile degranülasyonu engelleyerek, sığır nötrofillerinde miyeloperoksidaz  $H_2O_2$  halid antibakteriyal sistemi inhibe eder (5). Degranülasyonun inhibisyonu, nötrofiller ile mücadele etme ve erken yıkımı engelleyerek bakterinin yaşamasına izin veren virülansta önemlidir. Dahası *B.suis* ve *B.abortus*, fagozom-lizozom füzyonunu engellemede henüz tanımlanmayan faktörler geliştirilebilmişlerdir (8).

Farklı türlere ait nötrofiller, Brucella'ya karşı farklı yıkım yeteneğine sahiptir. Örneğin insan nötrofilleri, *B.melitensis*'i öldürmede sığır nötrofillerine göre daha etkisizdir. Bu da insanlarda *B.melitensis*'in *B.abortus*'tan daha virülan olma nedenini açıklar (8).

### **Doğal Öldürücü Hücreler**

Doğal öldürücü (Natural Killer; NK) hücreler, CD56 belirteci ile tanımlanan büyük granüler lenfositlerdir. Bu hücrelerin T lenfositlerin yaptığı fonksiyonları gerçekleştirdikleri için aktif T hücreler ortaya çıkmadan önce, erken dönemde konak savunmasına katıldıkları saptanmıştır (7). NK hücreleri, patojenlere karşı ilk savunmada yer alır ve aktivasyonu izleyerek enfekte hedefleri öldürebilir (9). Hem *in vivo* hem de *in vitro* hücre içi bakteriler ile yapılan çalışmalarda NK hücrelerinin aktive olduğu ve bu bakteriler ile enfekte konak hücrelerinin parçalandığı gösterilmiştir (7). NK hücrelerinin enfekte ve enfekte olmayan konak hücrelerini ayırt ederken inhibitör reseptörleri aracılığıyla MHC Sınıf I molekülünü eksprese etmeyen veya düşük düzeyde eksprese eden hedef hücreleri özellikle parçaladığı saptanmıştır (7). Bunun yanı sıra NK hücreleri aktive edildiklerinde IFN- $\gamma$  üreterek ve makrofaj aktivasyonuna katılırlar (7,9). *B.abortus*'un IL-12 salgılamak için antijen sunan hücreleri uyararak NK hücrelerini aktive edebildiği gösterilmiştir (5,9). IL-12 de NK hücrelerini, öldürücü hücre olacak

ve IFN- $\gamma$  sekrete edecek şekilde uyarır. IFN- $\gamma$ 'nın bu salınımı, Th1 veya Tc1 benzeri edinsel immün yanıtı gerçekleştirmede rol oynayabilir (9).

İnsan NK hücrelerinin sitotoksik etkisinin *in vitro* ısı ile öldürülmüş *B.abortus*'a maruz bırakılmış makrofajlardan elde edilen IL-12 ile muamele edildiğinde arttığı; NK hücrelerinin disfonksiyonunun ise hastalığın kronisitesini arttırdığı gösterilmiştir (5). Öte yandan NK hücreleri olmayan farelerde yapılan çalışmalarda bu farelerin *B.abortus* enfeksiyonu ile başa çıkma yeteneğinin değiştirmedeği ortaya konmuştur (10). Bu bize fonksiyonel NK hücre yanıtı yokluğunda dahi, diğer immün yanıtların *B.abortus* enfeksiyonunu kontrol etmede yeterli olduğunu düşündürmektedir (9).

### **Antijen Sunan Hücreler: Dendritik Hücreler ve Makrofajlar**

Antijen sunan hücreler (Antigen Presenting Cells; APC), makrofaj ve dendritik hücreleri (DH) içerir. Bunlar NK hücreleri ile birlikte invaze olan mikroorganizmalara karşı reaksiyonda en erken görev yapan hücrelerdir, cilt altı ve mukozal bölgelerde bulunur (9). Doğal immün yanıt primer olarak monositik fagositler (MP) ve dendritik hücrelerin bakteri tarafından sentezlenen lipopolisakkarit, bakteriyel lipoprotein ve lipoteikoik asit gibi ürünler ile konağın kendi yapı elementlerini ayırt edebilmeleri yeteneğine bağlıdır (7). Fagositik hücreler, patern tanıyan reseptörler (pattern recognition receptors; PRR) denilen bir grup mikroorganizmanın paylaştığı değişmez moleküler paternlerini tanıyan reseptörler taşırlar. Makrofaj mannoz reseptör, CD14 ve çöpçü (scavenger) reseptörler ve Toll benzeri reseptörler gibi belirli konak reseptörlerine bakterinin bağlanması, mikroorganizmanın aktif bir şekilde içeri alınmasını sağlar (7,9). Sadece MP ve nötrofiller gibi profesyonel fagositler bunu yapabilir. Kimi zaman hücre içi bakteriler, profesyonel olmayan fagositlere de bağlanabilir. Ancak bu hücreler çok az fagositik aktivite gösterirler (7). Son zamanlarda patojenleri ayırt eden ve gerekli hücre içi sinyallerini sağlayan asıl moleküllerin Toll benzeri reseptörler (Toll like

receptor; TLR) olduğu, bu reseptörlerin fagositozda yer almadığı, ancak fagolizozomal maturasyonda rollerinin olduğu ortaya çıkmıştır (7). Bu reseptörlere direkt bağlanma sıklıkla kompleman komponentleri ve Ig tarafından dolaylı olarak desteklenir (7). Kompleman veya antikor yokluğunda bakterinin hücre içine alımında rol oynayan hücre reseptörleri henüz tanımlanmamıştır. Reseptörlere sıkı bağlanma, hücre içinde hücre iskeletinin invajinasyonu ve fagozom formasyonunu aktive eder (7,8).

Hücre içine alınan bakteri ve apoptotik hücreler APC'lerce işlenerek peptidler haline getirilir, yeni sentezlenmiş MHC sınıf I ve sınıf II molekülleri oluklarına yüklenerek, bu peptidlere özgül T hücre reseptörüne sahip T lenfositlerine sunulur. CD4<sup>+</sup> T hücreleri peptid-Sınıf II, CD8<sup>+</sup> T hücreler ise peptid-Sınıf I kompleksleri ile etkileşir (7,9). Nitekim ısı ile öldürülmüş *B.abortus*'un APC fonksiyonunun farklı yönleri üzerindeki etkileri çalışılmıştır ve *in vitro* çalışmalar *B.abortus*'un insan monositlerini proenflamatuvar sitokinler TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 salgılaması için uyardığını göstermiştir (8,9). Bu fonksiyon, *B.abortus*'tan elde edilen LPS ile de gösterilmiştir. Sitokinler ile aktivasyon, APC'i daha çok aktive eder, çeşitli antibakteriyel efektör mekanizmaların hareketlenmesine neden olur, mononükleer fagositlerin efektör hücrelere dönüşmesini sağlar (7). Fagositoz ve aktivasyonu takiben, APC'ler yüzeylerinde MHC ve kostimülatör moleküller B7.1/2'inin düzeylerini yukarı çeker; APC'ler daha sonra cilt ve mukozadan T hücre bölgeleri olan lenf düğümlerine göç ederler (9). Bu bölgelerde T hücrelerini TCR'yi aktive eden MHC peptid kompleksleri ve T hücrelerindeki CD28'i uyaran B7.1/2 gibi kostimülatör moleküller yoluyla stimüle eder (9). Bu iki sinyalin oluşması, kazanılmış immünite gibi antijene özgü yolda T hücreleri aktive eder.

Bunun dışında insan monositlerindeki hücrelerarası adhezyon molekülü (Intercellular adhesion molecule-1; ICAM-1) ekspresyonu da artar, APC ve T hücreleri arasındaki etkileşim daha da güçlenerek T hücrelerinin APC tarafından aktivasyonu artırılır (9). Aktive T hücreler de APC'leri T



hücrelerdeki CD40 ligandı ile ve IFN- $\gamma$ 'nın sekresyonu ile aktive edebilir (9). APC'nin özellikle DH'lerin enfeksiyon etkeni ile aktivasyonu, sıklıkla IL-12 sekresyonu ile sonuçlanır (9). IL-12 NK hücrelerinin ve antijene özgü efektör hücelere dönüşen T ve B hücrelerinin aktivasyonu ve farklılaşması dahil başlatıcı ve esas rolü oynamaktadır (5,9). IL-12 Th1 hücrelerinin gelişimini uyarır ve böylece makrofajları aktive eden önemli bir sitokin olan IFN- $\gamma$  yapımının sürekliliğini sağlar (11). Brusellozda IL-12'nin önemi Zhan ve Cheers'in (12) çalışmasında gösterilmiştir. Th1 sitokini olan IFN- $\gamma$ , makrofajı aktive etmede ve Brucella'nın neden olduğu enfeksiyonu sınırlandırmada hem *in vivo* hem de *in vitro* önemli bir rol oynar. Zıt olarak makrofaj aktivasyonu IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  gibi Th2 sitokinleri tarafından baskılanabilir ve bu durum enfeksiyona duyarlılığı artırabilir (7).

Mononükleer fagositler bir defa aktive olduktan sonra mikroorganizmaları öldürme yeteneği kazanır ve lokal doku yıkımına katılan proteolitik enzimlerin yanı sıra; fagozom atağı, granülom oluşumu ve makrofaj aktivasyonunu düzenleyen sitokinler gibi hastalığın sonucunu etkileyecek aktif molekülleri salgılar (7).

Makrofajların bakterisidal fonksiyonları IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  tarafından uyarılan reaktif oksijen metabolitleri (ROM) ve reaktif nitrojen metabolitleri (RNM) ile gerçekleştirilir (5). IFN- $\gamma$  veya IgG uyarımı ile membrana bağlı NADPH oksidazın aktivasyonu, toksik ROM, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup> oluşumu ile sonuçlanan oksidatif patlamayı başlatır. Ayrıca IFN- $\gamma$ , TNF ve lipoteikoikasit gibi mikrobiyal ürünlerce uyarılan NO oluşumu sonucu açığa çıkan RNM bakterisidal etkisini ROM ile sinerjizm oluşturarak, bakteriyel enzimlerin demir ve sülfür içeren reaktif merkezlerini yıkarak gerçekleştirebilir (7). Demir ise hem prokaryot, hem ökaryotlarda çoğu biyokimyasal süreçte gereklidir. Dolayısıyla hücre içi demir havuzu için konak hücre ve patojen arasında yarış mevcuttur. IFN- $\gamma$  ile aktive olan demir yüklü makrofajlar, hücre içi Brucella'yı öldürmek için artmış kapasiteye sahiptir. Ayrıca bu makrofajların, demirin

Haber-Weiss reaksiyonunu katalize etme yeteneği sayesinde mikroorganizmayı elimine edebilmesi ROM'nin önemini doğrular (5).

Hem MP hem de profesyonel olmayan fagositlerde IFN- $\gamma$  aracılığı ile indolamin 2-3-deoksijenaz uyarılarak triptofan yıkımı gerçekleştirilir. Triptofanın kısıtlanması mikroorganizmaların yaşaması için gerekli besinlerden yoksun bırakılarak öldürülmesine iyi bir örnektir. (7).

Defensin ve bazik proteinler fagositlerde yaygın bulunan, bazik pH'da mikrobisidal küçük lizozomal antimikrobiyal polipeptidlerdir. Bu peptidlerin çoğu hücre içi bakterilere karşı bakterisidal etkiye sahiptirler (7).

Brucella bakterisi mukozal epitelden geçişı izleyerek bölgesel lenf noduna serbest ya da fagositik hücre içinde taşınır (5). Peyer plaklarında mononükleer fagositler mikroorganizmayı alır, ancak tamamen eradike edemez. Bunlar daha derin dokulara iletmek için sığınak yada geçiş sistemi olarak görev yapar (2,7). Başlangıçta mononükleer fagositlerce alınmış Brucella hücre içinde yaşamını ve çoğalmasını sürdürür (5). Burada üredikten sonra lenf yolu ile genel dolaşıma karışır. Mikroorganizma hematogen yayılımı takiben, karaciğer, dalak, kemik iliği gibi retiküloendotelial sistemden zengin organlarda lokalize olur.

Mikroorganizmanın konakta sayısının artış nedeni öldürme mekanizmalarından kaçmasıdır (2,5,7). Brucella, fagositozu takiben sadece nötrofillerde öldürülmeye dirençli değil, aynı zamanda makrofaj ve profesyonel olmayan fagositlerde de çoğalma yeteneğine sahiptir. Kronik enfeksiyon gelişmesinden de sorumlu tutulan makrofaj içinde yaşama yeteneği, bakterinin kompleman ve antikor gibi hücre dışı konak savunmasından kaçmasına, antimikrobiyal ajanlardan korunmasına neden olur (5,7). Makrofajlarda hücre içi yaşamlarını sürdürebilmeleri Brucella'nın çözünebilir ürünleri ve stres uyarısı ile artan sayıdaki proteinler sayesinde

fagozomun hızlı asidifikasyonu ile fagozom-lizozom füzyonunun inhibisyonu sayesinde kolaylaşır (7,8).

Makrofaj bakteriye karşı atak başarısız olduğunda bakterinin daha çok çoğalmasını önlemek için kendi apoptozunu uyarabilir (11). Ancak, Dornand ve ark. (13) tarafından *B.suis* enfeksiyonunun, insan monositlerinde apoptozu engellediği, konak hücre eliminasyonunu engelleyerek, monosit/makrofajın apoptotik yanıtını patojen lehine düzenlendiği gösterilmiştir. Ayrıca pek çok hücre içi bakteri süperoksid dismutaz, katalaz gibi ROM'ni detoksifiye eden enzimler salgılar. Bu sonuçlar RNM'ni de etkiler. Eğer makrofajdaki öldürücü mekanizmalar ile kontrol edilemez ise bakteri çoğalarak birikir ve konak hücreyi zedeler; hücre içinde biriken bakteri hücre dışına çıkmadan direkt diğer hücrelere geçer (7).

Mikroorganizmaya karşı immünitinin gelişmesi ve makrofajların aktive olması ile mikroorganizmalar öldürülmeye başlar ve bakterinin sahip olduğu hücre duvar yapısı (LPS; endotoksin) kana dökülür. Organizmanın bu endotoksine yanıtı ile de hastalıkta görülen birçok belirti ortaya çıkar. Histopatolojik olarak konak hücre yanıtı apse oluşumundan lenfositik infiltrasyon ve kazeöz nekroz ile granülom oluşumuna kadar değişebilir (7). Savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılamayan bakteriler, granülom oluşumu ile sınırlandırılmaya çalışılır. Özellikle dalak, karaciğer ve kemik iliğinde; epiteloid hücreler, plazma hücreleri ve mononükleer hücreleri içeren hücre yığınları Bruselloz'un karakteristik histopatolojik görünümü olan granülomları oluşturur (4). Granümatöz lezyonlar, bakteriyel ürün, kemokinler, enfeksiyon bölgesinde endotel hücre ve mononükleer fagositler tarafından üretilen IL-1 ve TNF- $\alpha$  ile gerçekleştirilen nonspesifik enflamatuvar sinyaller tarafından başlatılır. Granülom içindeki bakterinin tamamen eliminasyonu zordur. Aslında bu doku reaksiyonu bakterinin oksijen ve besin kaynağını azaltır, bakterinin yayılmasını engeller. Ancak aynı granülom, bulunduğu organın fizyolojik fonksiyonunu bozabilir (7).

## Edinsel (Kazanılmış) İmmün Yanıt

Kazanılmış immün yanıt, yabancı antijenlerin peptidlere parçalanıp, daha sonra monositik fagosit ve dendritik hücreler dahil antijen sunan hücrelerin yüzeylerinde MHC molekül içeriğinde T hücrelere sunulmasına ve doğal yanıt süresince farklı bakteri türleri üstündeki etkisine bağlı olarak zayıf veya kuvvetli uyarılan sinyallere dayanır (7). Bu immün yanıt, aşılama anahtar rolü oynayan belleğin geliştirilmesinde önemlidir (5).

Bruselloz'a karşı gelişen kazanılmış immün yanıt fonksiyonları, 3 mekanizma ile sınıflandırılmıştır (5);

- $CD4^+$ ,  $CD8^+$  ve  $\gamma\delta$  T hücreler tarafından üretilen IFN- $\gamma$  mikroorganizmanın hücre içinde yaşamasını engellemek için makrofajlarda bakterisidal fonksiyonu aktive eder.

- $CD8^+$  ve  $\gamma\delta$  T hücrelerinin sitotoksitesi, enfekte makrofajları öldürür.

- IgG2a ve IgG3 gibi Th1 tip antikor izotipleri fagositozu artırmak için patojeni opzonize eder.

## T Lenfositler

Hücre içi bakteriye karşı direnç, kazanılmış immün yanıt ve T lenfositlerce makrofajların aktivasyonuna dayalıdır (14). T lenfositler, en koruyucu korunma mekanizmalarını başlatmakla kalmaz, konağa verilecek zararı azaltacak şekilde koruyucu yanıtı sadece savaş bölgesinde sınırlandırır. Ancak hücre içi bakteriyel enfeksiyonların patogenezinin özellikle T lenfositlerce saptanması nedeniyle T hücre yanıtının sıkı bir şekilde kontrol edilip, gerekirse azaltılması gereklidir (7).

Koruyucu immünite  $\gamma\delta$ , CD1 kısıtlı  $\alpha\beta$  T hücreleri, CD4  $\alpha\beta$  T hücreler, CD8  $\alpha\beta$  T hücreleri içerir. Bu hücreler bağımsız davranmaz ve diğer hücrelerle koordineli çalışırlar (7). T hücreleri  $CD4^+$  T helper (Th) ve  $CD8^+$  T

sitotoksik (Tc) olmak üzere 2 majör alt populasyondan oluşur (11). Bu hücreler DH aktivasyonunu takiben naif (Th0 veya Tc0) hücrelerden efektör veya hafıza hücrelerine dönüştürülür. Th0 hücrelerinden tüm T hücre subsetlerinin gelişimi belirli sitokinlerin düzenlenmesi altındadır (9). Makrofajlardan salgılanan IL-12 ve IL-18 Th1 gelişimini de uyarır. Th2 gelişiminden sorumlu olan sitokin ise IL-4'tür (7). Genel olarak, hücre içi patojenler ile yapılan deneysel çalışmalar koruyucu olan yanıtın Th1 olduğunu göstermiştir (7). Hücre içi patojeni elimine ederken, Th1 tip immün yanıtın uyarılması, aynı zamanda enflamasyon aracılı doku hasarı için bir riskdir. Dolayısıyla konak sonuçta kendisine zarar verebilecek immün yanıtı kontrol ederek immünopatolojiyi engellemelidir. Bu IL-10, TGF- $\beta$  gibi sitokinlerin üretimi ile gerçekleştirilir. Bu sitokinlerin en önemli görevi; IL-12'nin etkilerini inhibe etmek ve IFN- $\gamma$  aracılı makrofaj aktivasyonunu antagonize etmektir. Ancak bazı durumlarda, bu sitokinler enfeksiyonun erken döneminde üretilip doğru immün yanıtı baskılayabilir (7).

### **CD4<sup>+</sup> T Lenfositler**

Bu hücreler fagozomal bölümden hücre yüzeyine taşınıp MHC Sınıf II molekül tarafından sunulan antijenik peptidleri tanır. Bazı hücre içi bakteriler için hedef hücre olan epitel, endotel hücre ve hepatositler gibi hücreler ancak IFN- $\gamma$  ile uyarım sonrası bu hücreler MHC Sınıf II moleküllerini ekspres edebilir ve CD4<sup>+</sup> T hücrelerini uyarabilir (7). CD4<sup>+</sup> T hücrelerin aktivasyonu, efektör ve hafıza hücrelerine farklılaşması ile sonuçlanabilir (9). CD4<sup>+</sup> T hücreler, sitokin üretimine göre farklı 2 gruba ayrılır; Th1 hücreler IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , Th2 hücreler IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 üretir (7,9). Dolayısıyla bu hücreler ile uyarılan konak immün sisteminde farklılıklar mevcuttur. Th1 hücrelerden salgılanan IFN- $\gamma$  makrofaj aktivasyonu, sitolitik CD8<sup>+</sup> T hücrelerin uyarılması, opzonize eden IgG antikor üretimi ile karakterize hücre sel immüniteyi uyarır. Bunun aksine Th2 hücreler B hücrelerin farklılaşmasını kontrol eder, farede IgE ve IgG1 dönüşümünü artırır (7,9).

## CD8<sup>+</sup> T Lenfositler

CD8<sup>+</sup> T lenfositler, MHC Sınıf I molekülü ile kompleks yapmış olan antijenik peptidleri tanır. Bu hücrelerin sitolitik potansiyeli, enfeksiyon hastalıklarında savunmada iki rolü üstlenir; antijene özgü MHC Sınıf I sınırlı durumda hedef hücreyi öldürerek, bakterinin üremesini direkt inhibe etmek veya enfeksiyonu kontrol etmede yetersiz kalan hücreleri parçalayarak, bakterinin salınımını ve daha aktif hücrelerce fagositozunu sağlamak (7). Ayrıca MHC Sınıf I, çekirdekli tüm konak hücrelerinde bulunduğu için, profesyonel ya da profesyonel olmayan fagositleri eşit derecede tanıyabilmesi nedeni ile enfekte profesyonel olmayan fagositlerde CD4<sup>+</sup> T lenfosit tanınması için gerekli MHC Sınıf II yüzey ekspresyonunun uyarılmasına da katılırlar (7). CD8<sup>+</sup> T hücreler, salgıladıkları sitokinlere dayanarak Tc1 (T sitotoksik tip1) ve Tc2 (T sitotoksik tip2) olarak ayrılır. Bununla birlikte, CD8<sup>+</sup> T hücre yanıtı durumunda IL-4 salgılayan hücrelerden ziyade IFN- $\gamma$  salgılayan hücreler yani Tc1 yolağı baskın olur (9). CD8<sup>+</sup> hücreler, IFN- $\gamma$ 'nın kaynağı da olması nedeniyle, bu sitokinin salgılanması yoluyla gerçekleşen koruyucu mekanizmalara katılır (7). Oliveira ve ark. (14) CD8<sup>+</sup> T lenfositlerin IFN- $\gamma$  üretimi, sitotoksik aktivite, makrofaj öldürme aktivitesi ve Tip 2 sitokinlerin downregülasyonu gibi görevlerinin hücre içi enfeksiyonu kontrol etmede önemli rol oynadığını öne sürmüşlerdir.

Daha önceleri hücre içi bakteriye karşı immünitinin özellikle CD4<sup>+</sup> T lenfosit aracılı olduğuna inanılırdı (15). Son yıllarda, hücre içi bakterilere karşı optimal korumanın, uygun sitokin üreten farklı T hücre alt grupları arasındaki karşılıklı ilişkilerle olduğu ortaya konulmuştur (8,14). Daha önce yapılan Bruselloz çalışmalarında hastalığa karşı defansta CD4<sup>+</sup> ve/veya CD8<sup>+</sup> T lenfositlerin rolüne dair çelişkili veriler mevcuttur (5,8). Fare deneylerinde, CD8<sup>+</sup> T lenfosit deplesyonu ile Brucella'nın eliminasyonunun engellenmesi CD8<sup>+</sup> T lenfositlerin kazanılmış immün yanıtta kritik rolü olduğunu düşündürmüştür (8). Vahşi tip fareler ile olduğu kadar, MHC Sınıf I'den yoksun fareler ile yapılmış ek çalışmalar brusellozu kontrol etmede CD8<sup>+</sup> T

lenfositlerce üretilen IFN- $\gamma$  ve IL-2 gibi tip 1 sitokinlerin üretiminin önemli rol oynadığını göstermiştir (5,8,14). Bununla birlikte, major T hücre popülasyonu sayı anlamında CD4<sup>+</sup> T lenfositleri olduğu ve bu hücre grubunun IFN- $\gamma$  salgıladığı göz önüne alınarak Brusellozda CD4<sup>+</sup> T lenfositlerinin rolü gözardı edilmemelidir (5).

### **$\gamma\delta$ T Hücreler**

Hastalığın dönemine ve etyolojik ajana bağlı olarak farklı T hücre alt gruplarının kazanılmış dirence katılımı değişebilir. İnsan ve farelerde  $\alpha\beta$  T hücreleri, kan ve periferdeki tüm lenfositlerin %90'ından fazlasını oluştururken, %10'dan azını  $\gamma\delta$  T hücreler oluşturur. Oysa mukozadaki epitelyal lenfositlerin çoğu da  $\gamma\delta$  T hücrelerden oluşur (7).  $\gamma\delta$  T hücrelerin immüniteye katılımı tam anlaşılmamakla birlikte bu hücreler sitokin üretir ve sitolitiklerdir. Tüm enfekte konak hücreleri  $\gamma\delta$  T hücreler için potansiyel hedeftir (7). İnsanlardaki dolaşan  $\gamma\delta$  T hücrelerin çoğu V $\gamma$ 9 ve V $\delta$ 2 bölge çiftine sahip TcR kullanır (13). Bertotto ve ark. (16) *B.melitensis* enfeksiyonu akut fazındaki hastaların periferik dolaşımındaki V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TcR taşıyan  $\gamma\delta$  T hücreleri sayısının tüm T lenfositlerin sayısının %30'una ulaşarak belirgin arttığını saptamışlardır. Dornand ve ark.(13) tarafından Brucella'nın V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lenfositleri TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve henüz tespit edilmemiş sitokinleri salgılaması için uyaran, düşük molekül ağırlıklı (<3000 KD) peptit yapıda olmayan fraksiyon (BSF) salgıladığı yayınlanmıştır. İlginç olarak 1 yaşından küçük sığırların major T hücre popülasyonu  $\alpha\beta$  T hücreler değil,  $\gamma\delta$  T hücreleridir. Bu da Brucella ile enfekte sığırlarda  $\gamma\delta$  T hücrelerin rolünün daha belirgin olduğunu düşündürmüştür (5).  $\gamma\delta$  T hücrelerin antijen tanıma açısından daha az seçici olmasından dolayı, bu hücreler muhtemelen spesifik olmayan direnç ile daha spesifik  $\alpha\beta$  T hücre yanıtı arasındaki boşluğu doldurmaktadırlar (7).

## CD I Moleküllerce Kontrol Edilen T Hücreler

CD I, glikolipid antijenleri, konvansiyonel olmayan T hücelere prezente edebilen polimorfik olmayan MHC ilişkili molekül grubunu kapsar. İnsanlarda CD I molekülleeri ile sunulan peptidlere yanıt veren T hüceler, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> veya CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>'dir ve  $\alpha\beta$  TCR ekspresse eder. Bu hüceler, antijen uyarısından sonra gelişebilir ve IFN- $\gamma$  sentezleyerek enfekte makrofajı aktive eder (7).

## T Regülatör Hüceler

İmmün yanıtı baskılayan T lenfositler olarak ifade edebileceğimiz T regülatör (T<sub>REG</sub>) hüceler arasında Tip1 T regülatör (Tr1) hüceler, Th3 hüceler ve CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T lenfositler sayılabilir. T<sub>REG</sub> hüceler immün yanıtı hücre-hücre ilişkisi ve/veya süpressör sitokinler aracılığı ile etkiler. Nitekim bu hüceler arasında sayılan Tr1 hüceler IL-10 ve TGF- $\beta$  salgılama yeteneğine sahip olup, bu sitokinler aracılığı ile naif ve hafıza Th1 ve Th2 yanıtını baskılar (17). Fernandes ve Baldwin'in (18) çalışmasında anti IL-10 ile kültüre edilmiş dalak hücelerinde artmış IFN- $\gamma$ , anti IL-10 ile muamele edilmiş *B.abortus* ile enfekte farede azalmış bakteri yükü ile gösterildiği gibi IL-10 dolayısıyla T<sub>REG</sub> hüceler Bruselloz'da immün yanıtı katılarak hücresele immün yanıtı azaltabilir.

## B Lenfositler

Bruselloz'a karşı gelişen dirençte humoral immünitenin rolünü bildiren pek çok çalışmaya rağmen antikorun konağı korumadaki rolü çelişkilidir. Çoğu pasif serum transfer çalışmaları, fare brusellozunda humoral immünitenin önemini düşündürür (5). Anti-LPS antikorı içeren serumun farelere pasif transferinin, virülan *B.abortus*'a karşı koruduğu gösterilmiştir (15). Ayrıca, *B.abortus* O-polisakkaride özgü monoklonal antikor (IgG2a)'nın pasif transferi, *B.abortus* enfeksiyonundan fareyi korumuştur (5). Enfekte farelerde, doğal konağa benzer şekilde IgG2a ve IgG3 baskın antikor tipidir (5,9). IgG



izotiplerinin üretimi, bu hastalıkta baskın olan Th1 hücrelerince uyarılır. Bu da Bruselloz'da Th1 aracılı immün yanıtın oluştuğunu gösterir (5). Muhtemelen hücre içi öldürmeyi arttırarak opzonizasyonun Brucella enfeksiyonuna karşı gelişen antikorun esas koruma rolünü üstlendiği kabul edilir. Öte yandan O-polisakkaridden yoksun *B.abortus* RB51 suşu, aşı suşu olarak en iyi korumayı sağlar (5). Bu da immün korumanın O-polisakkarid'e özgü antikor olmadan mümkün olduğunu gösterir. Bir taraftan aktif enfeksiyon süresince gelişen Th1 yanıtının IgG üretimini artırması, diğer taraftan yüksek antikor titrelerinin negatif etkisi, bir yandan da fareye IgG'nin pasif transferinin koruyucu etkisi antikoların Bruselloz'daki çelişkili rolünü vurgulamaktadır. Mikroorganizmanın edilmesi belki de Th1 yanıtı ve sınırlı IgG1 üretimi arasındaki dengeye bağlıdır (8). Spesifik antikorların pasif transferinin fareyi korurken, sığırı koruyamama yeteneği, farklı hayvan türlerinde hastalığın rezolüsyonunda diğer bir konak farklılığı olarak görünmektedir. Çeşitli türlerde, antikorla korunmadaki bu farklılığın mekanizması bilinmemektedir (8).

Görüldüğü gibi Bruselloz'da immün sistemin APC, NK, T ve B hücreleri olarak adlandırılan farklı kolları koordineli bir yanıt için birlikte hareket eder. Bu yanıtın insanlardaki klinik yansımalarına bakacak olursak akut brusellozlu hastalarda NK hücre fonksiyonlarının inhibisyonu ve IFN- $\gamma$ 'nın bozulmuş üretimi, normal T hücre yanıtında defekt bildirilmiştir (19). T lenfositler ve makrofajlar ile enfekte konak hücreler, sitokinler arasındaki bu karmaşık ilişkiyi anlamak, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde bize yarar sağlayacaktır.

### **Konak T Hücre Yanıtını Uyaran Brucella Antijenleri**

Bbruselloza karşı korumada IFN- $\gamma$  üretimi ile Th1 tip immün yanıtın uyarımının ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerin gelişiminin esas rolü oynadığı birçok çalışmada belirtilmiştir (14,20,21). Ancak bruselloza karşı koruyucu hücresel yanıtın uyarısına katılan özgün antijenin doğasına dair bilgilerin sınırlı olması nedeniyle T lenfosit aracılı immün yanıtı uyaran bakteriyel proteinlerin

saptanması Bruselloz'a karşı gelişen immüniteyi anlamada, alternatif aşuların ve yeni tanı metodlarının geliştirilmesinde önemlidir.

Koruyucu T hücre antijenleri 3 özelliği paylaşmalıdır; Birincisi, hücre içinde yaşayan bakteri somatik antijen için fakir bir kaynaktır. Dolayısıyla bu patojenlere karşı gelişecek olan T hücre yanıtı salgılanan proteinlere hedeflenmek durumundadırlar (7). İkinci önemli durum, antijenlerin MHC Sınıf I ve Sınıf II işleme yollarında uygun dağılımıdır. MHC Sınıf I ile işleme uğrayabilmesi için aşı hücre içinde sitoplazmaya girebilen bir protein taşınmalıdır (7). Üçüncüsü CD8<sup>+</sup> T hücreler, sadece konvansiyonel peptidleri değil N-formil metiyonil (N-fmet) sekansı içeren konvansiyonel olmayan peptidleri de tanır. Bu peptid aşularının tasarımı için önemlidir (7).

Denoel ve ark. (22) tarafından yapılan çalışmada, ticari bir gecikmiş tip hipersensitivite allerjisi olan fraksiyone Brusellergene, *B.melitensis* suş B115'ten hazırlanarak 18 protein fraksiyonuna bölünmüştür. Test edilen 18 fraksiyon arasından maksimum T hücre aktivasyonu gösteren Brucella bakterioferritin ve P39 proteinleri tanımlanmıştır. Al-Mariri ve ark. (23,24) bakterioferritin ve P39 proteinlerinin farede Th tip1 immün yanıtı uyardığını, bir periplazmik bağlayan protein P39'un içerdiği CpG motifleri nedeniyle ile *B.abortus*'a karşı etkin bir koruyuculuk sağladığını göstermişlerdir. Cespedes ve ark. (25) ise *B.abortus* RB51'i parçalayarak 2 protein tanımlamışlar. Her iki proteinin de *in vitro* T hücre proliferatif yanıtı uyarma yeteneğine sahipken, bunlardan sadece birinin (22,9 kD'luk bir protein) BALB/c farede savunmayı uyarmıştır. Brooks-Worrell ve Splitter (26) ise lenfosit proliferasyonu uyaran her bir *B.abortus* proteinini 1 ve 2 boyutlu hücrel immünoblotting ile karakterize ederek ve 38 Brucella proteini ayırtmış. Ek olarak, suş 19 ile aşılanmış hayvanların lenfositlerinin, diğer Brucella türlerinden izole edilmiş proteinlere yanıt olarak proliferatif olduğu belirlenmiştir (27). Bu stratejiyi kullanılarak Oliveira ve Splitter (28) tarafından immünodominant molekül olarak *B.abortus* L7/L12 ribozomal proteini saptanmıştır. Farklı çalışmalarda *M.bovis* ve *B.melitensis*'in L7/L12'si ile

aşılarmış kobaylarda ciddi bir gecikmiş tip aşırı duyarlılığın geliştiği belirlenmiştir (29,30). Öte yandan Brucella ribozomal preparasyonların, suş19 ile aşılamadaki koruma ile eş korumayı sağladığı gösterilmiştir (20). Kurar ve Splitter'in (31) çalışmasında L7/L12'yi kodlayan gen kullanılarak yapılan DNA aşısının farede koruyucu yanıtı uyardığı gösterilmiştir. Oliveira ve Splitter (32) çalışmalarında farede L7/L12'in Brucella'ya karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir.

İkinci strateji olarak Sığır T hücrelerini uyaran immünogenik proteinleri tespit etmek için *B.abortus* 2308 genomik kütüphanesi kullanılmış. Araştırılan 300 klonun 10 klonun T lenfosit proliferasyonunu uyardığı ve bunlar arasında *B.abortus* uvrA proteinin test edilen tüm hayvanlarda sığır T lenfositlerini aktive ettiği saptanmıştır. Ayrıca rekombinan uvrA'nın farede CD4<sup>+</sup> T hücrelerini IL-2 ve IFN-γ salgılamak için uyardığı ve Brucella'ya duyarlanmış kobaylarda gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtına sebep olduğu gösterilmiştir (20,33). Pek çok hayvanda T hücre proliferasyonunu uyaran bir diğer protein olan Gliseraldehit-3-fosfatdehidrojenaz (GAPDH), klon 182'nin DNA sekans analizi sonucu GAPDH enzimini kodlayan *B.abortus* gap geninin varlığının gösterilmesi ile tanımlanmıştır. Rosinha ve ark. (34) Brucella rekombinan GAPDH'nin hem humoral hem de hücre sel immün yanıtı uyardığı göstermiş, rGAPDH'ye *in vitro* stimülasyona yanıt olarak rGAPDH veya *B.abortus* S19 ile aşılaman farelerin splenositlerinin IFN-γ ve TNF-α üretirken IL-4 sentezlemediğini saptamıştır. Bunun yanısıra diğer bakteriler ile Brucella'nın GAPDH aminoasit sekanslarının benzer olmadığı, bu neden ile oldukça özgül olduğu belirtilmiştir. Ayrıca *gap* geni ile fare IL-12 molekülünü kodlayan genin DNA aşısı şeklinde uygulanmasının farede Brucella enfeksiyonuna karşı kısmi koruma sağladığı gösterilmiştir (34). Kütüphane tarama metodları ile pek çok araştırmacı, farklı antijenler tanımlayabilmişlerdir (20). Örneğin Vemulapalli ve ark. (35) IgG2a alt sınıf antikorunun IFN-γ üretiminin dolayısıyla Th1 tip immün yanıtın belirteci olmasından yola çıkarak fare IgG2a tipi antikor ile reaksiyona giren antijenler için *B.abortus* genomik kütüphanesini taramak sureti ile proteinler izole etmişlerdir.

Brucella proteinlerinin konak T hücreleri aktivite eden ve deneysel hayvan modellerinde sebep oldukları koruyucu immün yanıtlar incelendiğinde, sadece L7/L12 ribozomal protein, Cu/Zn süperoksid dismutaz, P39 periplazmik protein, fonksiyonu bilinmeyen 22,9 kDa proteinin fare modelinde kısmi korumayı sağlayabildiği saptanmıştır (20).

Özet olarak, Bruselloz enfeksiyonuna karşı konak savunması primer olarak Th1 tip immün yanıt ile düzenlenir (36). Bu güçlü T hücre yanıtını arttıran Brucella proteinlerini tespit etmek konağın Brucella'yı nasıl tanıdığı ve elimine ettiğinin anlaşılmasında önemlidir, ayrıca alternatif aşılarda oluşturulabilecek proteinleri seçmede de en önemli basamaktır. Öte yandan bakteriyel genlerin ve bunların kodladığı protein ürünlerin immün fonksiyonunu anlamak, konak patojen ilişkisini daha ayrıntılı olarak ortaya koyma imkanı sağlayacaktır. Bu sayede önemli Brucella proteinlerine yanıtındaki bireysel farklılıklar neden belirli kişilerin Brucella'yı elimine etmede başarılı iken, diğer bireylerde Bruselloz'un aylarca ve hatta yıllarca uzayabildiğini de açıklayabilir. Ayrıca yeni tanımlanmış bakteriyel gen ürünlerinin bazıları teşhis için reaktan geliştirilmesinde de kullanılabilirler.

Pek çok yeni sentetik peptid Brucella antijenlerinden hazırlanarak, hayvan modellerinde denenmiştir. Ancak bu peptidlere karşı insan immün sisteminin yanıtı hakkında çok az bilgi mevcuttur. Bruselloz'da konak immün yanıtı açısından farklılıklar olduğunu bildiren yayınlar (8,13) da göz önüne alınırsa bu peptidlere karşı insan immün sisteminin yanıtının araştırılması daha da önem kazanır. Çalışmamızda bu peptidlerden L7/L12 ve GAPDH'ye karşı Bruselloz'lu hastaların periferik kan lenfositlerinin profilleri ve sitokin yanıtının araştırılması amaçladık. Akut Bruselloz'lu ve sağlıklı bireylerin kan lenfositlerinde bu antijenlere yanıt olarak ortaya çıkan lenfosit alt gruplarındaki değişiklik flow sitometri ile ve bu hücrelerin kültür süpernatantlarında hücre dışı sitokin üretimi ELISA yöntemi ile araştırdık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvurarak klinik, serolojik ve bakteriyolojik olarak "Akut Bruselloz" tanısı konulmuş 25 hasta alındı. Bruselloz için teşhis kriterleri; klinik bulgular eşliğinde kan kültüründe (BACTEC 9050, Becton-Dickinson Diagnostic Instrument System, Sparks, A.B.D.) *Brucella* spp. üretilmesi veya tek serum örneğinde SAT ya da Coombs'lu SAT'nde 1/160 ve üzerinde titre saptanmasıdır. Bunun yanı sıra daha önce Bruselloz geçirme öyküsü olmayan, serolojik ve klinik olarak Bruselloz ile uyumlu bulgu saptanmayan, ek hastalığı bulunmayan 15 sağlıklı kişi kontrol grubuna dahil edildi. Çalışmaya katılan tüm hastalara ve sağlıklı kişilere çalışma hakkında bilgi verilerek, onayları alındı.

Hasta ve sağlıklı kontrol grubundaki kişilerden heparinli 20 ml kan alındı. Bekletilmeden işleme alınan kanlar %10 FCS içeren zenginleştirilmiş RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.) (Bkz. Ek) ile süspansiyon haline getirildi.

### Mononükleer Hücre Kültürleri

%10 FCS içeren zenginleştirilmiş RPMI-1640 (cRPMI) (Sigma) ile süspansiyon haline getirilmiş kan örnekleri 15 ml ficoll (BIOCHROM AG, Berlin, Almanya) solüsyonu üzerine yadırlıktan sonra dansite gradient santrifüj yöntemi kullanılarak mononükleer hücreler elde edildi. Bu hücreler üç defa cRPMI-1640 ile yıkandı ve sulandırılarak hücre sayımı yapıldı. 48 kuyucuklu mikropatlara her örnek için 8 kuyu kullanılarak, kuyucuk başına hücre sayısı  $5 \times 10^5$  hücre/ 500  $\mu$ l olacak şekilde dağıtıldı.

Hücreleri stimüle etmek için sırasıyla ikişer kuyuya 3 µg/ml PHA (Sigma), 5 µg/ml L7/L12 ve 5 µg/ml GAPDH (Dr. Sergio C.Oliveira, Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Brazil) eklendi. Herhangi bir stimüle edici ajan ilave edilmeyen son kuyudaki hücreler kontrol amacı ile kullanıldı. Hücreler %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C' de enkübe edildi. Hücre dışı sitokinlerin değerlendirilmesi için PHA ile stimüle edilen hücrelerde 2. günün sonunda; L7/L12 veya GAPDH ile stimüle edilen hücrelerde 6. gün kültür süpernatantları ayrılarak değerlendirme yapılarına dek -86°C'de saklandı.

Kalan hücreler %10 FCS içeren zenginleştirilmiş RPMI-1640 ile toplam hacmi 500 µl olacak şekilde yeniden süspande edildi. Lenfosit alt gruplarını değerlendirme amacı ile bu süspansiyondan örnek başına, stimüle edilen ve edilmeyen gruplar için 7'şer tüp ile toplam 28 adet akım sitometri tüpü (70x15 mm) kullanılarak, her tüpe 5x10<sup>5</sup> hücre/50µl aktarıldı. İnsan mononükleer hücre yüzey belirteçlerine karşı farelerden elde edilmiş fluorescein isothiocyanate (FITC) veya phycoerytrin (PE) ile işaretli monoklonal antikordardan her tüpe [IgG1-FITC/IgG1-PE, CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE, CD4-FITC/CD25-PE, CD4-FITC/CD27-PE, CD3-FITC/CD69-PE, CD3-FITC/CD152 (CTLA4)-PE] on'ar µl eklendi. Tüpler oda ısı ve karanlıkta 15 dakika enkübe edildikten sonra eritrositleri parçalayan, lökosit ve membranlarını stabilize eden reaktifleri (ImmunoPrep™, Beckman/Coulter, CA, A.B.D.) içeren, Multi-Q Prep sisteminden (Beckman/Coulter) geçirildi. Lenfosit alt grupları akım sitometre (Epics XL.MCL, Beckman/Coulter) ile değerlendirildi.

Hücre dışı sitokin ölçümü için daha önceden ayrılmış hücre kültür süpernatantları kullanıldı. Bu süpernatantlarda IFN-γ, IL-4, IL-10 ölçümü için ticari kantitatif sandviç enzim bağlı immünosorbent assay (ELISA) kitleri (BIOSOURCE, CA, A.B.D.) kullanılarak üretici firma tarafından önerilen protokole göre ölçüldü. Standart eğri çizilmesi ve kantitatif değerlerin saptanmasında MS Excel programı kullanıldı.

## **İstatistiksel Değerlendirme**

Elde edilen veriler Uludağ Üniversitesi Tıp Fakóltesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda istatistiksel olarak değerlendirildi. Ortalama ve standart hatayı kapsayan tanımlayıcı istatistikler yapıldı. Mononükleer hücre kültürleri kullanılarak yapılan hücre dışı sitokin ve lenfosit alt gruplarının değerlendirilmesinde Wilcoxon İşaret Sıra Testi ve hasta ile sağlıklı grupları karşılaőtırmada Mann-Whitney U Testi'nden yararlanıldı.

Çalışmada stimölasyon altında ve stimölasyon olmadan ölçölen hücre dışı sitokin miktarı ve lenfosit alt grupları dağılımındaki değişim oranları yüzde değişime göre Őu formöl ile hesaplandı; "Stimölasyon altındaki değer - stimölasyon olmadan elde edilen değer / Stimölasyon olmadan elde edilen değer". Daha sonra hasta ve sağlıklı gruplardaki bu değişim oranları istatistiksel olarak karşılaőtırıldı.

Verilerin istatistiksel analizinde SSPS 13.0 istatistik paket programı kullanıldı.

## BULGULAR

Mononükleer hücre kültürleri için hasta grubuna ait 25 olgu ve kontrol grubuna ait 15 birey çalışmaya alındı. Bruselloz'lu olguların 15'i kadın, 10'u erkek olup, yaş ortalaması 46,7 idi. Kontrol grubundaki sağlıklıların 8'i kadın, 7'si erkekti. Yaş ortalaması ise 31,3 idi.

### Hücre Dışı Sitokin Değerlendirmeleri

Hücre dışı IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 düzeyleri, periferik kan mononükleer hücrelerinin stimüle edilmemiş (US) ve PHA, L7/L12, GAPDH ile stimüle edilmiş kültür süpernatantlarında ölçüldü.

Hücre dışı IFN- $\gamma$ , IL-4 ve IL-10 düzeyi Bruselloz tanısı almış, 10'u erkek, 15'i kadın, yaş ortalaması 46,7 olan 25 hastada, sağlıklı 14 kişide ölçüldü. Sağlıklı gruba alınan kişilerin 6'si erkek, 8'i kadındı. Bu gruptaki kişilerin yaş ortalaması 32 idi.

Bruselloz tanısı alan hastalarda IFN- $\gamma$  düzeyleri stimüle edilmemiş (US) hücrelerde  $58,3\pm 28,4$  pg/ml, PHA ile stimüle edilen hücrelerde  $5273,8\pm 869,8$  pg/ml, L7/L12 ile stimüle edilen hücrelerde  $776,9\pm 200,1$  pg/ml, GAPDH ile stimüle edilen hücrelerde  $274\pm 84,5$  pg/ml olarak ölçüldü (Tablo1). Stimülasyon için kullanılan tüm peptidler ile uyarılan hücrelerdeki hücre dışı IFN- $\gamma$  düzeyinin, US hücrelerdeki hücre dışı IFN- $\gamma$  düzeyi ile karşılaştırıldığında belirgin olarak artmış olduğu izlendi ( $p<0,05$ ) (Tablo1, Şekil1 A).

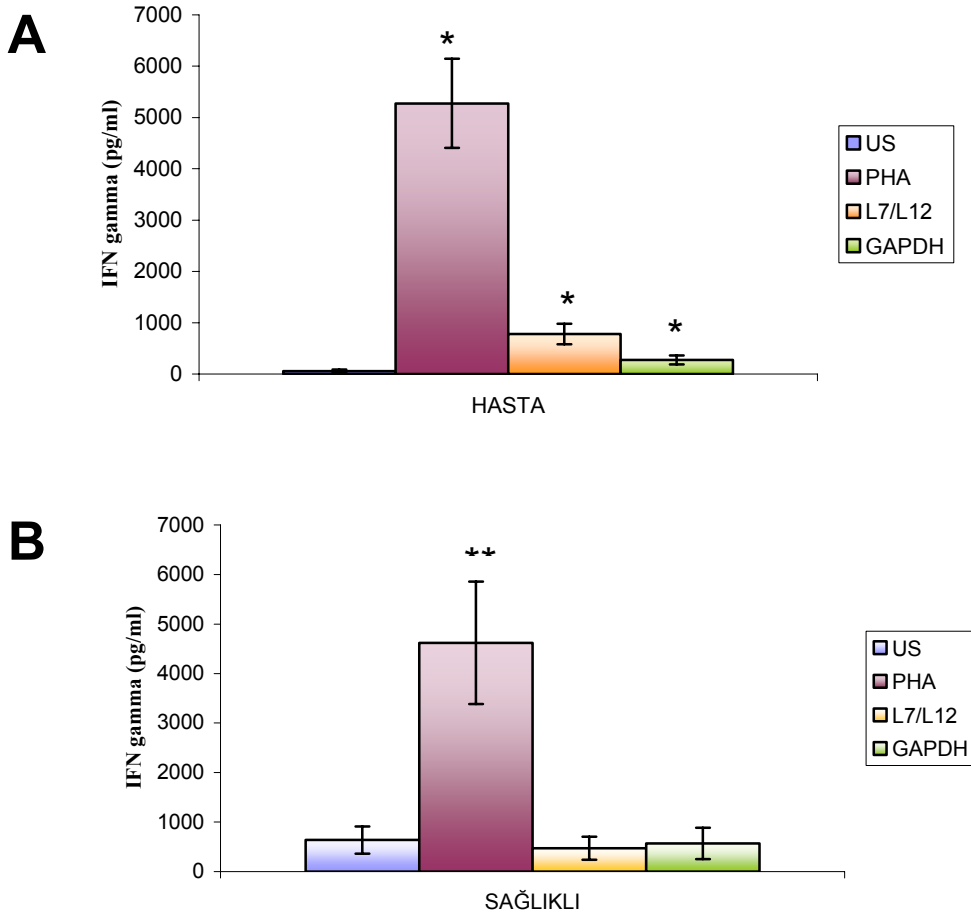


Kontrol grubunu oluşturan sağlıklı kişilerdeki IFN- $\gamma$  düzeyleri stimüle edilmemiş (US) hücrelerde 637,4 $\pm$ 274,6 pg/ml, PHA ile stimüle edilen hücrelerde 4618,3 $\pm$ 1236,2 pg/ml, L7/L12 ile stimüle edilen hücrelerde 469,9 $\pm$ 233,9 pg/ml, GAPDH ile stimüle edilen hücrelerde 568 $\pm$ 314,8 pg/ml olarak ölçüldü (Tablo1). Sağlıklı kişilerde stimülasyon için kullanılan PHA ile uyarılan hücrelerdeki hücre dışı IFN- $\gamma$  düzeyinin, US hücrelerdeki hücre dışı IFN- $\gamma$  düzeyi ile karşılaştırıldığında artmış olduğu tespit edildi. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0,001$ ). L7/L12 ile uyarılan hücrelerdeki hücre dışı IFN- $\gamma$  düzeyi US hücrelerdeki hücre dışı IFN- $\gamma$  düzeyi ile karşılaştırıldığında azalmış olduğu saptandı, istatistiksel olarak anlamlı bulunsa da  $p = 0,048$  olup, kritik değer  $p = 0,05$ 'e çok yakındır. GAPDH ile uyarılan hücrelerdeki hücre dışı IFN- $\gamma$  düzeyi US hücrelerdeki hücre dışı IFN- $\gamma$  düzeyi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı ( $p > 0,05$ ) (Tablo1, Şekil1B).

**Tablo 1: Hasta ve sağlıklı bireylerde stimülasyon olmadan ve stimülasyon altında ölçülen ortalama hücre dışı IFN- $\gamma$  düzeyleri (pg/ml)**

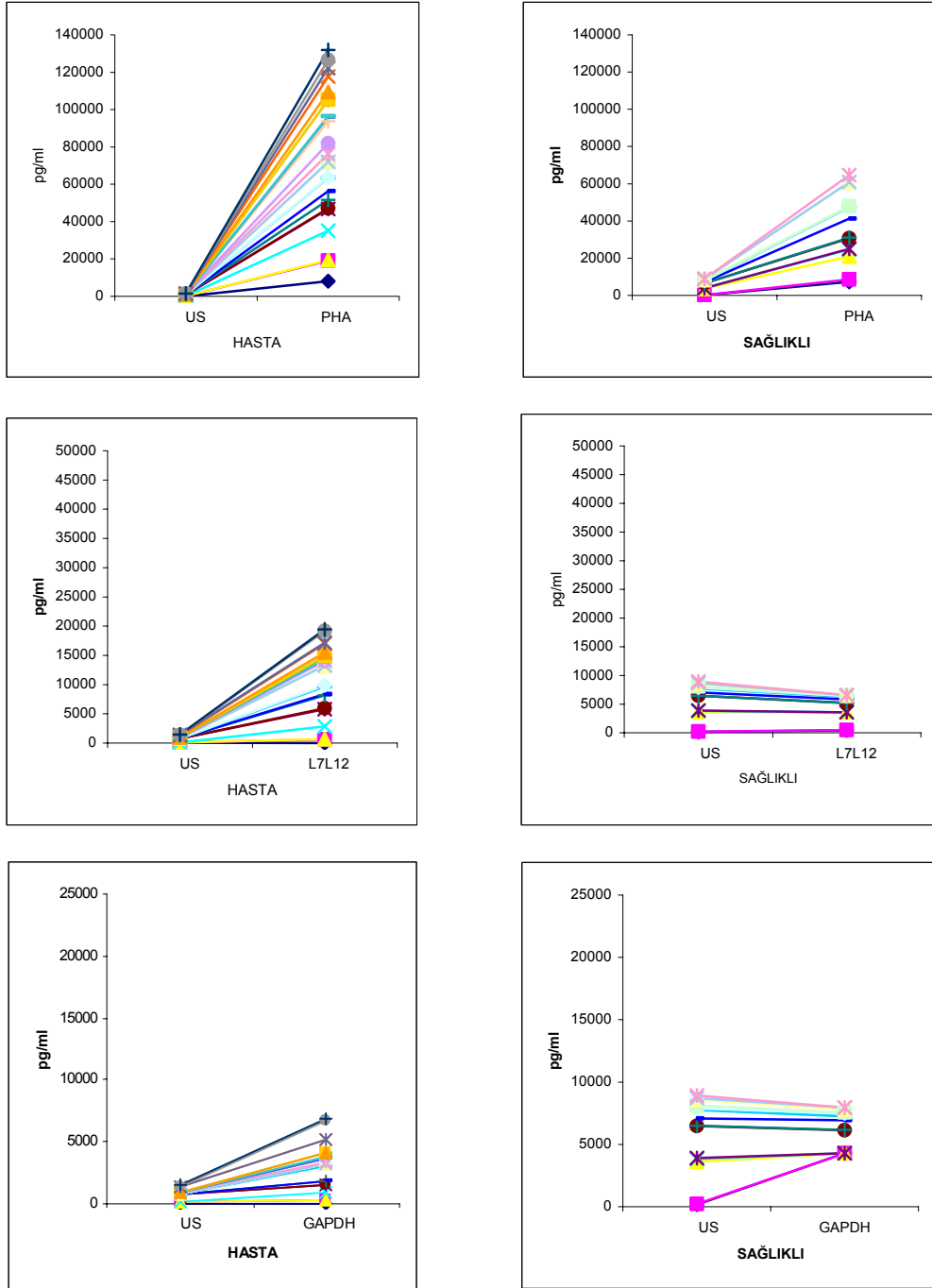
	Hasta	Sağlıklı
<b>US</b>	58,3 $\pm$ 28,4	637,4 $\pm$ 274,6
<b>PHA</b>	5273,8 $\pm$ 869,8*	4618,3 $\pm$ 1236,2**
<b>L7/L12</b>	776,9 $\pm$ 200,1*	469,9 $\pm$ 233,9
<b>GAPDH</b>	274 $\pm$ 84,5*	568 $\pm$ 314,8

Stimüle vs stimüle olmayan; \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,001$



**Şekil 1: (A) Hastalarda ve (B) sağlıklı bireylerde stimülasyon olmadan ve stimülasyon altında ölçülen ortalama hücre dışı IFN- $\gamma$  düzeyleri (pg/ml)**  
 Stimüle vs stimüle olmayan; \*p<0,05 , \*\*p<0,001

Hasta ve kontrol gruplarına ait bireylerin PHA, L7/L12 veya GAPDH ile stimüle edilmiş hücre süpernatantlarında ölçülen IFN- $\gamma$  düzeyleri ile stimüle edilmemiş hücre süpernatantlarındaki IFN- $\gamma$  düzeyleri karşılaştırıldığında, hemen tüm Bruselloz'lu olgularda kontrol grubundaki bireylerinkine göre daha fazla artış olduğu gözlemlendi (Şekil 2).



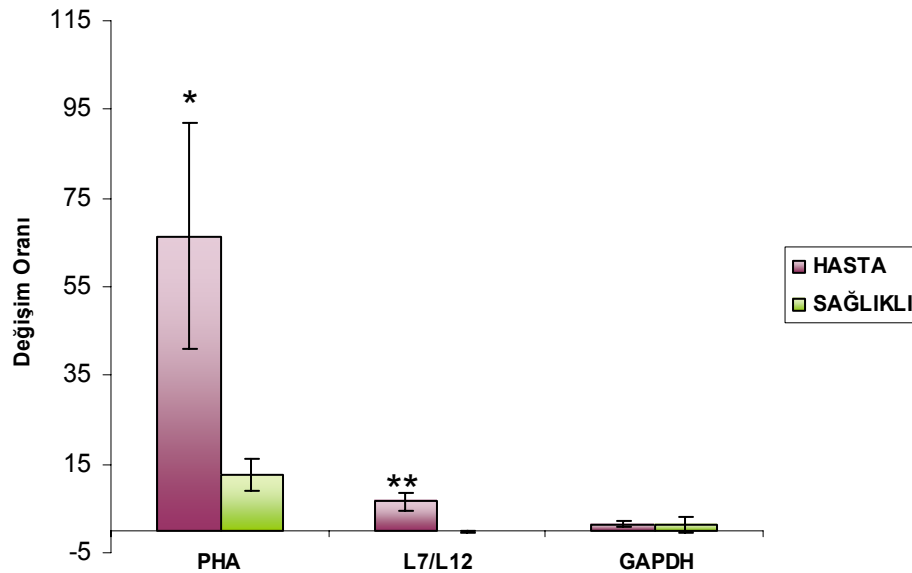
**Şekil 2: Hasta ve Sağlıklı Bireylerde Hücre Dışı IFN- $\gamma$  Düzeylerinin Karşılaştırılması**

PHA ile stimüle edilmiş hücre süpernatantlarında ölçülen IFN- $\gamma$  düzeyleri ile stimüle edilmemiş hücrelerdeki IFN- $\gamma$  düzeyleri arasındaki değişim oranlarına göre, hasta ile kontrol grupları karşılaştırıldığında; stimüle edilmiş

Bruselloz'lu olgulardaki IFN- $\gamma$  düzeylerinde sağlıklı ( $66,5\pm 25,6$  kat) kontrol grubundakilere ( $12,6\pm 3,4$  kat) göre anlamlı şekilde daha fazla artış görüldü ( $p<0,01$ ) (Şekil 3).

L7/L12 ile stimüle edilmiş hücre süpernatantlarında ölçülen IFN- $\gamma$  düzeyleri ile stimüle edilmemiş hücrelerdeki IFN- $\gamma$  düzeyleri arasındaki değişim oranlarına göre, hasta ile kontrol grupları karşılaştırıldığında; stimülasyon altındaki hasta grubunda değişim oranı kontrol grubundakilere göre anlamlı şekilde farklı saptandı ( $p<0,001$ ). Bu değişim L7/L12 ile stimüle edilmiş hücre süpernatantlarında hasta grupta  $6,66\pm 2,02$  kat artış şeklinde iken sağlıklı grupta ise artış saptanmadı (Şekil 3).

Hasta ve kontrol grupları GAPDH ile stimüle edilmiş hücre süpernatantlarında ölçülen IFN- $\gamma$  düzeyleri ile stimüle edilmemiş hücrelerdeki IFN- $\gamma$  düzeyleri arasındaki değişim oranlarına göre karşılaştırıldığında (sırasıyla,  $1,47\pm 0,8$  ve  $1,44\pm 1,78$  kat artış) gruplar arası IFN- $\gamma$  düzeyinde anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).



**Şekil 3: Hücre dışı IFN- $\gamma$  düzeylerinin stimülasyon altındaki değişim oranlarının hasta ve sağlıklı bireylerde karşılaştırılması**  
Hasta vs sağlıklı; \*  $p<0,01$ ; \*\*  $p<0,001$

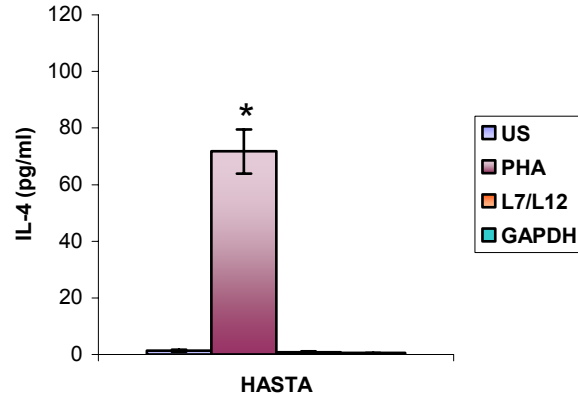
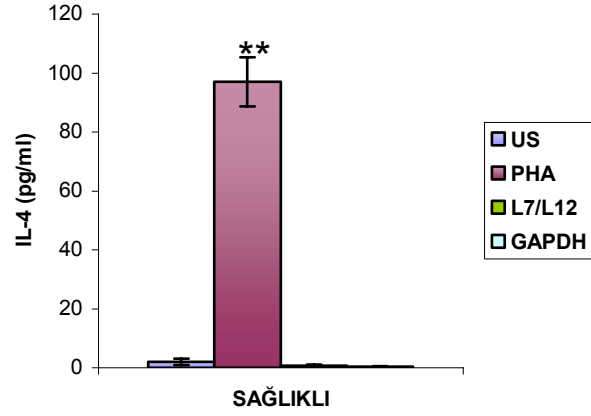
Bruselloz tanısı alan hastalarda IL-4 düzeyleri stimüle edilmemiş (US) hücrelerde  $1,28 \pm 0,36$  pg/ml, PHA ile stimüle edilen hücrelerde  $71,73 \pm 7,82$  pg/ml, L7/L12 ile stimüle edilen hücrelerde  $0,79 \pm 0,26$  pg/ml, GAPDH ile stimüle edilen hücrelerde  $0,5 \pm 0,07$  pg/ml olarak ölçüldü. US hücreler ile karşılaştırıldığında PHA ile stimüle edilen hücrelerde IL-4 düzeylerinde anlamlı artış ( $p < 0,001$ ) saptandı. L7/L12 ile stimüle edilen hücrelerde ölçülen IL-4 düzeylerinde anlamlı farklılık yok ( $p > 0,05$ ) iken, GAPDH ile stimüle edilen hücrelerde ölçülen IL-4 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptandı ( $p < 0,05$ ) (Tablo 2, Şekil 4A).

Kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerde IL-4 düzeyleri stimüle edilmemiş (US) hücrelerde  $2,01 \pm 1,09$  pg/ml, PHA ile stimüle edilen hücrelerde  $96,9 \pm 8,31$  pg/ml, L7/L12 ile stimüle edilen hücrelerde  $0,7 \pm 0,29$  pg/ml, GAPDH ile stimüle edilen hücrelerde  $0,38 \pm 0,08$  pg/ml olarak ölçüldü. US hücreler ile karşılaştırıldığında PHA ile stimüle edilen hücrelerde IL-4 düzeylerinde anlamlı artış ( $p < 0,01$ ) saptanırken, L7/L12 ve ile stimüle edilen hücrelerde ölçülen IL-4 düzeylerinde anlamlı farklılık yoktu ( $p > 0,05$ ) (Tablo 2, Şekil 4B).

**Tablo 2: Hasta ve sağlıklı bireylerde stimülasyon olmadan ve stimülasyon altında ölçülen ortalama hücre dışı IL-4 düzeyleri (pg/ml)**

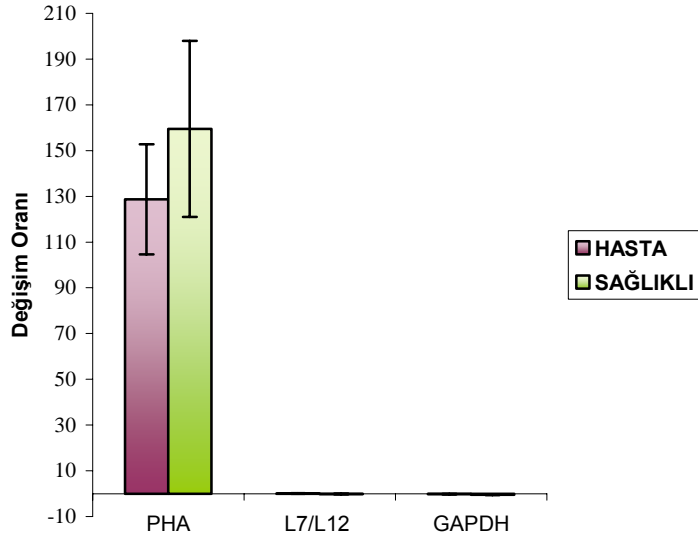
	Hasta	Sağlıklı
<b>US</b>	$1,28 \pm 0,36$	$2,01 \pm 1,09$
<b>PHA</b>	$71,73 \pm 7,82$ *	$96,94 \pm 8,31$ **
<b>L7/L12</b>	$0,79 \pm 0,26$	$0,77 \pm 0,29$
<b>GAPDH</b>	$0,5 \pm 0,07$	$0,38 \pm 0,08$

Stimüle vs stimüle olmayan; \* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$

**A****B**

**Şekil 4: (A) Hastalarda ve (B) sağlıklı bireylerde stimülasyon olmadan ve stimülasyon altında ölçülen ortalama hücre dışı IL-4 düzeyleri(pg/ml)** Stimüle vs stimüle olmayan; \* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$

Hasta ve kontrol grupları arasındaki PHA, L7/L12, GAPDH ile stimüle edilmiş hücre süpernatantlarında ölçülen IL-4 düzeyleri ile stimüle edilmemiş hücrelerdeki IL-4 düzeyleri değişim oranına göre karşılaştırıldığında, gruplar arası IL-4 düzeyinde anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ) (Şekil 5).



**Şekil 5: Hücre dışı IL-4 düzeylerinin stimülasyon altındaki değişim oranlarının hasta ve sağlıklı bireylerde karşılaştırılması**

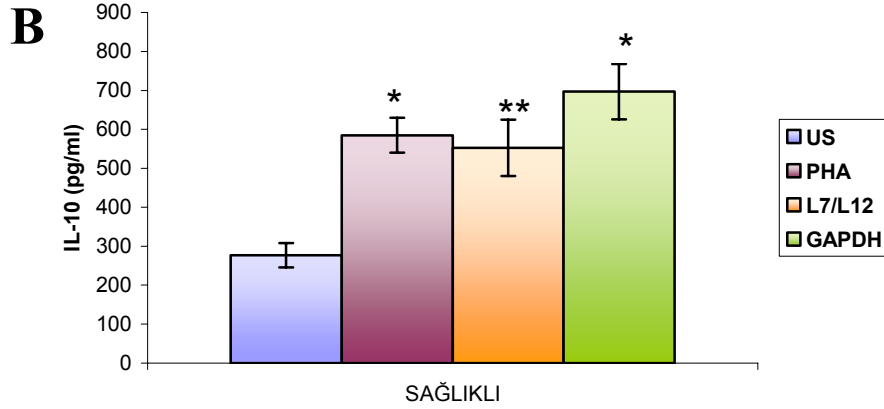
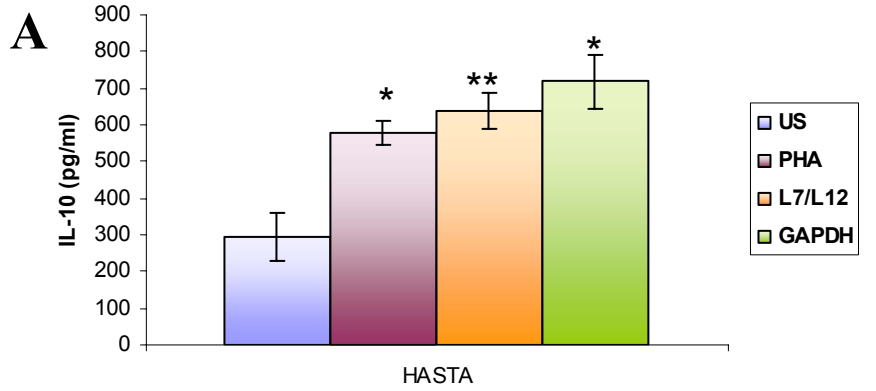
Bruselloz tanısı alan hastalarda IL-10 düzeyleri stimüle edilmemiş(US) hücrelerde  $292,13 \pm 65,30$  pg/ml, PHA ile stimüle edilen hücrelerde  $579,29 \pm 31,76$  pg/ml, L7/L12 ile stimüle edilen hücrelerde  $638,55 \pm 48,5$  pg/ml, GAPDH ile stimüle edilen hücrelerde  $718,81 \pm 72,63$  pg/ml olarak ölçüldü. US hücreler ile karşılaştırıldığında PHA ( $p < 0,01$ ) ve L7/L12 ( $p < 0,05$ ), GAPDH ( $p < 0,01$ ) ile stimüle edilen hücrelerde IL-10 düzeylerinde anlamlı artış izlendi (Tablo 3, Şekil 6A).

Kontrol grubunu oluşturan kişilerde IL-10 düzeyleri stimüle edilmemiş (US) hücrelerde  $276,91 \pm 31,35$  pg/ml, PHA ile stimüle edilen hücrelerde  $585,06 \pm 44,53$  pg/ml, L7/L12 ile stimüle edilen hücrelerde  $552,86 \pm 72,3$  pg/ml, GAPDH ile stimüle edilen hücrelerde  $696,91 \pm 70,83$  pg/ml olarak ölçüldü. US hücreler ile karşılaştırıldığında PHA ( $p < 0,01$ ), L7/L12 ( $p < 0,05$ ) ve GAPDH ( $p < 0,01$ ) ile stimüle edilen hücrelerde IL-10 düzeylerinde anlamlı artış izlendi (Tablo 3, Şekil 6B).

**Tablo 3: Hasta ve sağlıklı bireylerde stimülasyon olmadan ve stimülasyon altında ölçülen ortalama hücre dışı IL-10 düzeyleri (pg/ml)**

	Hasta	Sağlıklı
US	292,13±65,3	276,91±31,35
PHA	579,29±31,76 *	585,06±44,53*
L7/L12	638,55±48,5**	552,86±72,3**
GAPDH	718,81±72,63*	696,91±70,83*

Stimüle vs stimüle olmayan; \*p<0,01 \*\*p<0,05

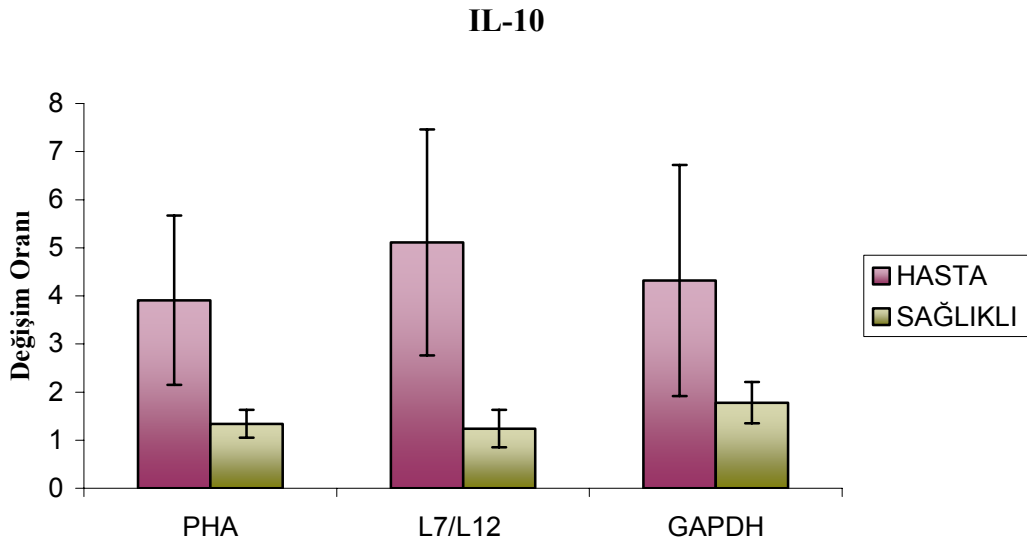


**Şekil 6: (A) Hasta ve (B) sağlıklı bireylerde stimülasyon olmadan ve stimülasyon altında ölçülen hücre dışı IL-10 düzeyleri (pg/ml)**

Stimüle vs stimüle olmayan; \*p<0,01 \*\*p<0,05



PHA, L7/L12, GAPDH ile stimüle edilmiş hücre süpernatantlarında ölçülen IL-10 düzeyleri, stimüle edilmemiş hücrelerde ölçülen IL-10 düzeyleri ile değişim oranları açısından hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, arasındaki aralarında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ). Bu değişim oranı PHA ile stimüle edilmiş hücre süpernatantlarında hasta grupta  $3,91\pm1,76$  kat, sağlıklı grupta  $1,34\pm0,29$  kat artış şeklinde, L7/L12 için hasta grupta  $5,11\pm2,35$  kat artış, sağlıklı grupta  $1,24\pm0,39$  kat artış, GAPDH için hasta grupta  $4,32\pm2,40$  kat artış, sağlıklı grupta  $1,78\pm0,43$  kat artış şeklinde idi (Şekil 7).



**Şekil 7: Hücre dışı IL-10 düzeylerinin stimülasyon altındaki değişim oranlarının hasta ve sağlıklı bireylerde karşılaştırılması**

## Mononükleer Hücre Alt Grupları

Periferik kandaki mononükleer hücre alt gruplarını değerlendirmek amacı ile hasta ve kontrol grubuna ait toplam 36 olgu alındı (Tablo 4).

**Tablo 4: Hasta ve sağlıklı gruplarda periferik kandaki mononükleer hücre alt gruplarının dağılımı (%)**

	US	PHA	L7/L12	GAPDH
<b>CD3<sup>+</sup> T hücre</b> Hasta	90,1±4,7	69,2±20,9	89,6±7,1	89,9±9,5
<b>CD3<sup>+</sup> T hücre</b> Sağlıklı	89,5±4,3	71,8±10,8	87,8±7,2	91,8±3,6
<b>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T hücre</b> Hasta (n=21)	53,7±0,46	19,5±3,73	57,2±2,99	47,35±5,4
<b>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T hücre</b> Sağlıklı (n=15)	61,4±2,53	38,4±4,03	59,3±3,23	63,3±4,5
<b>CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T hücre</b> Hasta (n=22)	21,6±3,7	10,2±2,5	22,9±2,6	24,4±4,3
<b>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T hücre</b> Sağlıklı (n=15)	24,1±1,6	18,7±1,22	26,1±3,79	23,3±1,7
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücre</b> Hasta (n=22)	3,1±0,4	17,0±3,3	3,6±0,6	3,1±0,4
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T hücre</b> Sağlıklı (n=15)	6,3±0,6	31,3±6,2	12,9±5,3	10,6±4,4
<b>CD4<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> T hücre</b> Hasta (n=22)	53,5±4,8	23,3±3,74	52,8±3,75	44,4±4,7
<b>CD4<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> T hücre</b> Sağlıklı (n=15)	39,3±5,82	29,9±5,68	32,5±6,15	41,5±5,7
<b>CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T hücre</b> Hasta (n=13)	1,5±0,3	19,0±5,17	3,4±0,58	3,4±0,61
<b>CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T hücre</b> Sağlıklı (n=15)	4,7±1,2	49,6±4,45	2,6±0,73	6,3±4,06
<b>CD3<sup>+</sup>CD152<sup>+</sup> T hücre</b> Hasta (n=11)	0,5±0,48	0,8±0,2	7,8±7,77	0,5±0,4
<b>CD3<sup>+</sup>CD152<sup>+</sup> T hücre</b> Sağlıklı (n=13)	2,0±0,55	4,0±1,83	1,6±0,49	1,7±1,5

Çalışmamızda hem hasta, hem de sağlıklı grupta yer alan bireylere ait stimüle edilmemiş hücreler ile L7/L12, GAPDH ile stimüle edilmiş mononükleer hücrelerdeki CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>,

CD4<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD152<sup>+</sup> (CTLA4) lenfosit hücre oranı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ( $p>0,05$ ).

Hasta grupta yer alan olgulara ait mononükleer hücrelerdeki CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> lenfosit hücre oranı tüm gruplarda artmış olarak bulundu ( $p<0,01$ ).

Sağlıklı grupta yer alan olgulara ait mononükleer hücrelerdeki CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> lenfosit hücre oranı değerlendirildiğinde L7/L12 ile stimüle edilmiş grupta, stimüle edilmemiş grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha düşük bulunmasına karşın ( $p<0,05$ ), GAPDH ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ( $p>0,05$ ) (veri gösterilmedi).

Hasta ve sağlıklı gruplara ait hücreler arasında CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> lenfosit hücre oranı L7/L12 ile stimüle edilmiş hücreler ile stimüle edilmemiş hücreler arasındaki yüzde değişime göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ( $p<0,001$ ). Hasta grubunda artış izlenirken sağlıklı grupta azalış saptandı (veri gösterilmedi).

Hasta ve sağlıklı gruplara ait hücreler arasında CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> lenfosit hücre oranı GAPDH ile stimüle edilmiş hücreler ile stimüle edilmemiş hücreler arasındaki yüzde değişime göre karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ( $p<0,05$ ). Hasta grubundaki artış sağlıklı gruptaki artıştan daha yüksek olarak saptandı.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Aslında bir zoonoz olmakla beraber insanlarda ondülan ateş, artrit, endokardit, osteomyelit gibi klinik tablolara yol açan Bruselloz'da Brucella bakterisine karşı oluşan koruyucu immün yanıtın anlaşılması ve bu immün yanıtı güçlendiren Brucella'ya özgül protein antijenlerin saptanması, bruselloz kontrolünde etkili olabilecek yeni aşıların geliştirilmesinde, tanı reaktiflerinin hazırlanmasında ve tedavi için yeni yaklaşımların belirlenmesinde bize yol gösterici olabilir. Bu amaçla Brucella antijenlerinden hazırlanan sentetik peptidler çeşitli hayvan modellerinde (20) denenmiş ve umut veren sonuçlar elde edilmesine rağmen insan immün sisteminin bu peptidlere yanıtı hakkında çok az bilgi mevcuttur.

Genel olarak bakıldığında hücre içi bakteriye karşı optimal koruma, korunmayı sağlayan hücresel yanıtları yönetmek için immün sistemin farklı elemanlarının kombinasyonunu gerektirir (14). Çalışmalarda (14,19,21,36-39) sitokinlerin tüm immün yanıt mekanizmalarını yöneterek hastalığın sonucunu etkilediği gösterilmiştir. Brucella türlerine karşı oluşan etkili koruyucu immünite uygun sitokinleri üreten T lenfositlerin aktivasyonu ile gerçekleşir (14).

Çalışmamızda Bruselloz aşısı için aday antijenik peptidler olarak kabul edilen L7/L12 ve GAPDH'ın koruyucu immün yanıtındaki rolünü belirlemek için brusellozlu hastaların bu peptidlere karşı oluşturdukları sitokin yanıtı araştırılmıştır. Bu amaçla hastaların periferik kanlarından elde edilmiş mononükleer hücreler PHA, GAPDH veya L7/L12 ile uyarıldıktan sonra kültür süpernatantlarında hücre dışı sitokin düzeyleri (IFN- $\gamma$ , IL-4 ve IL-10) değerlendirilmiştir.

Hücre içi bakteriye direnç, kazanılmış hücresel immüniteye ve T lenfositler tarafından salınan başta IFN- $\gamma$  olmak üzere sitokinler tarafından makrofajların aktivasyonuna dayanır (7). Th1 tipi hücresel immün yanıt ile ilişkili bir sitokin olan IFN- $\gamma$  spesifik antijen yada nonspesifik antijenler ile uyarıya yanıt olarak enfeksiyonun başlangıcında NK hücreleri tarafından da sentezlenir (8). Çalışmalarda (7) antikörler ile IFN- $\gamma$ 'sı nötralize edilen veya IFN- $\gamma$ 'yı kodlayan geni çıkartılan deney hayvanlarında hücre içi bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara hastalıkların ciddi ve fatal seyrettiği gösterilmiştir.

Bruselloz immünitesi ile ilişkili çalışmalar daha çok farelerde araştırılmış olup, IL-12 eksik farelerin *B.abortus*'a karşı daha duyarlı oldukları ve bu artmış duyarlılığın IFN- $\gamma$  üretiminde azalma ile ilişkili olduğu, normal farelerdeki bruselloz seyrinde IFN- $\gamma$  ve IL-12 serum seviyesinin arttığı gösterilmiştir (21,39). Ayrıca Brucella antijenleri verilen farelerde hem CD4<sup>+</sup> hem de CD8<sup>+</sup> T hücrelerin yüksek miktarlarda IFN- $\gamma$  ürettiği gösterilmiştir (14). IFN- $\gamma$ 'nın Bruselloz'daki önemi *B.abortus* suş 2308 ile enfekte IFN- $\gamma$  geni eksik farenin 6 haftada öldüğünü gösteren çalışma ile de desteklenmiştir (5). İnsan Brusellozu'ndaki immün yanıtlar ile ilgili sınırlı gözlemler olmasına karşın, bazı çalışmalarda (39,40) *B.abortus*'un CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri tarafından IFN- $\gamma$ 'nın sekresyonunu uyardığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda da bruselloz tanısı alan hastalarda stimülasyon için kullanılan Brucella spesifik peptidler (L7/L12 ve GAPDH) ile uyarılan hücrelerdeki hücre dışı IFN- $\gamma$  düzeyinin, stimüle edilmemiş (US) hücrelerdeki IFN- $\gamma$  düzeyine göre belirgin artmış olduğu (Tablo1, Şekil1), kontrol grubunu oluşturan sağlıklı kişilerde ise L7/L12 ile veya GAPDH ile uyarılan hücrelerden salınan IFN- $\gamma$  düzeyleri US hücrelerden salınanlar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmadığı saptanmıştır (Tablo1, Şekil1). Bu veri L7/L12 ve GAPDH'e karşı oluşan IFN- $\gamma$  yanıtının antijene özgül olduğunu ortaya koymaktadır.

Brucella'ya karşı immün savunmada IFN- $\gamma$ 'nın önemli rol aldığı; GAPDH, L7/L12'nin IFN- $\gamma$  salınımına ve dolayısıyla çok güçlü bir spesifik T hücre yanıtına yol açtığı daha önce deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (20,32,34). Rafiei ve ark. (37) insanlarda yaptıkları çalışmada ise IFN- $\gamma$ 'nın ısı ile inaktive *Brucella melitensis* Rev-1'le stimülasyonu sonucu yapımı, uyarılmamış kültürlerine nazaran kontrol grubu dahil tüm gruplarda belirgin artmış olup, bu artışın Akut Bruselloz'lu hasta grubunda, uzamış Bruselloz'lu ve sağlıklı kişilere göre çok daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda da Akut Bruselloz'lu hasta grubunda IFN- $\gamma$  yapımında artış saptanmıştır, ancak farklı olarak sağlıklı kişilerde L7/L12 ile ve GAPDH ile uyarılan hücrelerden salınan IFN- $\gamma$  düzeyi stimüle olamamış hücrelerden yapılan IFN- $\gamma$  düzeyi ile karşılaştırıldığında artış izlenmemiştir. Rafiei ve ark. (34) çalışmalarında sağlıklı kişilerde IFN- $\gamma$  düzeyindeki bu artış ısı ile inaktive edilmiş olan *B. melitensis* Rev 1 suşunun kullanılmış olup, bu suşların GAPDH ve L7/L12'ye oranla antijenik kompleksliğe sahip olmalarına ve tam kan stimülasyonu yapılması nedeniyle kullanılan bakterinin sağlıklı kişilerde de doğal immün yanıtın hücrelerini (NK hücreleri ve makrofajlar) direkt olarak aktive etmesi sonucu IFN- $\gamma$  sentezlenmesine bağlanabilir. Benzeri şekilde Rosinha ve ark. (34) çalışmalarında rekombinant GAPDH'a (rGAPDH) ve *B.abortus* S19'a yanıt olarak fare splenositlerinde IFN- $\gamma$  yapımında artış tespit ederek, bu artışın *B.abortus* S19 ile uyarılan splenositlerde daha belirgin olmasını *B. abortus* S19'daki antijenik kompleksliğe bağlamışlardır. Diğer çalışmalara ek olarak bizim bulgularımız Brucella bakterisine ait antijenik peptidlerin kullanılmasıyla oluşturulan IFN- $\gamma$  yanıtının Akut Bruselloz'lu olgularda antijene özgül olduğunu ve bu peptidlerin IFN- $\gamma$  yanıt uyarıcısı olarak uygulandığı *ex vivo* testlerin tanı testi olarak kullanılabilceğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda dikkat çekici bir nokta da PHA varlığında hem sağlıklı hem de hasta grubunda IFN- $\gamma$  düzeyinde belirgin artış bulunması, bu artışın hasta grubunda sağlıklılara oranla daha fazla olmasıdır. Daha önceki bazı

yayınlarında örneğin Zapata ve ark. (19,41)'nin çalışmalarında akut enfeksiyon süresince T hücre mitojen uyarıcılı proliferasyonun ve IFN- $\gamma$  yapımının bozulduğu bildirilmiştir, ama Rafiei ve ark. (37)'nin çalışmasında da bizim çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde PHA varlığında hasta gruptakilerde daha fazla olacak şekilde, her iki grupta IFN- $\gamma$  düzeyinde artış izlenmiştir. Benzeri şekilde Akbulut ve ark. (41)'nin çalışmasında da Bruselloz'lu hastalarda PMA'ya yanıt olarak IFN- $\gamma$  düzeyinde artış saptanmıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz ilginç bulgulardan birisi de hasta grubundaki stimüle edilmemiş hücrelerden sentezlenen IFN- $\gamma$  düzeylerinin, sağlıklı bireylerinkine göre anlamlı olarak düşük olmasıdır. Benzer durum Rafiei ve ark. (40)'larının insanlarda yaptığı çalışmada da gözlenmiştir. Dornand ve ark. (13)'nin çalışmasında doğal olarak Brucella ile kolonize olmayan farelerdeki Brucella enfeksiyonu mikroorganizmanın klerensini artıran Th1 yanıtı ile sonuçlanırken, insanlarda *B.suis*'in monosit ve makrofaj apoptozunu engellediği, makrofajların IL-1, IL-6, IL-10 salgıladığı, TNF $\alpha$ 'ın yapımının engellenerek Th1 tip immün yanıtta dolayısıyla IFN- $\gamma$  yanıtında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla, bizim çalışmamız ve Rafiei ve ark. (40)'larının çalışmasında da hasta grubunda US hücrelerden yapılan IFN- $\gamma$  miktarının sağlıklı gruba göre daha az olması akut enfeksiyon sırasında üretilen bazı Th1 yanıtını baskılayıcı sitokinlerin (IL-4, IL-10, IL-13 v.b.) etkisine bağlı olabilir. Bununla birlikte bizim çalışmamızda hasta ve sağlıklıların US hücrelerinden üretilen Th1 yanıtını baskılayıcı sitokinler olan IL-4 ve IL-10 miktarları değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık gözlenmemesi bizi şimdilik bu hipotezden uzaklaştırmaktadır. Bu konuyla ilgili olarak daha ayrıntılı araştırmalara gereksinim vardır.

IL-4, Th2 hücreleri tarafından sentezlenen, Th 1 hücrelerin gelişimini ve işlevlerini engelleyen antiinflamatuvar etkili bir sitokindir (9,18). CD4<sup>+</sup> T hücreleri tarafından IFN- $\gamma$ 'nın yapımını azaltarak makrofajların aktivasyonunu engelleyebilen ve IL-2 reseptör ekspresyonunu azaltarak T hücre proliferasyonunu bloke edebilen bir sitokin olan IL-4'ün *B.abortus*

enfeksiyonuna eğilimi arttırdığı gösterilmiştir (42). Ancak gerek Zhan ve ark. (43) fareler ile yaptıkları, gerekse Zaitseva ve ark. (40) insan periferik mononükleer hücreleri ile yaptıkları çalışmalarda *B.abortus*'a karşı IL-4 düzeyinde artış izlenmemiştir. Çalışmamızda Bruselloz tanısı alan hastalarda ve sağlıklılarda US hücreler ile karşılaştırıldığında L7/L12 ile stimüle edilen hücrelerde ölçülen IL-4 düzeylerinde anlamlı farklılık yok iken, GAPDH ile stimüle edilen hücrelerde ölçülen IL-4 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptanmıştır (Tablo 2, Şekil 5). Rafiei ve ark. (37)'nin yaptığı çalışmada da ısı ile inaktive *Brucella melitensis* Rev-1'e yanıt olarak IL-4 yapımında bir değişiklik saptanamamıştır. Öte yandan Bruselloz'lu çocukların serum seviyesinde yüksek oranda IL-4 saptanmıştır (44). Rosinha ve ark. (34)'nin yaptığı bir çalışmada *Brucella* rGAPDH'ye karşı humoral ve hücrel immün yanıt değerlendirilmiş, rGAPDH tarafından hem humoral hem de hücrel immün yanıt uyarıldığı gösterilmiş; rGAPDH veya *B.abortus* S19 ile aşılanan farelerin splenositlerinin rGAPDH'le *in vitro* stimülasyonu sonucunda IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  üretirken IL-4 üretmediği tespit edilmiştir. Bizim bulgularımızla birlikte tüm bu veriler değerlendirildiğinde Bruselloz'da etkin olan koruyucu immün yanıtın Th1 aracılı olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.

IL-10, IFN- $\gamma$  ve IL-12 yapımını azaltan, inhibitör özellikteki sTNFR'ünü stimüle eden Th2 veya regülatör T (Treg) hücre sitokini olarak bilinir ve hem *in vitro* ve hem de *in vivo* antiinflamatuvar özelliklere sahip olup, sitokin ilişkili makrofaj aktivasyonunu engelleyerek veya Th1 hücre diferensiyasyonunu inhibe ederek koruyucu immün yanıtı baskılar (9,14). IL-10'un *Brucella* antijenleri tarafından uyarılmış fare splenositlerinde *in vitro* IFN- $\gamma$  üretimini azalttığı, anti-IL-10 ile muamele edilmiş enfekte fare splenositlerinde ise artan IFN- $\gamma$  üretimine bağlı olarak bakteri yükünün azaldığı gösterilmiştir (18). Oliveira ve ark. (14) *B. abortus* ile muamele edilmiş MHC Sınıf I ve MHC Sınıf II eksik fare splenosit süpernatantlarında IL-10 miktarını ölçmüş, CD8<sup>+</sup> T hücrelerden yoksun MHC Sınıf I eksik fare splenositlerinin kontrol grubu ve MHC Sınıf II eksik fare splenositlerine göre iki kat fazla IL-10 ürettikleri tespit etmişlerdir. MHC Sınıf I eksik farelerin Bruselloz'a daha duyarlı olmalarından



yola çıkararak CD8<sup>+</sup> T hücrelerin IL-10 gibi Th2 sitokinlerinin ekspresyonunu azalttığını öne sürmüşlerdir. Çalışmamızda IL-10 düzeylerinin hem sağlıklı, hem hasta grubunda stimüle edilmiş ve stimüle edilmemiş hücrelerin kültür süpernatantlarında arttığı, ancak sağlıklı ve kontrol gruplar karşılaştırıldığında IL-10 düzeyleri açısından aralarında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Rafiei ve ark. (37)'lerinin yaptığı çalışmada ise IL-10 düzeyleri hem mitojen, hem de antijene yanıt olarak hiçbir grupta belirgin farklılık göstermemiştir. Hoover ve ark. (45)'lerinin fareleri *Brucella melitensis*'in mutant suşu WR201 ile immünize ettiği çalışmada ise bizim verilerimize benzer olarak fare splenositlerinden IFN- $\gamma$ 'nın yanı sıra IL-10 yapımının da arttığı gösterilmiştir. Çalışmamızda hem sağlıklı hem de hastalarda mitojen ile veya *Brucella* antijenik peptidleri ile IL-10 sentezinin uyarılmış olması bu yanıtın antijene spesifik olmadığını düşündürmektedir.

Bruselloz'a karşı yanıtta en önemli hücre grubunun lenfositler olduğu, T hücre bağımlı hücresel immünitenin bu hastalığın patojenik mekanizmalarında önemli rol oynadığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (9,13). Bruselloz'da spesifik immünitede CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ve  $\gamma\delta$  T hücreler makrofajların bakterisidal aktivitesini artırırken sitotoksik CD8<sup>+</sup> T hücreler ve  $\gamma\delta$  T hücreler ise enfekte makrofajları öldürür. Aynı zamanda farede IgG2a ve IgG3 gibi Th1 tip antikolar fagositozu artırmak için patojeni opzonize eder (5). Bruselloz'a karşı immünitede CD4<sup>+</sup> ya da CD8<sup>+</sup> T hücrelerden hangisinin baskın rol oynadığı halen tartışmalıdır. Ancak Oliveira ve ark. (14)'nin yaptıkları çalışmalarda CD8<sup>+</sup> T hücrelerin enfeksiyonu kontrol etmede daha etkili olduğu iddia edilmiştir. Araya ve ark. (15)'nin yaptığı çalışmada tüm T hücre popülasyonlarının önemli olduğu gösterilmiştir. Çelik ve Akbulut'un (46) Bruselloz'lu hastalarda yaptıkları çalışmada tedavi öncesi ve sonrası total lenfosit, NK hücre, T lenfosit ve CD8<sup>+</sup> T lenfosit sayıları hasta grupta daha yüksekken; CD19<sup>+</sup> lenfosit (B lenfosit) ve CD4<sup>+</sup> T lenfosit sayıları ile CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T lenfosit oranının sağlıklı grupta daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda hem hasta, hem de sağlıklı grupta yer alan olgulara ait mononükleer hücrelerdeki CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>,

CD4<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>/ CD152<sup>+</sup> (CTLA-4) lenfosit hücre oranı stimüle edilmemiş hücreler ile L7/L12 veya GAPDH ile stimüle edilmiş gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmamıştır.

Erken T hücre aktivasyon belirteçlerinden biri olan CD69'un Bruselloz'lu hastaların CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T lenfositlerin yüzeyinde *Brucella melitensis*'den elde edilen RCM-BM antijeniyle uyarılmayı takiben artmış olduğu ancak bu artışın sağlıklı bireylerin T lenfositlerinde gözlenmediği daha önceden rapor edilmiştir (50). Bizim çalışmamızda benzer olarak hasta grupta yer alan olgulara ait mononükleer hücrelerdeki CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> lenfosit hücre oranı L7/L12 veya GAPDH ile uyarılmayı takiben artmış olarak bulunurken, sağlıklılarda bu lenfositlerin oranları stimülasyonu takiben azalmış (L7/L12) veya değişmeden kalmıştır (GAPDH). Bu bulgular Akut Bruselloz'da T lenfositlerin kullanılan peptit antijenlere spesifik olarak aktive olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada elde edilen veriler Bruselloz'da koruyucu immün yanıtta Th1 tipi spesifik hücresel immünitenin primer yanıt olduğunu; GAPDH ve L7/L12'nin Th1 tipi bir sitokin olan IFN- $\gamma$  düzeylerini arttırarak koruyucu immün yanıtı endükleme potansiyelinde olduklarını; dolayısıyla GAPDH ve/veya L7/L12'nin yeni Bruselloz aşısı preparasyonlarında bulunmasının yararlı olabileceğini; GAPDH ve L7/L12 ile uyarıyı takiben IFN- $\gamma$  yapımını temel alan spesifik hücresel immün yanıtı ölçen immünolojik tanı testlerinde kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte GAPDH ve L7/L12'nin kompleks immünomodülatör etkilerini açıklığa kavuşturacak yeni ve daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

EK

### **Zenginleştirilmiş RPMI-1640**

Zenginleştirilmiş RPMI-1640, 500 ml RPMI 1640 medium (Biochrom Ag, Almanya, Katalog no:F1215 ) içine aşağıda sıralanmış reaktiflerin ilavesi ile hazırlandı;

- 50 ml FCS (Biological Industries, Israel, Katalog no:04-001-1A)
- 10 ml Penicilin / Streptomycin / Kanamycin karışımı (5 ml Penicilin / Streptomycin, (10000), Gibco, Katalog no: 15140-122 + 5 ml Kanamycin (100x) Gibco, Katalog no: 15160-047)
- 10 ml MEM Vitamin / L- Glutamine karışımı (5 ml Vitamin (100x), Gibco, Katalog no: 11120-037 + 5 ml L- Glutamine 200 mM, Gibco, Katalog no: 25030-024)
- 10 ml Na-Pyruvate / Non essential AS (MEM nonessential amino acids(100x) Gibco, Katalog no: 11140-035+5 ml Na-Pyruvate MEM 100mM, Gibco, Katalog no: 11360-039)
- 500 µl beta-Mercaptoethanol 50 mM Gibco, Katalog no: 31350-010

## KAYNAKLAR

1. Young EJ. Brucella Species. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5<sup>th</sup> Edition. USA: Churchill Livingstone; 2000. 2386-92.
2. Hoover DL, Friedlander AM. Brucellosis. Zajtchuk R, Bellamy RF (eds), Takafuji ET, Franz DR (eds). Textbook of Military Medicine: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Washington, DC: Office of The Surgeon General, US Department of The Army; 1997. 513-21  
[www.vnh.org/MdAspChemBiowar](http://www.vnh.org/MdAspChemBiowar)
3. Baysal B. Brucella. Ustaçelebi Ş (ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitapevi; 1999. 571-77
4. Sözen TH. Bruselloz. Topçu Willke A, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2002. 636-42
5. Ko J, Splitter GA. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 65-78.
6. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları. İzmir: Barış Yayınları; 1992. 157-68.
7. Collins HL, Kaufmann HES. Immune Responses To Intracellular Bacteria. Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Schroeder HW (eds). Clinical Immunology Principles and Practice. 2<sup>nd</sup> Edition, England: Mosby. 26.1-26.14
8. Splitter GA. The immune response to Brucella. Department of Animal Health and Biomedical Sciences, University of Wisconsin-Madison, USA.  
[www.fao.org/livestock/agah/id/brunet main/Brunet/ public sub6 p1.html](http://www.fao.org/livestock/agah/id/brunet main/Brunet/ public sub6 p1.html)
9. Golding B, Scott DE, Scharf O et al. Immunity and protection against Brucella abortus. Microbes and Infection 2001; 3: 43-8
10. Fernandes DM, Benson R, Baldwin CL. Lack of a role of natural killer cells in early control of Brucella abortus 2308 infections in mice. Infect Immun 1995; 63: 4029-33
11. Kılıçturgay K. İmmünoloji 2003. Bursa: Nobel-Güneş Tıp Kitapevi; 2003.

12. Zhan Y, Cheers C. Endogenous Interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* 1995; 63: 1387-90
13. Dornand J, Antoine G, Virgine L et al. The innate immune response against *Brucella* in humans. *Veterinary Microbiology* 2002; 90: 383-94
14. Oliveira SC, Harms JS, Rech EL et al. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31:77-84
15. Araya LN, Elzer P, Rowe GE et al. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/C mice infected with *Brucella abortus*. *J Immunol* 1989;143: 3330-7
16. Bertotto A, Gerli R, Spinozzi F et al. Lymphocytes bearing the  $\gamma\delta$  T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection. *Eur J Immunol* 1993; 23:1177-80
17. Akdiş M, Blaser K, Akdiş CA. T and B regulatory cells. XVIII. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 7-10.09.2005. Bursa; Program ve Özet Kitabı: 43-55.
18. Fernandes DM, Baldwin CL. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. *Infect Immun* 1995; 63: 1130-33
19. Rodriguez-Zapata M, Salmeron I, Manzano L et al. Defective Interferon gamma production by T lymphocytes from patients with acute brucellosis. *Eur J Clin Invest* 1996; 26:136-40
20. Oliveira SC, Soeurt N, Splitter G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet Microbiol* 2002; 90: 417-24
21. Zhan Y, Cheers C. Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* 1993; 61; 4899-901
22. Denoel PA, Vo TK, Weynants VE. et al. Identification of the major T-cell antigens present in the *Brucella melitensis* B115 Protein preparation, Brucecellergene OCB. *J Med Microbiol* 1997; 46:801-6
23. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P et al. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect Immun* 2001; 69: 4816-22
24. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P et al. Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. *Infect Immun* 2001; 69: 6264-70

25. Cespedes S, Andrews E, Folch H. et al. Identification and partial characterisation of a new protective antigen of *Brucella abortus*. *J Med Microbiol* 2000; 49: 165-70
26. Brooks-Worrell BM, Splitter GA. Antigens of *Brucella abortus* S19 immunodominant for bovine lymphocytes as identified by one- and two-dimensional cellular immunoblotting. *Infect Immun* 1992; 60: 2459-64
27. Brooks-Worrell BM, Splitter GA. Sodium dodecyl sulfate- and salt-extracted antigens from various *Brucella* species induce proliferation of bovine lymphocytes. *Infect Immun* 1992; 60: 2136-8
28. Oliveira SC, Splitter GA. Subcloning and expression of the *Brucella abortus* L7/L12 ribosomal gene and T-lymphocyte recognition of the recombinant protein. *Infect Immun* 1994; 62: 5201-4
29. Kitaura H, Kinomoto M, Yamada T. Ribosomal protein L7 Included in Tuberculin Purified Protein Derivative (PPD) is a major heat-resistant protein inducing strong delayed type hypersensitivity. *Scand J Immunol.* 1999; 50: 580-7
30. Bachrach G, Banai M, Bardenstein S et al. *Brucella* ribosomal protein L7/L12 is a major component in the antigenicity of Brucellin INRA for delayed type hypersensitivity in *Brucella* sensitized guinea pigs. *Infect Immun* 1994; 62: 5361-66
31. Kurar E, Splitter G. Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. *Vaccine* 1997; 15: 1851-57
32. Oliveira SC, Splitter G.A Immunization Of Mice With Recombinant L7/L12 Ribosomal Protein Confers Protection Against *Brucella abortus* Infection. *Vaccine* Vol 14, No 10:959-62
33. Oliveira SC, Harms J, Banai M, Splitter GA. Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and gamma-interferon secretion by CD4<sup>+</sup> T cells from *Brucella*-vaccination mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized guinea pigs. *Cell Immunol* 1996; 15: 262-8
34. Rosinha GMS, Myoshi A, Azevedo V. et al. Molecular and immunological characterisation of recombinant *Brucella abortus* Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, a T- and B- cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an Interleukin-12 expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. *J Med Microbiol* 2002;51: 661-71

35. Vemulapalli R, Duncan AJ, Boyle SM et al. Cloning and sequencing of yajC and secD homologs of Brucella abortus and demonstration of immune responses to yajC in mice vaccinated with B.abortus RB51. Infect Immun 1998; 66: 684-91
36. Zhan Y, Kelso A, Cheers C. Cytokine production in the murine response to Brucella infection or immunization with antigenic extracts. Immunology 1993; 80: 458-64
37. Rafiei A, Ardestani S, Kariminia A et al. Dominant Th1 cytokine production in early onset of human brucellosis followed by switching towards the along prolongation of disease. J Infect 2006 (Baskıda)
38. Akbulut HH, Kilic SS, Bulut V, Ozden M. Determination of intracellular cytokines produced by Th1 and Th2 cells using flow cytometry in patients with brucellosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2005;45: 253-58
39. Kamruddin A, Al-Matrouk AK, Martinez G et al. Increased serum levels of Interferon- $\gamma$  and Interleukin-12 during human brucellosis. Am J Med Hyg 1999; 61(3): 425-27
40. Zaitseva MB, Golding H, Betts M. Et al. Human periferal blood CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells express Th1- like cytokine mRNA and proteins following in vitro simulation with heat inactivated Brucella abortus. Infect Immun 1995; 63: 2720-8
41. Rodriguez-Zapata M, Alvarez-Mon M, Salmeron I et al. Diminished T lymphocyte proliferative response to polyclonal mitogens in acute brucellosis patients. Infection.1996; 24:115-20
42. Zhan Y, Kelso A, Cheers C. Differential activation of Brucella reactive CD4<sup>+</sup> T cells by brucella infection or immunization with antigenic extracts. Infect Immun 1995;63:969-75
43. Zhan Y, Yang J, Cheers C. Cytokine response of T-cell subsets from Brucella abortus-infected mice to soluble Brucella proteins. Infect Immun 1993; 61:2841-7
44. Galanakis E, Makis A, Bourantas KL, Papadopoulou ZL. Interleukin-3 and Interleukin-4 in childhood brucellosis. Infection 2002; 30:33-4
45. Hoover DL, Crawford RM, Van De Verg L et al. Protection of mice against brucellosis by vaccination with Brucella melitensis WR201(16M $\Delta$ purEK). Infect Immun 1999; 67: 5877-84
46. Çelik İ, Akbulut HH. Lymphocyte subpopulation in patients with acute brucellosis. Turk J Med Sci 2005;35: 235-39

47. Moreno-Lafont MC, Lopez-Santiago R, Paredes-Cervantes V et al. Activation and proliferation of T lymphocytes subpopulations in patients with brucellosis. Arch Med Res 2003; 34: 184-93



## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım sayın Prof. Dr. Kaya Kılıçturgay'a, Prof. Dr. Feridun Gökırmak'a, Prof. Dr. Okan Töre'ye, Prof. Dr. Safiye Helvacı'ya, tezimin oluşumu, yürütülmesinde emeği ve desteği nedeniyle tez danışmanım sayın Doç. Dr. H. Barbaros Oral'a, yetişmemde emekleri olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda yardım ve desteğini gördüğüm hocalarım sayın Prof. Dr. Suna Gedikoğlu'na, Prof. Dr. Güher Göral'a, Prof. Dr. Reşit Mıstık'a, Prof. Dr. Beyza Ener'e, Prof. Dr. E. Halis Akalın'a, Doç. Dr. Cüneyt Özakın'a, Yrd. Doç. Dr. Yasemin Heper'e, Yrd. Doç. Dr. Melda Sınırtaş'a, Yrd. Doç. Dr. Emel Yılmaz'a, Uzm. Dr. Sevim Akçağlar'a, Uzm. Dr. Oktay Alver'e, Uzm. Dr. Canan Evcı'ye, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, özellikle tez çalışmam sırasında olguların sağlanmasında yardımlarından dolayı Dr. Şirin Efe ve Dr. Emel Gürcüoğlu'na, tezimin istatistik analizini yapan sayın Güven Özkaya'ya, İmmünoloji Bilim Dalı'nda yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Uzm. Dr. Ferah Budak'a, Dr. Selçuk Sözer'e, sayın Figen Aymak'a, laboratuvar, klinik, poliklinik ve kan merkezinde görev yapan hemşire, biyolog, teknisyen ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman destek ve sevgilerini hissettiğim aileme yetişmemde emek ve fedakarlıkları nedeni ile teşekkür ederim.

## **ÖZGEÇMİŞ**

20.10.1973 yılında Erzincan'da doğdum. İlkokulu Aydın Nazilli Fatih İlkokulu'nda, ortaokul öğrenimimi Yenimahalle Ortaokulu'nda, lise öğrenimimi Nazilli Lisesi'nde tamamladım. 1998 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İngilizce Bölümü'nden mezun oldum. 1999-2000 yılında kısa bir süre Erzincan İli Çayırılı İlçesi Merkez Sağlık Ocağı Tabibi olarak görev yaptım. 14 Haziran 2001'de Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak görevime devam etmekteyim.