

T.C. ANADOLU ÜNİVERSİTESİ YAYINI NO: 2338

AÇIKÖĞRETİM FAKÜLTESİ YAYINI NO: 1335

TEMEL VETERİNER MİKROBİYOLOJİ VE İMMUNOLOJİ

Yazarlar

Prof.Dr. K. Tayfun CARLI (Ünite 2)

Prof.Dr.K. Serdar DİKER (Ünite 7, 8, 9)

Prof.Dr. Hakan YARDIMCI (Ünite 6)

Prof.Dr. Aysin ŞEN (Ünite 10)

Prof.Dr. Mibriban ÜLGEN (Ünite 3)

Prof.Dr. Cengiz ÇETİN (Ünite 1)

Prof.Dr. Mehmet AKAN (Ünite 4)

Prof.Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU (Ünite 5)

Editör

Prof.Dr. K. Tayfun CARLI



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Bu kitabın basım, yayım ve satış hakları Anadolu Üniversitesine aittir.
“Uzaktan Öğretim” tekniğine uygun olarak hazırlanan bu kitabın bütün hakları saklıdır.
İlgili kuruluştan izin almadan kitabın tümü ya da bölümleri mekanik, elektronik, fotokopi, manyetik kayıt
veya başka şekillerde çoğaltılamaz, basılamaz ve dağıtılamaz.

Copyright © 2011 by Anadolu University
All rights reserved

No part of this book may be reproduced or stored in a retrieval system, or transmitted
in any form or by any means mechanical, electronic, photocopy, magnetic, tape or otherwise, without
permission in writing from the University.

UZAKTAN ÖĞRETİM TASARIM BİRİMİ

Genel Koordinatör

Prof.Dr. Levend Kılıç

Genel Koordinatör Yardımcısı

Prof.Dr. Müjgan Bozkaya

Öğretim Tasarımcıları

Doç.Dr. Murat Ataizi

Yrd.Doç.Dr. Figen Ünal Çolak

Grafik Tasarım Yönetmenleri

Prof. Tevfik Fikret Uçar

Yrd.Doç. Nilgün Salur

Öğr.Gör. Cemalettin Yıldız

Ölçme Değerlendirme Sorumlusu

Yrd.Doç.Dr. Serpil Koçdar

Grafikerler

Nibal Sürücü, Ayşegül Dibek,

Aziz Arda Ataseven, Adnan Çamur

Kitap Koordinasyon Birimi

Doç.Dr. Feyyaz Bodur

Uzm. Nermin Özgür

Kapak Düzeni

Prof. Tevfik Fikret Uçar

Dizgi

Açıköğretim Fakültesi Dizgi Ekibi

Temel Veteriner Mikrobiyoloji ve İmmunoloji

ISBN
978-975-06-1012-7

4. Baskı

Bu kitap ANADOLU ÜNİVERSİTESİ Web-Ofset Tesislerinde 20.000 adet basılmıştır.
ESKİŞEHİR, Ağustos 2015

İçindekiler

Önsöz xi

Bakterilerin Genel Özellikleri I

I. ÜNİTE

BAKTERİLERİN SINIFLANDIRILMASI VE İSİMLENDİRİLMESİ (TAKSONOMİ).....	3
Bakterilerin Sınıflandırılması (Klasifikasyon).....	4
Bakterilerin İsimlendirilmesi (Nomenklatur).....	4
BAKTERİLERİN MAKROSKOPİK VE MİKROSKOPİK MORFOLOJİSİ	5
Bakterilerin Makroskopik Morfolojisi.....	5
Bakterilerin Mikroskopik Morfolojisi	6
BAKTERİLERİN ANATOMİK YAPISI	8
Dış Yapılar	8
Hücre Duvarı.....	8
Kapsül	10
Mukoid/Yapışkan Tabaka (Slime Layer)	10
S tabaka (Surface layer).....	10
Flagella (Flagellum)	10
Aksial Flament (Endoflagella)	11
Fimbria (Pilus).....	11
İç Yapılar	12
Hücre Membranı (Sitoplazmik Membran, Plasma Membranı)	12
Sitoplazma	12
Mesosomlar	12
Ribosomlar.....	12
Sitoplazmik Granüller (Sitoplazmik İnklüzyon Cisimcikleri).....	12
Pigmentler.....	12
Sporlar (Endosporlar)	13
Çekirdek (nukleoid)	13
Plasmidler	13
Transpozonlar(Tn).....	13
Bakteriyofajlar	14
BAKTERİLERİN BESLENMESİ	14
Bakterilerin Beslenme Tarzına Göre Sınıflandırılması	14
BAKTERİ METABOLİZMASI	14
BAKTERİLERDE ÜREME	16
BAKTERİLERİN ÜREMELERİ ÜZERİNDE ETKİLİ FAKTÖRLER.....	17
Isı	17
Radyasyon.....	18
Yüzey Gerilimi.....	18
Osmotik Basınç	18
Hidrostatik Basınç	18
Rutubet ve Kuruma	19
Oksijen.....	19
Redoks Potansiyeli (Oksidasyon - Redüksiyon Potansiyeli)	19
Hidrojen İyon Konsantrasyonu (pH)	19
Özet	20

Kendimizi Sınavalım	21
Kendimizi Sınavalım Yanıt Anahtarı	22
Sıra Sizde Yanıt Anahtarı	22
Yararlanılan Kaynaklar.....	23

2. ÜNİTE

Bakteriyel Genetik ve Genetik Tabanlı Testler 24

BAKTERİLERDE DNA VE RNA	25
Replikasyon	26
Transkripsiyon ve Translasyon	27
BAKTERİLERDE MUTASYON	28
Nokta Mutasyonları	28
Şartlı Mutantlar (Kondisyonel Mutantlar).....	28
Büyük DNA Parçalarında Oluşan Değişimlere Bağlı Varyasyonlar	29
Rekombinasyon.....	29
EKSTRAKROMOZOMAL GENETİK ELEMENTLER VE YATAY GEN TRANSFERİ	30
GENETİK TABANLI TESTLER.....	32
Plazmid Profili	32
Nukleotid Dizileme (DNA dizileme).....	33
Özgün Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP).....	33
Elektrik Vurumlu Saha Jel Elektroforezisi (Pulsed Field Gel Electrophoresis; PFGE)	34
Nükleik Asit Hibridizasyonu.....	35
Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri.....	36
Özet.....	38
Kendimizi Sınavalım.....	39
Kendimizi Sınavalım Yanıt Anahtarı	40
Sıra Sizde Yanıt Anahtarı	40
Yararlanılan Kaynaklar.....	41

3. ÜNİTE

Bakteriyel Patojenite..... 42

KONAKÇI DİRENÇİ	43
Doğal Direnç	43
Kazanılan Bağışıklık (Spesifik İmmunite).....	45
PATOJENİTE.....	45
VİRULENS	46
VİRULENS FAKTÖRLERİ	46
Adezyon Faktörleri.....	46
İnvazyon Faktörleri	47
Koagulaz	47
Kollajenaz	47
Deoksiribonukleaz	47
Elastaz ve Alkalın Proteaz	47
Sitolizin	47
Hyaluronidaz	48
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) ve Amonyak (NH ₃).....	48
İmmunoglobulin A1(IgA1) proteaz.....	48

Lesitinaz ya da Fosfolipaz.....	48
Streptokinaz (Fibrinolizin).....	48
Antifagositik Faktörler.....	48
Toksinler.....	48
Ekzotoksinler.....	49
Endotoksinler.....	50
Sideroforlar.....	50
BAKTERİYEL İNFEKSİYONLARDA PATOGENEZ.....	51
Bakterinin Konakçıya Girişi (Bulaşma).....	51
Adezyon ve İnvazyon.....	51
Bakterinin Üremesi.....	53
Bakterinin Konakçıda Hasar Oluşturması.....	53
Ekzotoksijenik Mekanizma.....	53
Endotoksijenik Mekanizma.....	53
Özet.....	54
Kendimizi Sınayalım.....	55
Kendimizi Sınayalım Yanıt Anahtarı.....	56
Sıra Sizde Yanıt Anahtarı.....	56
Yararlanılan Kaynaklar.....	56

Antimikrobiyal Yaklaşımlar 59

4. ÜNİTE

BAKTERİYEL ÜREMENİN KONTROLÜ.....	59
STERİLİZASYON VE DEZENFEKSİYON.....	60
Fiziksel Yöntemler.....	60
Isı İle Sterilizasyon.....	60
Işınlama.....	61
Filtrasyon.....	62
Kimyasal Yöntemler (Dezenfeksiyon).....	62
Kimyasal Yöntemlerin Etki Mekanizması.....	62
Dezenfektanlar.....	63
Dezenfektanların Etkilerinin Belirlenmesi.....	66
ANTİBİYOTİKLER.....	67
Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları.....	67
Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	68
Disk Difüzyon Tekniği.....	68
Tüp Dilüsyon Tekniği.....	69
E-Test.....	70
Antibiyotik Kullanımında Temel İlkeler.....	70
Özet.....	72
Kendimizi Sınayalım.....	73
Okuma Parçası.....	74
Kendimizi Sınayalım Yanıt Anahtarı.....	75
Sıra Sizde Yanıt Anahtarı.....	76
Yararlanılan Kaynaklar.....	76

Bakteriyolojik Laboratuvar Yöntemleri..... 78

5. ÜNİTE

MORFOLOJİK MUAYENE.....	79
Mikroskopik Muayene.....	79
Basit Boyama Yöntemleri.....	80

Bileşik Boyama Yöntemleri	81
Makroskopik Muayene.....	82
BESİYERLERİ	84
Besiyerlerinin Bileşimine Giren Başlıca Maddeler	85
Besiyerlerinin Hazırlanması	87
Teşhis Laboratuvarlarında Kullanılan Başlıca Besiyerleri	88
Nutrient Buyyon ve Nutrient Agar.....	88
Kanlı Agar	88
MacConkey Agar	89
Besiyerlerinin Seçimi.....	89
BAKTERİ KÜLTÜRÜ.....	89
Besiyerine Ekim.....	89
Katı Besiyerlerine (Agarlara) Öze İle Ekim	90
İnkubasyon	91
İnkubasyon Atmosferi.....	91
İnkubasyon Sıcaklığı.....	91
İnkubasyon Süresi.....	92
BIYOKİMYASAL TESTLER	92
Karbonhidrat Fermentasyon Testi	92
Oksidasyon-Fermentasyon (O/F) Testi.....	92
Metil Red (MR) Testi	93
Voges-Proskauer (VP) Testi.....	93
Nitrat Redüksiyon Testi.....	93
İndol Testi.....	94
Hidrojen Sulfid Testi	94
Katalaz Testi	94
Oksidaz Testi	95
Koagülaz Testi	95
Üreaz Testi.....	95
Birden Fazla Biyokimyasal Test İçeren Besiyerleri.....	96
Bakteri İdentifikasyonunda Kullanılan Minyatür Test Kitleri	96
Özet	98
Kendimizi Sınayalım	99
Kendimizi Sınayalım Yanıt Anahtarı	100
Sıra Sizde Yanıt Anahtarı	100
Yararlanılan Kaynaklar.....	101

6. ÜNİTE

Temel Mikoloji	102
SINIFLANDIRMA.....	103
MORFOLOJİK ÖZELLİKLER	104
Mikroskopik Morfoloji	104
Makroskopik Morfoloji.....	107
ÜREME VE FİZYOLOJİ	107
Üreme	108
Aseksüel Sporlar.....	108
Seksüel Sporlar	110
Fizyoloji.....	111
LABORATUVAR TEŞHİSİ	112

Materyallerin Toplanması.....	112
Materyallerin Muayenesi.....	112
Wood lambası	113
Direkt Mikroskopi	113
Kültür	113
Moleküler Teknikler.....	114
Hayvan Denemeleri	114
Serolojik ve Allerjik Testler.....	114
Özet.....	115
Kendimizi Sınayalım.....	116
Okuma Parçası	117
Kendimizi Sınayalım Yanıt Anahtarı	117
Sıra Sizde Yanıt Anahtarı	117
Yararlanılan Kaynaklar.....	118

Bağışıklığın Yapısal Unsurları 120

TEMEL KAVRAMLAR.....	121
Doğal Direnç	121
Doğal Savunma Engelleri.....	121
Nonspesifik Bağışıklık.....	122
Spesifik Bağışıklık	122
Spesifik İmmun Yanıtın Temel Özellikleri	122
Bağışıklık Kazanma Yolları.....	123
ANTİJEN.....	123
Antijenitenin Koşulları	123
Antijenik Determinant	124
ANTİKOR.....	125
İmmunglobulin Molekülü	125
İmmunglobulin Sınıfları	126
İMMUN SİSTEM HÜCRELERİ.....	128
Myeloid Seri Hücreleri	129
Mononükleer Fagositik Sistem Hücreleri.....	129
Lenfoid Seri Hücreleri.....	130
B Lenfositleri	131
T Lenfositleri.....	131
Doğal Öldürücü Hücreler (NK Hücreler).....	131
İMMUN SİSTEM ORGANLARI.....	132
Primer Lenfoid Organlar	132
Sekonder Lenfoid Organlar	133
Özet	134
Kendimizi Sınayalım	135
Kendimizi Sınayalım Yanıt Anahtarı	136
Sıra Sizde Yanıt Anahtarı	136
Yararlanılan Kaynaklar.....	137

7. ÜNİTE

8. ÜNİTE

Humoral ve Hücresel Bağışıklık.....	138
FAGOSİTOZ.....	139
Fagositozun Aşamaları	139
Kemotaksis.....	139
Bağlanma	139
Yutma.....	140
Öldürme ve Sindirme.....	141
Farklı Hücrelerin Fagositozu	141
Fagositozun Sonuçları.....	142
ANTIJEN İŞLENMESİ VE SUNULMASI.....	142
MHC Molekülleri	142
Ekzojen Antijenlerin İşlenmesi ve Sunulması.....	143
Endojen Antijenlerin İşlenmesi ve Sunulması	144
Sitokinler	145
HUMORAL İMMUN YANIT.....	146
T-Bağımlı Antijenlere Karşı Humoral İmmun Yanıt.....	147
Primer ve Skonder İmmun Yanıt	148
T-Bağımsız Antijenlere Karşı Humoral İmmun Yanıt.....	149
Antikorların Görevleri	149
Direkt Etki: Toksin Nötralizasyonu	149
Direkt Etki: Virus nötralizasyonu	149
Direkt Etki: Bakteriyel Adhezyon İnhibisyonu.....	149
İndirekt Etki: Oponizasyon	150
İndirekt Etki: Antikora Bağımlı Hücresel Sitotoksite	150
İndirekt Etki: Komplemant Aktivasyonu	150
İndirekt Etki: Lokal Yangısal Reaksiyon Uyarımı.....	150
İndirekt Etki: B Hücre Fonksiyonlarının Düzenlenmesi.....	150
Komplemant	151
Komplementin Görevleri	152
HÜCRESEL İMMUN YANIT.....	152
T Hücre Sitotoksitesi	152
Endojen Antijenlerin Sunulması	152
Sitotoksik T Hücrelerinin Aktivasyonu	153
Sitotoksik T Hücrelerinin Adhezyonu.....	153
Hedef Hücrenin Öldürülmesi.....	154
Sitotoksik T Lenfositlerinin Fonksiyonları	154
NK Hücre Sitotoksitesi	155
Antikora Bağımlı Hücresel Sitotoksite (ADCC)	155
Direkt NK Hücre Sitotoksitesi	156
Özet	157
Kendimizi Sınayalım	158
Kendimizi Sınayalım Yanıt Anahtarı	159
Sıra Sizde Yanıt Anahtarı	159
Yararlanılan Kaynaklar.....	160

9. ÜNİTE

Özel Bağışıklık Olayları.....	162
MUKOZAL BAĞIŞIKLIK	163
Doğal Savunma Mekanizmaları	163
Sindirim Kanalı.....	163
Solunum Sistemi.....	165
Ürogenital Sistem	165
Meme Bezi.....	165
Mukozaal Yüzeylelerdeki Lenfoid Dokular	165
Uyarıcı Odaklar	166
Efektör Odaklar	166
Mukozaal Yüzeylelerde Humoral Bağışıklık	166
İmmunglobulin A	166
İmmunglobulin E	167
İmmunglobulin G.....	168
İmmunglobulin M	168
Mukozaal Yüzeylelerde Hücresel Bağışıklık	168
Deride Savunma ve Bağışıklık	168
Doğal Savunma Mekanizmaları	168
Deride Bağışıklık.....	169
FÖTUS VE YENİDOĞANLARDA BAĞIŞIKLIK	169
Fötusda İmmun Sistemin Gelişimi	169
Fötal Savunma Mekanizmaları.....	170
Plasental Bağışıklık Transferi.....	170
Yenidoğanlarda Bağışıklık	171
Yenidoğanlarda İmmun Sistem	171
Yenidoğana Pasif Bağışıklık Transferi	172
Kolostrumun Yapısı ve Sentezi	172
Bağırsaktan Kolostrum Emilimi	172
Yenidoğanlarda Maternal Bağışıklık	172
BAKTERİLERE KARŞI BAĞIŞIKLIK	173
Bakteri Antijenleri.....	173
Doğal Savunma Mekanizmaları	175
Antibakteriyel Direnci Etkileyen Genel Faktörler	175
Nonspesifik Kimyasal Faktörler.....	175
İmmunolojik Savunma Mekanizmaları.....	176
Hücre dışı Bakterilere Karşı Bağışıklık.....	176
Hücre içi Bakterilere Karşı Bağışıklık	178
Bakterilerin İmmun Yanıttan Kurtulma Yolları	178
VİRUSLARA KARŞI BAĞIŞIKLIK.....	179
Virus Antijenleri.....	180
Doğal Savunma Mekanizmaları	180
Antiviral Direnci Etkileyen Genel Faktörler	180
İmmunolojik Savunma Mekanizmaları.....	181
Humoral İmmun Yanıt.....	181
Hücresel İmmun Yanıt.....	182
Virusların İmmun Yanıttan Kurtulma Yolları.....	184
Antijenik Değişimler	184

İmmunbaskılama (İmmunosupresyon)	184
Özet.....	185
Kendimizi Sınayalım.....	186
Kendimizi Sınayalım Yanıt Anahtarı	187
Sıra Sizde Yanıt Anahtarı	187
Yararlanılan Kaynaklar.....	187

10. ÜNİTE

Seroloji.....	188
ANTİJEN ANTİKOR REAKSİYONLARI	189
Serolojik Reaksiyonların İki Basamağı.....	190
Zon Fenomeni	190
BAĞLANMA AŞAMALARINA GÖRE SEROLOJİK	191
TESTLER.....	191
Birincil Bağlanma Testleri	191
Enzim İmmunoassay (EIA)	192
Antikor Saptamaya Yönelik ELISA	192
Antijen Saptamaya Yönelik ELISA.....	193
İmmunofluoresan Teknikleri	194
Radyoimmunoassay (RIA).....	196
İkincil Bağlanma Testleri	196
Presipitasyon.....	196
Aglutinasyon.....	199
Viral Hemaglutinasyon ve İnhibisyonu	201
Komplement Fiksasyon	203
Üçüncül Bağlanma Testleri	204
Özet.....	206
Kendimizi Sınayalım.....	207
Kendimizi Sınayalım Yanıt Anahtarı	208
Sıra Sizde Yanıt Anahtarı	208
Yararlanılan Kaynaklar.....	209

Önsöz

Laborant ve Veteriner Sağlık Ön lisans programı için hazırlanmış olan “Temel Veteriner Mikrobiyoloji ve İmmunoloji” adlı bu kitapta, bakteri ve mantarların temel yapıları irdelenmiş, antimikrobiyel yaklaşımlarla nasıl elimine edilecekleri konuları anlatılmış, genetik, serolojik ve bakteriyolojik yöntemlerle nasıl tanımlanacakları belirtilmiş, infeksiyöz etkenlere karşı temel immunité yapıtaşları verilmiştir. Bu kitaptaki konular okuyucuya hayvanların salgın hastalıkları ile ilgili olan bakteri ve mantarlar hakkında temel bilgiler vererek onları infeksiyöz hastalıkların daha rahat anlaşılmasına temel oluşturucu niteliktedir. Öğrenciler bu kitap sayesinde bakteri ve mantarların nasıl canlılar olduklarını, hastalık yapma mekanizmaları konusunda aydınlatılmış olacaklardır. Gayet yalın ve anlaşılır bir dil ile yazılmaya çalışılmış bu kitap mikrobiyoloji temel kavramlarının rahatlıkla öğrenilebileceği bir kaynak niteliğindedir. Bundan dolayı ana hedef kitlesi Laborant ve Veteriner Sağlık ön lisans öğrencileri olmakla beraber, veteriner mikrobiyoloji temel bilgileri edinmek isteyen tüm bireyler bu kitaptan rahatlıkla yararlanabilirler.

Bu kitabın hazırlanmasında emeği geçen başta ünite yazarlarına ve kitap hazırlanırken bizlere yardımcı olan sevgili araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Editör

Prof.Dr. K. Tayfun CARLI

TEMEL VETERİNER MİKROBİYOLOJİ VE İMMUNOLOJİ



Amaçlarımız

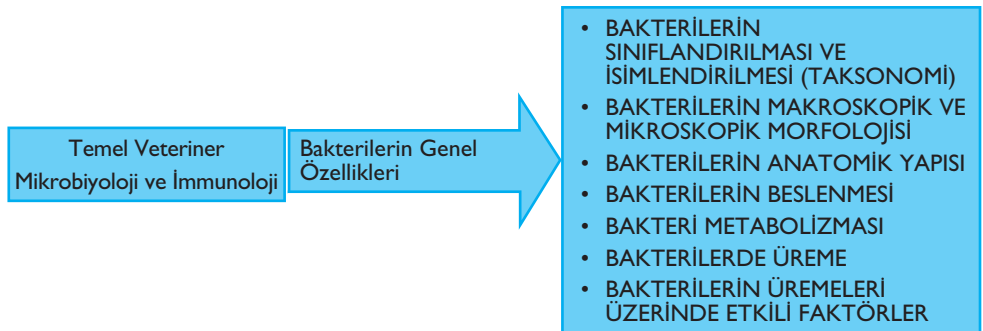
Bu üniteyi tamamladıktan sonra;

- 👁️ Bakterilerin sınıflandırılması ve isimlendirilmesindeki esasları açıklayabilecek;
- 👁️ Bakterilerin morfolojik ve yapısal özelliklerini tanımlayabilecek ve karşılaştıracak
- 👁️ Bakterilerin beslenme ve metabolizma özelliklerini açıklayabilecek
- 👁️ Bakterilerin üremelerini ve üremeleri üzerinde etkili faktörleri tanımlayabileceksiniz

Anahtar Kavramlar

- Prokaryot
- Bakteri
- Taksonomi
- Cins
- Tür
- Koloni özellikleri
- Mikroskopik morfolojiler
- Gram pozitif
- Gram negatif
- Hücre duvarı
- Kapsül
- Flagella
- Fimbria
- Antijenite
- Toksijenite
- Patojenite
- Virulens
- Sitoplazmik membran
- Spor(endospor)
- Beslenme
- Metabolizma
- Üreme

İçindekiler



Bakterilerin Genel Özellikleri

BAKTERİLERİN SINIFLANDIRILMASI VE İSİMLENDİRİLMESİ (TAKSONOMİ)

Mikroorganizmaların keşfedilmesinden önce doğadaki tüm canlıların bitki ve hayvanlardan oluştuğu düşünülmüştür. Mikroskobun keşfi ile mikroorganizma adı verilen farklı bir canlı grubunun varlığının saptanmasından sonra, E. H. Haeckel 1866 yılında bu tek hücreli canlıları bitki ve hayvanlardan ayırmak için protista adı altında ayrı bir grup altında toplamıştır. Protistalar, algler, protozoonlar, mantarlar ve bakterilerden oluşmakta idi. Yirminci yüzyılın ortalarında elektron mikroskop ile yapılan incelemeler sonucunda bakterilerin prokaryotik (ilkel nükleuslu) olarak tanımlanan basit bir yapıya, alglerin, protozoonların ve mantarların bitki ve hayvan hücreleri gibi ökaryotik (gerçek nükleuslu) denilen daha gelişmiş bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Prokaryotik hücreler ile ökaryotik hücreler arasındaki temel farklar şunlardır; prokaryotik hücrelerde genellikle sirküler tek kromozom, plasmid (yaygın), mesosom, hücre duvarında peptidoglikan ve 70S karakterinde ribozom bulunmakta, nükleer membran, nükleolus, kromozomda histon, kloroplast, mitokondria, golgi aparatı ve endoplazmik retikulum bulunmamakta, ökaryotik hücrelerde ise birden fazla lineer kromozom, plasmid (nadir), nükleer membran, nükleolus, kromozomda histon, kloroplast, mitokondria, golgi aparatı, endoplazmik retikulum ve 80S karakterinde ribozom bulunmakta, mesosom, hücre duvarında peptidoglikan bulunmamaktadır. Bakterilerin protistalardan farklı olduğunun anlaşılmasından sonra bakterilerin prokaryot grubunda yer almasına karar verilmiştir. Prokaryot grubunda bakteriler ve arkeler (arkebakteriler) bulunmaktadır.

Taksonomi sınıflandırma, isimlendirme ve tanımlama olmak üzere birbirinden farklı ama kendi içlerinde birbirleri ile ilişkili üç alanı kapsamaktadır. Tanımlama taksonominin uygulamalı yönüdür, organizmaların özelliklerini saptama ve kaydetme, dolayısıyla hangi taksona ait olduklarını tayin etme işlemidir.

Bakterilerin sınıflandırılması fenotipik, kemotaksonomik ve genotipik sınıflandırma tarzında olmaktadır. Fenotipik sınıflandırma bakterinin morfolojik, fizyolojik, kültürel, biyokimyasal, serolojik vs. özelliklerini, kemotaksonomik sınıflandırma bakterilerin kimyasal yapılarının analizini, genotipik sınıflandırma ise bakterinin genetik yapısının analizini temel alan sınıflandırmadır. Bu sınıflandırmalar içinde en güvenilir genotipik sınıflandırmadır.

Genotipik sınıflandırma niye diğer sınıflandırma tarzlarından daha güvenilirdir ve bu sınıflandırmada hangi yöntemler kullanılmaktadır?



Tablo 1.1
Bakterilerin Sınıflandırılmasına Ait Bazı Örnekler

Alem(Kingdom):	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Bölüm(Phylum):	Proteobacteria	Proteobacteria	Tenericutes	Firmicutes	Spirochaetes
Sınıf (Class):	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Mollicutes	Clostridia	Spirochaetes
Takım (Order):	Enterobacteriales	Legionellales	Mycoplasmatales	Clostridiales	Spirochaetales
Aile(Family):	Enterobacteriaceae	Coxiellaceae	Mycoplasmataceae	Clostridiaceae	Leptospiraceae
Cins (Genus):	<i>Escherichia</i>	<i>Coxiella</i>	<i>Mycoplasma</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Leptospira</i>
Tür (Species):	<i>E.coli</i>	<i>C. burnetii</i>	<i>M.gallisepticum</i>	<i>C.botulinum</i>	<i>Linterrogans</i>

Bakterilerin Sınıflandırılması (Klasifikasyon)

Sınıflandırma organizmaların ortak benzerlikleri veya evrimsel ilişkilerine dayalı olarak takson adı verilen gruplar şeklinde düzenlenmesidir. Bir sınıflandırma şeması alem, bölüm, sınıf, takım, aile, cins, tür şeklindeki hiyerarşik sırada en büyük ve genel olan alem ile başlar, en küçük ve en özel olan tür ile sona erer. Tablo 1-1 de bakterilerin sınıflandırılmasına ait bazı örnekler görülmektedir.

Bakterilerin İsimlendirilmesi (Nomenklatur)

İsimlendirme organizmalara belirlenmiş kurallara uygun olarak isim verme işlemidir. Bakteriler binomial sisteme göre isimlendirilmektedir. Bakterilerin bilimsel isimleri genellikle iki kelimeden oluşmaktadır. İlk kelime cins (genus) ismini gösterir ve ilk harfi büyük olarak yazılır. İkinci kelime ise, tür (species) ismi olup küçük harfler ile yazılır. Örn; *Bacillus anthracis*. Bazı bakterilerin alt türleri bulunabilmekte ve bu bakterilerin alt türleride Örn; *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis* şeklinde isimlendirilir. Cins isimleri, bakteriyi bulan kişinin ismi Örn; *Brucella* (Bruce) *melitensis*, bakteri morfolojisi Örn; *Staphylococcus* (üzüm salkımı) *aureus*, tür isimleri ise bakterinin yerleştiği yer Örn; *Escherichia coli* (coli: kolon), oluşturduğu lezyon veya hastalık Örn; *Arcanobacterium pyogenes* (pyogenes: irin oluşturma), *Brucella abortus* (abortus: yavru atma), koloni rengi Örn; *Staphylococcus aureus* (aureus: altın sarısı) gibi özellikleri ile ilişkili olabilir. İsimlendirmede genellikle latince kullanılır ve bakteri isimleri italik harfler ile yazılır. Tür adı sabittir, eğer yeni bilgiler ışığında bakteri farklı bir cinse sokulursa cins ismi değişebilir. Örn; *Arcanobacterium pyogenes* in eski isimleri *Corynebacterium pyogenes*, *Actinomyces pyogenes* dir. Bakteri isimleri ilk olarak açık şekilde yazıldıktan sonra genus isminin sadece ilk harfi ve tür ismi yazılarak Örn; *Staphylococcus aureus* - *S. aureus* şeklinde kısaltılma yapılır. Cins isminden sonra italik olmayan şekilde yazılan sp. (species) türü, spp. (species) ise türleri anlamına gelmektedir. Örn; *Brucella* sp. ve *Brucella* spp., *Brucella* türü ve türleri anlamına gelir.

DİKKAT



Bakteri taksonomisi yeni gelişmelere bağlı olarak zamanla değişiklik gösterebildiği için taksonomi ile ilgili güncel bilgiler mutlaka takip edilmelidir.

İNTERNET



Taksonomi ile ilgili güncel bilgilere <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root> adresinden ulaşabilirsiniz.

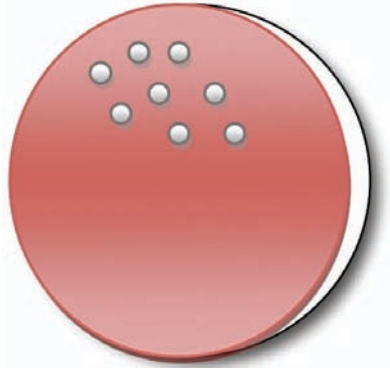
BAKTERİLERİN MAKROSKOPİK VE MİKROSKOPİK MORFOLOJİSİ

Bakterilerin Makroskopik Morfolojisi

Bir bakteri uygun bir katı besiyerinde, uygun koşullarda (ısı, rutubet, oksijen vs.) yeterli süre inkube edilerek üretilirse inkubasyon süresinin sonunda gözle görülebilen (1-4 mm çapında) milyonlarca bakterinin oluşturduğu koloniler oluşur. Bu kolonilerin özellikleri bakteri türleri arasında farklılık göstermekte ve bu özellikler bakterilerin identifikasyonuna yardımcı olmaktadır. Koloniler incelenirken koloni oluşum süresi, büyüklük, tip, kıvam, saydamlık, renk, koku, hemoliz oluşturma özellikleri dikkate alınmaktadır. Koloni oluşum süreleri bakteri türleri arasında farklılık göstermektedir. Örn; *Escherichia coli* 24 saat, *Brucella abortus* 3-4 gün, *Mycobacterium tuberculosis* 15-20 gün sonra koloni oluşturmaktadır. Koloni büyüklüğü, uygun koşullar altında türlere özel bir karakter taşır. Bakteriler S-, R-, M- ve L- tipi olmak üzere temel olarak 4 tip koloni oluştururlar (Şekil 1.1, 1.2, 1.3, 1.4). Kenarlı ve yüzeyi düzgün, kabarık, nemli ve homojen yuvarlak koloniler S-tipi (Örn: *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella pullorum* kolonisi), kenarları ve yüzeyi düzgün olmayan, yassı koloni-

Şekil 1.1

S-Tipi
Koloni; *P.
multocida*

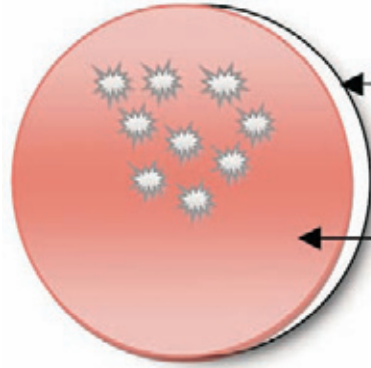


Şekil 1.2

R tipi Koloni;
B. anthracis

Petri

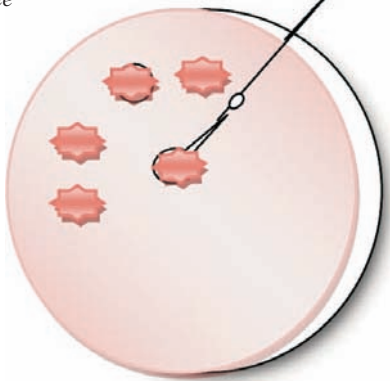
Besiyeri



Şekil 1.3

M-Tipi Koloni;
K. pneumoniae

Öze



Şekil 1.4

L-Tipi Koloni;
M. mycoides.



ler R- tipi (Örn: *Bacillus anthracis* kolonisi), yapışkan, öze değdirildiğinde iplik gibi uzayabilen koloniler M- tipi (Örn: *Klebsiella pneumoniae* kolonisi) ve düğme tarzında veya sahanda yumurta görünümüne koloniler L-tipi (Örn: *Mycoplasma mycoides* kolonisi) olarak ifade edilmektedir. Birçok bakteri ilk izolasyonda S tipi koloni oluştururken, bazı bakteriler (Örn; *Bacillus anthracis*) R tipi koloni oluşturmaktadır. Ayrıca eskimiş veya birçok pasaja maruz kalmış bakteri suşlarının oluşturdukları koloni tipi S tipinden R tipine dönüşebilmektedir.

Bakterilerin Mikroskopik Morfolojisi

Bakteriler mikroskopik morfoloji özelliklerine göre temel olarak yuvarlak, çomak ve sarmal şekilli bakteriler olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Ayrıca **pleomorfik bakteriler**de bulunmaktadır. Örn: *Mycoplasma* spp.

Pleomorfik bakteriler:
Tek karakteristik bir morfoloji göstermeyen, birden fazla morfoloji gösteren bakterileri ifade eder.

Yuvarlak şekilli bakteriler; koklar (tekili coccus, çoğulu cocci): Koklar ortalama çapları 0.8 -1.5 µm olan yuvarlak şekilli bakterilerdir. Üreme esnasında birbirlerinden ayrılmayarak yan yana gelerek veya gruplar oluşturarak değişik şekiller oluşturmaktadır.

Diplokoklar(diplococci): Koklar tek yönde bölündükten sonra oluşan iki yeni hücre ikiye ikiye birbirlerine yapışık olarak kalır ve mikroskopik incelemede kahve çekirdeği/fasulye veya lanset/mum alevi şeklinde görülür, böyle morfolojiye sahip koklara diplokok denir. Örn; *Neisseria meningitidis* veya *Streptococcus pneumoniae*

Streptokoklar(streptococci): Koklar birbirlerine paralel düzlemler üzerinde bölündükten sonra koklar birbirlerine bağlı kalır, zincir oluşturur ve mikroskopik incelemede dizilmiş tesbih taneleri şeklinde görülür, böyle morfolojiye sahip koklara streptokok denir. Streptokokların zincir uzunluğu (5 - 100 koktan oluşan) türler arasında farklılık gösterebilmektedir. Örn *Streptococcus agalactia*

Stafilokoklar(staphylococci): Koklar çeşitli yönlerde bölündükten sonra koklar birbirlerine bağlı kalır, kümeler oluşturur ve mikroskopik incelemede üzüm salkımı şeklinde görülür, böyle morfolojiye sahip koklara stafilokok denir. Örn; *Staphylococcus aureus*

Tetrakoklar (tetracocci)/Tetraçlar: Koklar birbirlerine dikey iki yönde ve bir düzlem üzerinde bölündükten sonra dörtlü koklardan meydana gelen gruplar oluşturur ve mikroskopik incelemede dörtlü kok şeklinde görülür, böyle morfolojiye sahip koklara tetrakok denir. Örn; *Gaffkya homari*

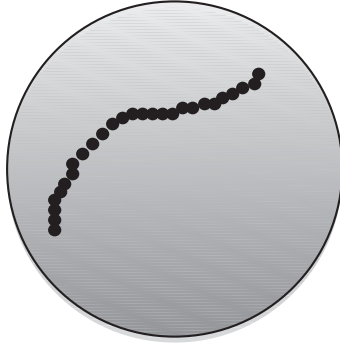
Sarsinalar(sarcinae): Koklar birbirlerine dikey üç yönde bölündükten sonra 8-12-16 koklardan meydana gelen gruplar oluşturur ve mikroskopik incelemede balya şeklinde görülür, böyle morfolojiye sahip koklara sarsina denir. Örn; *Sarcina maxima*

Çomak şekilli bakteriler; basiller (tekili bacillus, çoğulu bacilli): Basiller boyları enlerinden daha uzun olan çomakçık veya silindir şeklinde bir morfolojiye sahiptir. Basiller büyüklükleri ve morfolojileri bakteri türleri arasında oldukça farklılık gösteren bakterilerdir. Örn *Salmonella* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp. kenarlarından bir veya iki uca doğru daralmış, *Brucella* spp., *Haemophilus* spp., boyu enine yakın kok ile basil arası şekilde kokoid veya kokobasil, *Campylobacter* spp., S harfi veya martı kanadı, *Pasteurella* spp., bipolar (dokulardan yapılan boyalı preparatlarda), *Clostridium tetani* (sporlu formu), davul tokmağı, *C.botulinum* (sporlu formu), raket, *C. chauvoei* (sporlu formu), limon, *Corynebacterium* spp. X,Y,V,T veya çin harfleri, *Fusiformis nodosus*, iki kenarı dış bükey, uçları sivri görünüşlü mekik, *Bacillus anthracis* (Şekil 1.6), suni kültür ortamlarındaki kolonilerden yapılan boyamalarda sporlu ve saç benzeri uzun filamentler tarzında görülürler.

Sarmal şekilli bakteriler; spiraller: Spiraller boyları enlerinden çok daha uzun olan kıvrımlı bir morfolojiye sahiptir. Kıvrım özelliği ve sayısı bakteri türleri arasında farklılık göstermektedir. Spiral bakteriler vibriolar, spiriller ve spiroketler olarak 3 gruba ayrılır. *Vibrio* spp. bir kıvrımlı (virgül şeklinde), *Spirillum* spp. birden fazla kıvrımlı görülmektedir. Spiroketlerden, *Treponema* spp. kıvrımları sık ve dik, kıvrımların yüksekliği uçlara doğru giderek azalmış, *Borrelia* spp. kıvrımları geniş, *Leptospira* spp ise kıvrımları çok sık ve kısa, bir veya iki ucu çengel gibi kıvrılmış tarzda görülürler. Çeşitli bakterilere ait örnekler aşağıdaki şekillerde görülmektedir (Şekil 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, ve 1.9)

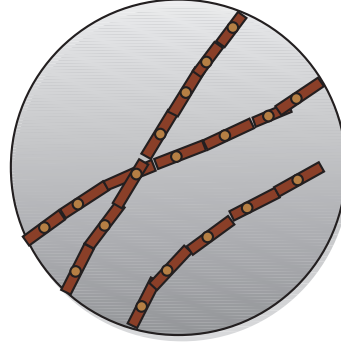
Şekil 1.5

Kok;
Streptococcus sp.



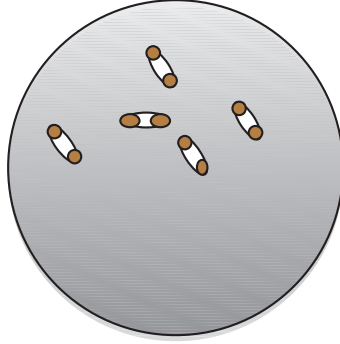
Şekil 1.6

Basil;
Bacillus sp.
(sporlu)



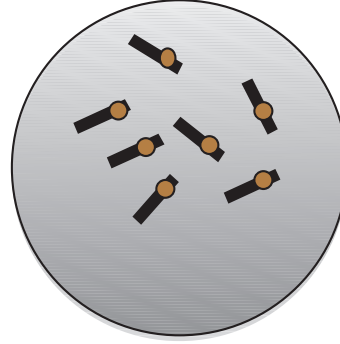
Şekil 1.7

Basil;
Pasteurella sp.
(bipolar)



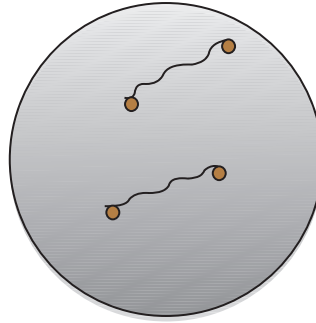
Şekil 1.8

Basil;
Clostridium sp.
(sporlu)



Şekil 1.9

Spiral;
Leptospira sp.



Optimal koşullarda hep aynı morfolojiyi gösteren bakteriler (Örn; *Yersinia pestis*), optimal olmayan koşullarda üretildiğinde, normal morfolojilerinden farklı olarak oval, yuvarlak, filamentöz gibi değişik morfolojilerden oluşan involusyon formunu oluştururlar.

Bakterilerin büyüklükleri, yuvarlak biçimdeki bakteriler: 0.4 -1.2 μm , çomak biçimdeki bakteriler: 0.2-1.0 x 0.5-10.0 μm , sarmal biçimdeki bakteriler: 0,15-0.25 x 5-20 μm arasında değişmektedir.

Bakteriler optimal olmayan koşullarda üretilirse normal koşullardaki karakteristik makroskopik ve mikroskopik morfolojik özelliklerini göstermeyebilir, bu durum yanlışlara sebep olabilir ve identifikasyonu güçleştirir.



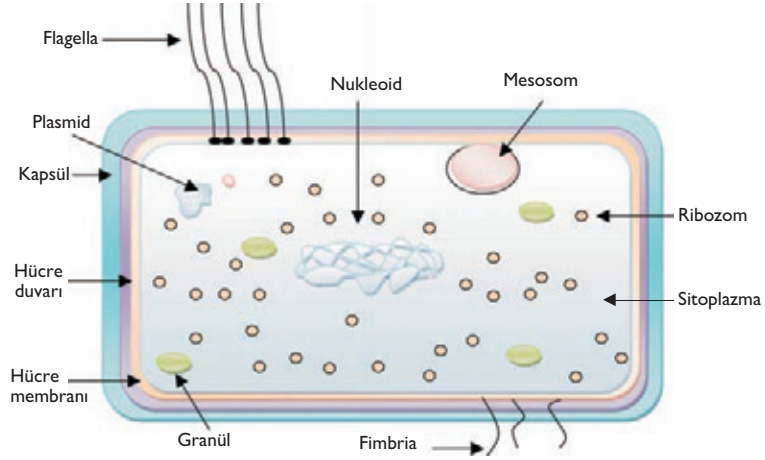
DİKKAT

BAKTERİLERİN ANATOMİK YAPISI

Bakterinin anatomik yapısı dış yapılar ve iç yapılar olarak incelenir (Şekil 1.10).

Şekil 1.10

Bakteri anatomik yapısı



Antijenite: Yabancı bir maddenin immun sistemi uyandırabilme kapasitesini ifade eder.

Toksijenite: Bir mikroorganizmanın toksin oluşturabilme kapasitesini ifade eder.

Virulens: Patojen (hastalık oluşturma yeteneğinde olan) bir mikroorganizmanın hastalık oluşturma şiddetini, derecesini ifade eder.

Peptidoglikan: N -asetil glukoz amin (NAGA) ve N -asetil muramik asit (NAMA) rezidülerinden oluşmuş bir polimerdir.

Dış Yapılar

Dış yapılar hücre duvarı, kapsül, mukoid/yapışkan tabaka (slime layer), S tabaka (surface layer), flagella (flagellum), fimbria (pilus) dan oluşmaktadır. Bu yapılar bakterilerin dış etkilerden korunması, çeşitli substansların bakterilere bağlanması, bakterilerin çeşitli hücelere bağlanması, hareket ve **antijenite** (immunojenite), **toksijenite**, **virulens** ile ilişkilidir. Bakterilerin dış yapıları bakterinin yaşamı için zorunlu yapılar değildir, bu yapılar olmadan da uygun koşullarda yaşayabilirler

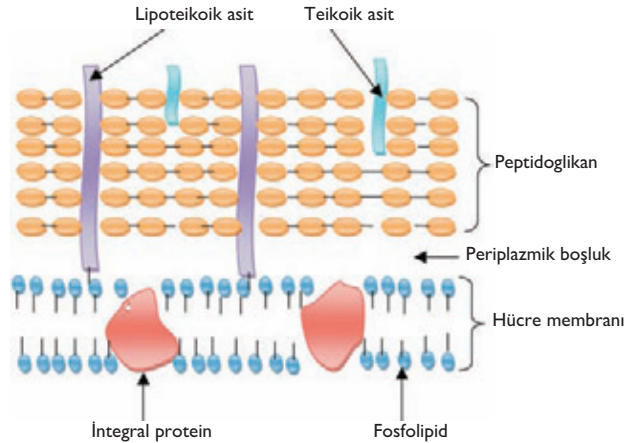
Hücre Duvarı

Hücre duvarı sitoplazmik membranın dışında yer almaktadır. Hücre duvarı yapısal özellikleri bakterinin gram pozitif ve gram negatif olmasına göre farklılık göstermektedir.

Gram- pozitif bakterilerin hücre duvarı kalın, (20-80 nm) gram- negatif bakterilerin hücre duvarı incedir. Gram- pozitif bakterilerin hücre duvarı başlıca iki temel kısımdan oluşmaktadır. Bunlardan biri hücre duvarı kuru ağırlığının %40-90'ını

Şekil 1.11

Gram-pozitif bakteri hücre duvarı yapısı

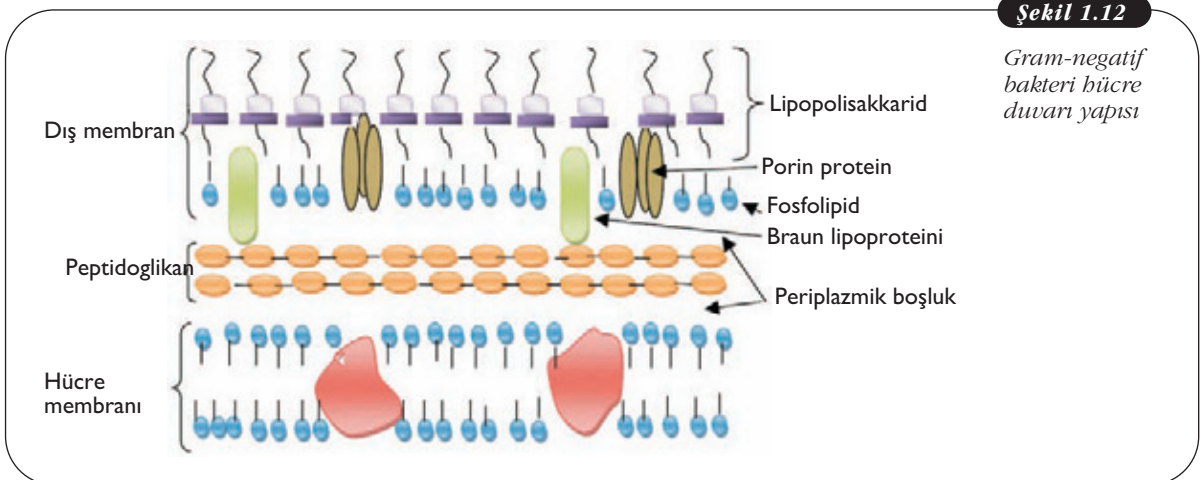


oluşturan **peptidoglikan** (murein, mukopeptid, glikopeptid) diğeri ise antijenik bir özelliğe sahip olan teikoik asittir. İki tip teikoik asit (teikoik asit/ribitol teikoik asit/duvar teikoik asit ve gliserol teikoik asit/lipoteikoik asit/membran teikoik asit) vardır (Şekil 1.11). Gram pozitif bakterilerin tümünde lipoteikoik asit bulunurken, bazıları ribitol teikoik asit içermez. Gram-pozitif olan *Mycobacterium* spp.'nde diğerk bakterilerden farklı olarak hücre duvarında lipid oranı yüksektir (hücre duvarının yaklaşık 1/3 ünü oluşturur) ve bu durum bakterilere **asidorezistans** özellik kazandırmaktadır.

Gram-negatif bakterilerde hücre duvarı daha kompleks bir yapı karakteri göstermektedir. Bunlarda teikoik asit bulunmadığı gibi peptidoglikan tabakası hem daha az kalınlıkta (hücre duvarının %5-10'u kadar) ve hem de ortada lokalize olmuştur. Gram-negatif bakterilerde sitoplazmik membranın dışında bulunan hücre duvarı başlıca iki katmandan oluşmaktadır. Bu katmanlardan biri dış membran olup lipopolisakkarid (LPS), protein, fosfolipid, lipoproteinden oluşmaktadır, diğeri ise peptidoglikan olup dış membran ile ve sitoplazmik membran arasında yer almaktadır. Dış membranın dış kısmında bulunan LPS, insanlar ve hayvanlar için oldukça toksiktir ve gram negatif bakterilerin endotoksini olarak isimlendirilir, hücre yüzeyine sıkıca bağlıdır ve yalnızca hücre parçalandığında açığa çıkar. LPS, lipid A ve polisakkaridlere ayrıştığında toksisitenin tümü lipid A kısmına aittir. Endotoksinler ateş, şok ve ölüm tablolarına neden olabilir. Polisakkarid bölüm ise bakterinin O antijeni olarak isimlendirilen major yüzey antijenidir. Çok sayıda O antijeni vardır. Sadece *Salmonella* genusunda 1000'in üzerinde O antijeni tanımlanmıştır. Salmonellaları **serotiplendirimede** hücre duvarı somatik O antijeni ve flagella H antijeninden yararlanılır. Dış membranda yer alan diğerk anijenik yapı ise trimer moleküller halinde bulunan porin proteinleridir. Bunlar dış mebranın altında bulunan peptidoglikan tabakasına kadar uzanırlar. Bu trimer moleküller ortasında spesifik ve nonspesifik kanallar bulunur. Dış membranın ikinci tabakasını fosfolipid teşkil eder. Bu tabaka peptidoglikana yöneliktir ve her ikisi arasında periplazmik boşluğun bir bölümü bulunur. Periplazmik boşlukların içerisi periplazmik jel ile doludur. Bu jel içinde fosfatazlar, nukleazlar, beta laktamazlar, karbonhidrat bağlayan proteinler, aminoasitler, iyonlar bulunur. Dış membranın içine doğru uzanan ve orjinini peptidoglikandan alan Braun lipoproteinler heriki tabaka arasında bağlantı kurmada önemli rollere sahiptirler. Dış membranın kalınlığı bakterilere göre değişmek üzere 7-8 nm arasında değişebilir. Gram negatif bakte-

Asidorezistans: Bazı fuksin gibi boyalar ile boyandıktan sonra, asit alkol ile kolaylıkla dekolore edilemeyen bakterileri ifade eder.

Serotiplendirme: Mikroorganizmaların antijenik özelliklerine göre tiplendirilmesini ifade eder.



rilerde hücre duvarının ikinci katmanı peptidoglikan tabakasıdır ve sitoplazmik membranın üstünde yer almaktadır. Bu iki tabaka arasında da periplazmik boşluğun diğer bir bölümü bulunur. Gram pozitif bakterilerde ise periplazmik boşluk bölünmüş değildir. Peptidoglikan, hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık %10'u kadardır (Şekil 1.12). Mikoplazmalarda ve üreoplazmalarda hücre duvarı bulunmaz. Bazı bakterilerde sitoplazmik membran, hücre duvarı ve hücre duvarını çevreleyen özgül protein, polisakkarid ve diğer yapıdaki maddelerin tümü hücre zarfını oluşturmaktadır.

Hücre duvarının mekanik veya kimyasal yollarla giderilmesi durumunda gram pozitif bakterilerde protoplast, gram negatif bakterilerde sferoplast formları oluşur.

Bakteri hücre duvarı, bakterilere şekil verir, çevresel etkilerden ve kendi iç osmotik basıncına (5-20 atmosfer) karşı korur, permeabilitenin, osmosisin sağlanmasını ve devam ettirilmesini sağlar, bölünme ve sporulasyonda rol oynar, bakteriyofajların, plasmidlerin, antikorların, komplementlerin, çeşitli bakteriosinlerin, genetik materyallerin ve substansların bağlanmasında reseptör bölgeler oluşturur ve bakterilerin antijenik, toksijenik, virulens faktörlerinin oluşturulmasında etkin fonksiyona sahiptir.

Kapsül

Bazı bakterilerde hücre duvarının dışında bulunan kalınlığı (0.2-10 µm) ve yapısı bakteri türlerine göre farklılık gösterebilen örn; *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium welchii*, *Streptococcus pneumoniae* da polisakkarid, *Bacillus anthracis* de protein (D-glutamik asit), *Bacillus megaterium* da polisakkarid+protein özellikte olan ve jelatinöz, viskoz mukoid karakterde hücre duvarına sıkıca bağlı bir katmandır. Kapsül bakteriyi dış çevredeki ve vücut içindeki birçok zararlı etkilerden korur, antifagositik etkiye sahiptir, patojenik bakterilerin virulensi ve antijenitesi ile ilişkilidir.

Mukoid/Yapışkan Tabaka (Slime Layer)

Bazı bakterilerde hücre duvarı dışında, hücreyi kuşatan kapsülün aksine organize olmamış, hücre duvarına gevşek olarak bağlı, kolaylıkla uzaklaştırılabilen, polisakkarid, glikoprotein ve glikolipid yapısında ekstrasellüler substanslardır. Bu substans bakterilerin dış etkilerden korunmasında ve çeşitli yüzeylere yapışmasında rol oynar.

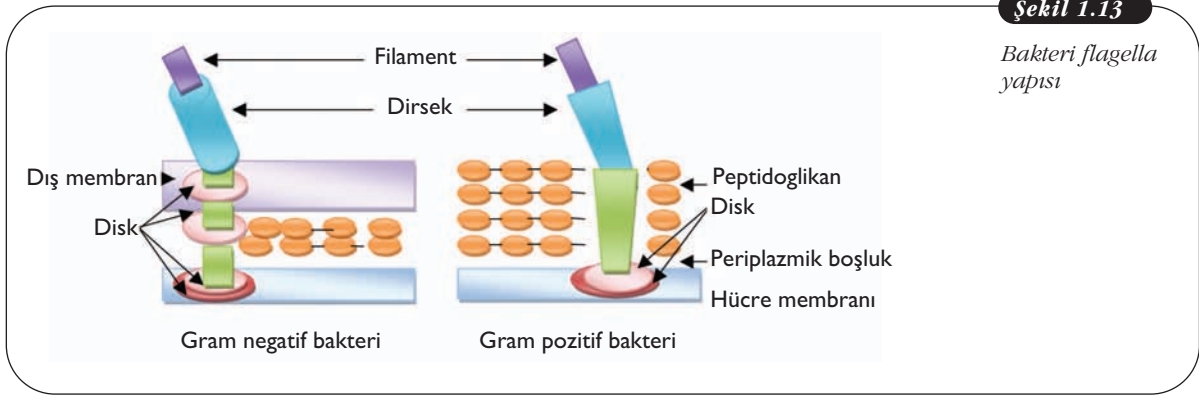
S tabaka (Surface layer)

Bazı bakterilerde hücre duvarı dışında, hücreyi kuşatan organize olmuş, hücre duvarına sıkı olarak bağlı, kolaylıkla uzaklaştırılmayan protein veya glikoprotein yapısında ekstrasellüler substanslardır. Bu substansın tam fonksiyonu bilinmemekle beraber bakterilerin dış etkilerden korunması ve virulensi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Flagella (Flagellum)

Bazı bakterilerde boyu (3-20 µm), kalınlığı (20nm) ve sayısı (1-100) bakteri türlerine göre farklılık gösterebilen protein özellikte olan bir hareket organelidir. Flagella proteini H antijeni olarak adlandırılır ve bakteri türlerine göre değişiklik gösterir, bu nedenle serotiplendirmede yararlanır. Flagellalar hücre duvarı ve sitoplazmik membranda bulunan bazal granül (blefaroplast) adı verilen ve disklerden oluşan bir yapıdan orjin alırlar. Hücre duvarı dışına çıkınca bir dirsek oluşturarak

dalgalı bir tarzda devam ederler. Gram-negatif bakterilerde bazal granüllerde iki çift disk bulunmasına karşın, Gram-pozitif bakterilerde peptidoglikanın sağlamlığı nedeniyle sadece bir çift disk bulunur (Şekil 1.13). Bakterinin aktif hareketinde rol oynar ve bakterilerin besin maddelerine yaklaşmasını ve bazı maddelerden uzaklaşmasını sağlar.



Bakteriler kendilerinde flagella bulunmasına ve konumuna göre başlıca 3 temel gruba ayrılır

1. Atrik: Hiç flagella olmaması.
Örn; *Bacillus anthracis*
2. Monotrik Flagellaların tek kutupta bir tane olarak bulunması.
Örn; *Vibrio cholerae*
3. Multitrik: Bakterilerde birden fazla flagella bulunması.
 - a. Amfitrik: Flagellaların iki kutupta birer tane olarak karşılıklı olarak bulunması
Örn; *Spirillum minus*
 - b. Lofotrik :Flagellaların tek veya iki kutupta bir demet halinde bulunması
Örn; *Pseudomonas aureginosa*
 - c. Peritrik: Flagellaların bakterinin her tarafında bulunması.
Örn; *Escherihia coli*, *Proteus vulgaris*
 - d. Monolateral: Flagellaların bakterinin bir yanında bulunması.
Örn; *Selenomas ruminantium*

Aksial Flament (Endoflagella)

Spiroketlerde (Örn. *Leptospira* spp) bulunan, sayısı 2-100 adet arasında bulunan protein özellikle olan protoplazmik silindir ile dıştaki kılıf arasında yer alan bir hareket organelidir.

Fimbria (Pilus)

Bazı bakterilerde, özellikle gram negatif bakterilerde sitoplazmik membrandan orjin alan protein özellikle olan filamentöz uzantılardır. Bu uzantılar fimbria (çoğulu fimbriae) ve pilus (çoğulu pili) olarak isimlendirilmektedir. Bu iki kelime birbirinin yerine kullanılabilen ise de bakterilerin hücrelere tutunarak kolonize olmasında ve infeksiyon oluşturmada rol oynayanlara fimbria (Örn; Buzağı ve kuzular da ishallerine neden olan enterotoksijenik *E.coli*lerin K99 fimbriası), bakteriler arasında genetik madde aktarımında rol oynayanlara ise pilus (seks pilusu) denilmesi tercih edilmektedir. Fimbria ile pilus karşılaştırılacak olursa, fimbriaların piluslara göre boyu ve kalınlığı az, sayıları ise çok fazladır.

İç Yapılar

İç yapılar ise hücre membranı, sitoplazma, mesosom, ribozom, sitoplazmik granül, pigment, endospor, çekirdek, plazmid, transpozon ve faj (profaj) dan oluşmaktadır.

Hücre Membranı (Sitoplazmik Membran, Plasma Membranı)

Hücre membranı, hücre duvarının altında, sitoplazmayı saran, kalınlığı 5-10 nm arasında değişen, temel olarak fosfolipid ve proteinden ve çok az miktarlarda karbonhidratdan oluşan bir zarıdır. Mikoplazmalar diğer bakterilerden farklı olarak hücre membrnında sterol içerir.

Hücre membranı sitoplazmayı sarar ve korur, selektif permeabilite ve osmotik basıncın ayarlanmasında, metabolizmada birtakım enzimatik reaksiyonların sağlanmasında, hücre bölünmesinde ve sporulasyonda rol oynar.

Sitoplazma

Bakteriyel sitoplazma saydam, kolloidal karakterde olup organik ve inorganik maddelerden oluşmuştur. Sitoplazma içinde mesosom, ribozom, sitoplazmik granül, pigment, endospor, çekirdek, plazmid, transpozon ve faj bulunmaktadır.

Mesosomlar

Sitoplazmik membrandan orjin alırlar. Yapıları vesiküler veya lamellar bir karakter gösterir. Bakterilerde DNA replikasyonunda, hücre bölünmesinde ve sporulasyonda rol oynarlar.

Ribosomlar

Ribozomların yapısı, protein ve rRNA dan oluşmuştur, 70S karakterindedir, sayısı ve büyüklükleri (10-20 nm) türlere göre değişebilmektedir. Özellikle protein sentezinde rol oynarlar.

Sitoplazmik Granüller (Sitoplazmik İnklüzyon Cisimcikleri)

Sitoplazmada farklı yapıda ve fonksiyona sahip çeşitli granüller (polisakkarid, lipid, sülfür ve metakromatik (Volutin, Babes-Ernst) granüller) bulunmaktadır. Bu granüller bakterilerde enerji ve besin kaynağı olarak görev yaparlar.

Pigmentler

Bazı bakteriler hücre içinde kalan (suda erimeyen) veya hücre dışına çıkan (suda eriyebilen) renkli maddeler (pigment) oluştururlar. Bakteriyel pigmentler çok farklı kimyasal yapıda (Örn: karotenoidler, melaninler vs) ve renkte (Örn; sarı, kırmızı vs.) olabilir. Hücre içinde kalan pigment oluşturan bakterilerin, besiyerinde oluşturdukları kolonileri, oluşturdukları pigmentin özel renginde (Örn; *Staphylococcus aureus*, sarı, *Serratia marcescens* kırmızı koloni oluşturur), hücre dışına çıkan pigment oluşturan bakterilerin ise, üretildikleri besiyeri, oluşturdukları pigmentin özel rengindedir (Örn; *Pseudomonas aeruginosa* nın üretildiği besiyeri yeşil mavimsi renktedir).

Sporlar (Endosporlar)

Bazı patojen bakteriler (*Bacillus* spp., *Clostridium* spp.) optimal olmayan koşullarda, örneğin besin maddelerinin azaldığı ortamlarda hücre içinde vejetatif bakterinin yapısından farklı bir yapıda olan spor oluştururlar (sporulasyon, sporogenesis). Spor oluşumu bakterinin canlılığını sürdürebilmesi için aldığı yeni bir formdur. Bakteri sporu bir üreme elementi değildir. Sporda nükleus, sitoplazma, sitoplazmik membran, hücre duvarı, korteks, dış membran ve bazılarında dış muhafaza (ekzosporium) kısımları bulunmaktadır. Özellikle korteks sporun fiziksel ve kimyasal maddelere karşı direncinde en önemli kısımdır. *B. anthracis*'in sporları 100 °C de rutubetli ısıyı 2 saat direnç gösterebilir ve doğa koşullarında da 40-50 yıl canlılıklarını ve infektivitesini muhafaza edebilirler. Sporun şekli, büyüklüğü, konumu bakteri türlerine göre farklılık gösterir. Örn; *Bacillus* spp.'inde sporların çapı basilin genişliğinden küçük, *Clostridium* spp.'inde sporların çapı basilin genişliğinden büyüktür ve şişkinlik yaparak basile raket, limon, davul tokmağı gibi görüntü verir.

Sporlar sentral (*B. anthracis*), terminal (*C. tetani*), subterminal (*C. botulinum*) ve lateral (*B. laterosporus*) konumda bulunabilir. Bakterilerde sporulasyon türlere ve koşullara bağlı olarak 5-13 saat sürebilir. Spordan tekrar vejetatif bakteri uygun koşullarda aktivasyon, germinasyon ve dışarı doğru gelişme aşamalarını geçirerek oluşur.

Bakterilerde spor oluşumu nasıl gerçekleşir ve bazı patojen bakterilerin spor oluşturmalarının epidemiyolojik açıdan önemi nedir?



SIRA SİZDE

2

Bakterilerde spor bir üreme aracı değildir, mantarlardaki spor ile karıştırılmamalıdır



DİKKAT

Çekirdek (nükleoid)

Bakterilerde çekirdek, ökaryotik hücre çekirdeklerinden yapısal olarak farklıdır, nükleus membranı ve nükleolusu yoktur bu nedenle nükleoid olarak isimlendirilir. Tek bir kromozomdan ibaret olan çekirdek birbirlerine helezoni tarzda sarılmış iki adet polinükleotid iplikçığinden oluşmuş tek ve sirküler bir DNA molekülüdür ve yaklaşık 1mm uzunluğundadır. Son yıllardaki araştırmalar *Borrelia burgdorferi* nin DNA sının lineer olduğunu göstermiştir. Bakterideki bütün genetik olayları ve metabolizmayı idare eder

Plasmidler

Plasmidler bazı bakterilerde kendi kromozomu dışında ekstrakromozomal olarak bulunan bakteri kromozomunun yaklaşık %1-2 si kadar olan, çift iplikçikli, sarmal ve sirküler DNA sekanslarıdır. Plasmidler bakteri kromozomundan bağımsız olarak çoğalabilirler ve bakteriden bakteriye aktarılabilirler. Bakterilerde hem morfolojik, hemde fonksiyon olarak farklı plasmidler bulunmaktadır. Plasmidler, bakterilere antibiyotik dirençliliği, metabolik özellikler, virulens özellikler vb. kazandırabilir.

Transpozonlar(Tn)

Transpozonlar kısa DNA sekansları olup, bakterilerin kromozomlarında ve/veya plasmid'lerinde bulunurlar ve yer değiştirebilirler. Plasmidlerden farklı olarak bağımsız olarak çoğalamazlar. Bakterilerin antibiyotiklere dirençliliğinde rol oynar.

Bakteriyofaj: Konakçısı bakteri olan ve bakteriyi infekte eden virüsü ifade eder

Bakteriyofajlar

Bazı **bakteriyofajlar** (fajlar) bakteri DNA'sına integre olabilir ve kromozomun bir devamı haline gelerek onunla birlikte replike olur. Bu tür fajlara profaj denir.

DİKKAT



Bakteriler yapısal özellikler bakımından farklılıklar gösterebilmekte, dolayısıyla bakterileri ve bakteri komponentlerini görebilmek için uygun olan boyama yöntemleri (Örn; Gram, Ziehl Neelsen, Stamp, kapsül, spor, flagella boyama vs.) seçilmelidir, aksi takdirde bakteriler ve bakteri komponentleri görülemez.

BAKTERİLERİN BESLENMESİ

Bakterilerin üreyebilmesi ve yaşayabilmesi için beslenmesi gereklidir. Beslenme özelliği bakımından bakteriler arasında farklılıklar bulunmaktadır. Prototrof özellik gösteren bakteriler minimum seviyede besin maddelerinin bulunduğu ortamlarda, oksotrof özellik gösteren bakteriler ise vitamin, mineral vs gibi maddelerle zenginleştirilmiş ortamlarda üreyebilmekte ve yaşayabilmektedir.

Bir bakteri temel olarak C, H, O, N, S, P, K, Mg, Ca, ve daha az olarak Fe, Mn, Zn, Co, Cu, and Mo ihtiyaç duymaktadır. Bu elementler su, inorganik iyonlar, küçük moleküller ve makromoleküller şeklinde bulunurlar ve hücrelerde yapısal veya fonksiyonel rol oynarlar.

Bakterilerin Beslenme Tarzına Göre Sınıflandırılması

Bakterilerin beslenme tarzlarına göre sınıflandırılmasında temel olarak üç kriter dikkate alınmaktadır. Sınıflama karbon kaynakları, enerji kaynakları ve elektron kaynaklarına göre yapılmaktadır. Bakteriler gelişme için karbonun tek kaynağı olarak organik maddeler kullanırsa heterotrof, CO₂ kullanırsa ototrof, enerji kaynağı olarak radiant enerji (ışık) kullanırsa fototrof, organik ve inorganik maddeler kullanırsa kemotrof, elektron kaynağı olarak inorganik maddeler kullanırsa lithotrof, organik maddeler kullanırsa organotrof olarak isimlendirilmektedir. Birçok lithotrofik bakteri ototrofik, organotrofik bakteri ise heterotrofikdir. İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan bakterilerin çoğu kemoorganoheterotrof (C, enerji ve e- kaynağı organik) grubunda bulunmaktadır. Paratof mikroorganizmalar (bakteriler (riksitsialar, klamidialar), viruslar) kendileri için gerekli enerjiyi konakçı hücrenin biyosentez olayları sonu oluşan enerjiden sağlar. Saprotif mikroorganizmalar ise ihtiyaç duydukları maddeleri cansız, çürümüş organik maddelerden sağlar. Bu tür mikroorganizmaların doğadaki madde değişimine önemli katkısı olmaktadır.

DİKKAT



Bakteri türlerine göre besin ihtiyaçları ve beslenme özellikleri farklılık gösterebilmekte, o nedenle bakterilerin izolasyonunda bakterilerin ihtiyaçlarını karşılayabilecek uygun besiyeleri seçilmelidir aksi takdirde izolasyon gerçekleşmez

BAKTERİ METABOLİZMASI

Bakterilerin üremeleri ve yaşamaları için beslenmeleri ve bu nedenle de buldukları ortamlardan gerekli besin maddelerini almaları şarttır. Bakterilerin gıda maddelerinden yararlanabilmesi, bunların hücre duvarından ve sitoplazmik membrandan geçebilmesine bağlıdır. Dış ortamda veya çevrede bulunan ve hücreye yayarışlı maddelerin molekülleri genellikle büyük olduğundan hücre duvarından geçemezler. Bunların **aktif transport** ile geçebilecek düzeye indirilmeleri gereklidir. Bu görevi bakteriler tarafından sentezlenen ve dışarı verilen hidrolizan en-

Aktif transport: Molekül çapları büyük maddeler (protein, polisakkarid, lipid vs)'in hücreye alınması için enerji gerektiren ve permease denilen enzim sistemlerinin aracı olarak rol oynadığı transport tarzıdır.

zimler (ekzoenzim) yerine getirirler. Bakterilerin dışındaki ortamda ekzoenzimler yardımı ile hücre membranlarından geçebilecek boyutlara indirilen gıda maddeleri (protein, karbonhidrat, lipid vs.) içeri girdikten sonra da sitoplazma içinde ayrışmasına devam edebilir ve en küçük yapı taşlarına kadar ayrışabilirler. Lüzumlu olduğu durumlarda da fazla ayrışmadan üniteler halinde hücre içinde ve özel depolarda tekrar kullanılmak üzere muhafaza edilebilirler. Sitoplazma da devam eden ayrışma olaylarını içeride kalan ve dışarı bırakılmayan endoenzimler katalize ederler (disimilasyon - katabolizma). Bakteriler, sonradan bu yapı taşlarından veya daha büyük moleküllerden, kendilerine lüzumlu olan maddeleri (protein, polisakkarid, lipid, enzim vs.) sentezlerler (asimilasyon-anabolizma). Bu iki ve çok önemli olan ve birbirlerini izleyen biyokimyasal olay bakterilerde metabolizmayı oluşturur. Metabolik olaylar birçok enzimlerin katalitik etkisiyle basamak basamak ve ardışık olarak yönetilir. Enzimlerde oluşabilecek en küçük değişimler bu çok önemli ve seri biyokimyasal olayların bozulmasına veya yön değiştirmesine neden olurlar. Üremekte olan hücrelerde metabolizma olayları devamlıdır. Katabolizma ile sentez için gerekli enerji ve yapı taşları hazırlanır, anabolizma ile tükenmiş olan ve gerekli bileşikler sentezlenir. Katabolizma olaylarında gıda maddelerinin ayrışması sonu önemli miktarda enerji açığa çıkar (ekzergonik reaksiyonlar) ve bu enerji yüksek enerji bağları halinde, ADP (adenosin difosfat) tarafından alınarak kendi fosfat bağları arasında muhafaza edilir. Sentez için gerekli olan enerji bu bağlardan sağlanarak yürütülür (endorganik reaksiyonlar). Enerji verici reaksiyonlarda ADP nin ATP haline çevrilmesi yani yüksek enerjili bir fosfat bağı oluşturulması ile enerji bu fosfat bağında depolanır. Hücre içersindeki enerji isteyen sentezler esnasında yine özel enzimler aracılığı ile ATP, ADP haline çevrilir. Bu esnada çözülen yüksek enerjili bir fosfat bağından açığa çıkan enerji sentez için sarf edilir.

Bakterilerde enerji oluşturan oksidasyon- reduksiyona dayalı biyokimyasal olaylara solunum (respirasyon) denir. Solunum sonucunda hem metabolizma için gerekli enerji sağlanır ve hemde okside olan enerji kaynağı bileşikler hücre yapı taşlarını sentezinde kullanılır.

Solunum başlıca iki tarzda oluşmaktadır;

1. Aaerobik solunum: İnorganik ve organik substratların okside olduğu ve son H alıcısı olarak moleküler O_2 'nin kullanıldığı solunum tarzıdır. Aerobik ve bazı fakültatif bakterilerde görülür
2. Anaerobik solunum: H alıcısı olarak O_2 dışındaki inorganik ve organik substratların kullanıldığı solunum tarzıdır. Fakültatif anaerobik ve anaerobik bakterilerde görülür. H alıcısı olarak organik substratların kullanıldığı anaerobik koşullardaki solunuma fermentasyon denir.

Gıda azlığı, kuruma, sporlanma, minimal ısının altında bulunma, mikrobiyostatiklerin etkisi vs. gibi diğer nedenler ile metabolizma azalacağı gibi donma olaylarında da tamamen durabilir.

Bu konu ile ilgili Hakkı Bilgehan'ın, Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi (İzmir: Barış Yay.,2002) adlı kitabında ayrıntılı bilgi bulabilirsiniz



K İ T A P

Karbonhidrat metabolizmasında glukozun ayrışması ne şekilde meydana gelir?



SIRA SİZDE

3

BAKTERİLERDE ÜREME

Bakteriler uygun besiyeri ve çevresel koşullar altında türlerine özgü bir süratle ürerler. Koşulların uygunluğu devam ettiği sürece buna paralel olarak çoğalmada sürekli olur. Ancak laboratuvarlarda bakterileri üretmede sınırlı miktarda besiyerleri kullanıldığından bakterilerin üremeleri kısıtlanır. Bakteriler üredikçe ortamdaki gıda maddeleri azalır ve tükenir. Optimal koşulların değişmesi (pH, oksijen, osmotik basınç, yüzey gerilimi vs) ve besiyerinde toksik metabolitlerin birikmesi, miktarı az olan besi yerinde üremeyi kısa bir süre sonra baskılar ve durdurur.

İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan bakteriler ortadan ikiye bölünmek suretiyle ürerler. Bölünme başlamadan önce bakteri iki kardeş hücreye yetecek kadar enzimleri gerekli diğer organik ve inorganik maddeleri hazırlar ve biriktirir. Bu işlemler yapılırken hücre içinde özellikle nukleer bölgede bir organizasyon görülür. Toplu halde bulunan nukleus orta bölgede uzamaya başlar. Nukleus sitoplazmik membrandaki özel yere (muhtemelen mesosom) bağlanarak replikasyona başlar. Replikasyon tamamlandıca hücre duvarından içeri doğru ve karşılıklı olarak bir septum oluşumu görülür. Buna sitoplazmik membranda iştirak eder ve septumlar içeri doğru uzayarak hücreyi ortasından iki kardeş hücreye ayırır. Bu iki hücre birbirinden ayrılarak tam bağımsız hale gelirler veya birbirlerine bitişik olarak kalırlar (Örn; *Streptococcus* spp.) Bölünme sonucunda bir bakteri hücrelerinden genotip ve fenotipleri birbirinin aynı olan iki yavru hücre oluşur.

Bakteriler optimal koşulları içeren sıvı ortamlarda katı besi yerlerinden daha çabuk ürerler. Üremenin hızı, mikroorganizma türüne özgü genetik bir karakter olmakla beraber, besi yerinin bileşimi ve çevresel koşullarla da yakından ilişkilidir. Bakteriler ikiye bölünmek suretiyle geometrik bir üreme ($2^0 2^1 2^2 2^3 2^4 2^5 \dots$) tarzı gösterirler. Bakteri popülasyonunda meydana gelen her bölünmeye generasyon ve iki generasyon arasında geçen zamana da generasyon süresi denir. Generasyon süresi bakterilerde çok değişiklik gösterir. *E. coli* de 35 dakika, *B. subtilis*, *S. aureus* da 43-47 dakika, *P. aeruginosa*, *C. botulinum* da 58 dakika olan generasyon süresi, *M. tuberculosis* de ≈ 12 saattir.

Bakterilerde üreme durumu başlıca 4 evre gösterir.

1. Latent dönem (lag fazı): Bu dönemde bakterilerde metabolizma artar, ancak bölünerek çoğalma başlamaz
2. Üreme dönemi (logaritmik(log) faz): Bu dönemde bakteriler kendi türlerine özgü bir generasyon süresi içinde ve belli aralıklarla bölünerek çoğalmaya başlarlar. Üreme dönemi belli bir süre devam eder ortamdaki optimal koşulların bozulması sonucu üreme yavaşlar.
3. Durma dönemi: Bu dönemde bozulan optimal koşullar değişmediği veya düzeltilmediği takdirde üreme durur. Durma dönemi uzadıkça bakterilerin morfolojik, kültürel ve fizyolojik özelliklerinde bazı değişimler meydana gelir.
4. Ölme dönemi Bu dönemde durma dönemi değişmedikçe bakteriler bu uygun olmayan koşullar altında ölür.

Katı ortama ekilen bakteriler, sıvı besiyerlerine oranla daha sınırlı bir üreme şansına sahiptirler.

Bakteri üremesinin ölçümü, standart bulanıklık tüpleri (Mc Farland) ile karşılaştırma, spektrofotometre ile optikal densite tayini, besiyerlerinde koloni sayma, selüloz filtreler ile sayma, boyalı preparatlarda mikroskop altında direkt sayma ve Petroff-Hause aparatında sayma teknikleri ile yapılabilir. Ölçüm birtakım bakteri-

yolojik çalışmalarda gereklidir. Örn; hayvanlarda deneysel bir infeksiyon oluşturmak için verilecek bakteri miktarının belirlenmesi, antibiyogram testlerinde bakteri yoğunluğunun ayarlanması vs. için ölçüm yapılır.

Bu konu ile ilgili Mustafa Arda'nın, Temel Mikrobiyoloji (Ankara: Medisan Yay.,2000) adlı kitabında ayrıntılı bilgi bulabilirsiniz



K İ T A P

Bakteride kromozom (DNA) replikasyonu neden gereklidir ve nasıl gerçekleşir?



S İ R A S İ Z D E

4

Bakteri türlerine göre generasyon süreleri farklılık gösterebilmekte, o nedenle bakterileri üretmek için ekim yapılan besiyerleri etüverde generasyon süreleri dikkate alınarak inkube edilmeli ve takip edilmeli, aksi takdirde generasyon süresi kısa olan bir bakteri, uzun süre inkube edilirse bakteri ölebilir, generasyon süresi uzun olan bir bakteri, kısa süre inkube edilirse bakteri yeterince gelişemez ve bakteri izolasyonu gerçekleşemez.



D İ K K A T

BAKTERİLERİN ÜREMELERİ ÜZERİNDE ETKİLİ FAKTÖRLER

Bakteriler buldukları ortamda optimal koşullar altında cins ve tür özelliklerine göre ürerler. Ancak bu optimal şartlar uzun bir süre devam etmez ve belli bir zaman sonra bakterilerin üremeleri sınırlanır ve ölürler.

Bakterilerin üremeleri üzerinde etkili faktörler;

Isı

Bakteriler belirli bir ısı limitleri (minimum ve maksimum) arasında üreyebilirler. Bu sınırlar arasında üremenin en iyi meydana geldiği ısı optimal ısı olarak kabul edilir. Bakteri türleri arasında optimal ısılar farklılık gösterebilir. Maksimal limitin aşılması halinde yalnız üremede durma meydana gelmez, ısının yüksekliğine bağlı olarak bakterilerde ölümler başlar. Buna karşılık minimum ısı sınırının geçilmesi halinde üremede duraklama meydana gelir. Ölümler ısının düşme hızına ve ısı derecesine bağlı olarak çok az olur. Patojenik bakteriler için optimal ısı adapte oldukları konakçının vücut ısısıdır.

Bakteriler üreme ısısı derecelerine göre temel olarak başlıca üç gruba ayrılırlar;

- Psikrofilik (soğuk seven) bakteriler: Bu bakteriler 0-20 °C da gelişebilir, ≤ 15 °C de optimal gelişme gösterirler. Toprak,su deniz ve göllerde yaşayan bazı bakteriler ile balıklarda ve soğuk kanlı hayvanlarda hastalık oluşturan bakteriler bu bölüme girerler. Örn; *Aeromonas salmonocida*, *Bacillus psycrophilus*, *Chlamydomonas nivalis*
Psikrotrof bakteriler ise 0-35 °C de gelişebilir, 20-30 °C de optimal gelişme gösterirler Örn; *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*
- Mezofilik (ılık seven) bakteriler: Bu bakterilere 20-45 °C'ler arasında optimal gelişme gösterirler. İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan bakterilerin büyük bir kısmı bu gruba dahildir.Örn; *Eshericha coli*, *Neisseria gonorrhoeae*
- Termofilik (sıcak seven) bakteriler: Bu bakteriler genellikle 55-65 °C'de üreme yeteneğine sahiptirler. Bu tür bakterilere sıcak su kaynaklarında, gübrelerde ve tropikal ülkelerde rastlamak mümkündür. Örn; *Geobacillus stearothermophilus*, *Thermus aquaticus*
Hipertermofilik bakteriler ise 80-113 °C de optimal gelişme gösterirler. Örn; *Sulfolobus spp*



Çeşitli ortamlarda bulunan bakterileri öldürmek için ısı işlemi uygulanır. Bu ısı işleminin etkili olabilmesinde ne gibi faktörler rol oynayabilir ?

Radyasyon

Ultraviyole ışınları dalga boyu yüksek, kuantum enerjisi düşük iyonizan olmayan ışınlardır ve derinlere girebilme özellikleri yoktur. Bu ışınların bakteri, mantar, spor, virüs, ve hücreler üzerine mutajenik (mutasyon oluşturucu) ve letal(öldürücü) etkileri vardır. Pratikte ultraviyole ışınları cıva buharlı lambalardan elde edilmektedir. Hastanelerde operasyon odaları, hücre kültürü laboratuvarları gibi yerlerde yüzeysel sterilizasyon amacıyla kullanılır. Güneş ışınları (UV ışınları) mikroorganizmaları hem mutasyonlar oluşturarak ve hem de ısıyla etkiler. Dalga boyu düşük, kuantum enerjisi yüksek x ve γ ışınları ise iyonizan ışınlardır ve derinlere girebilme özellikleri bulunmaktadır. Bu ışınlarında bakteri, mantar, spor virüs ve hücreler üzerine mutajenik ve letal etkileri vardır. Bu ışınlardan pratikte mutasyonlar oluşturmakta ve paketlenmiş gıdaları sterilize etmekte yararlanılmaktadır.

Yüzey Gerilimi

Metabolizma olaylarının normal meydana gelebilmelerinde bakterilerin bulunduğu sıvı ile bakteri yüzeyi arasındaki moleküler gerilimin dengede bulunması gereklidir. Bakteriye temas eden sıvı yüzeyindeki moleküllerin oluşturduğu gerilim çok fazla olursa oluşan kuvvetli moleküler membran nedeniyle sıvı ortamdan bakteriyeye gıda maddelerinin girişi çok güç olur ve bakteri beslenemez. Aksine bu moleküler gerilim zayıf olursa sıvı ile bakteri yüzeyi birbirine çok sıkı temas ederek sıvı içindeki maddelerin bakteri yüzeyinde toplanmasına neden olur. Buna bağlı olarak bakteri içinden dışarı ve dışardan içeri gıdaların akışı güçleşir ve bakteri yine beslenemez.

Osmotik Basınç

Bakteriler içinde üredikleri sıvı besinin osmotik basıncı ile kendi hücre içindeki osmotik basıncı arasında bir denge kurmuşlardır. Bu denge yarı geçirgen hücre membranları yardımı ile regüle edilir ve devam ettirilir. Bakteri içindeki osmotik basınç bakteri türlerine göre değişmek üzere 5-20 atmosfer arasında bulunmaktadır. Bakterilerin en iyi üreyebildikleri ortamın osmotik basıncı bakteri içindeki ile aynı veya çok az farklıdır (izotonik). Böyle ortamlarda bakteri zarlarından giriş ve çıkış kolaylıkla olur ve bakteri gelişmesine ve üremesine devam eder. Eğer ortamın osmotik basıncı azalmış ise (hipotonik) böyle durumlarda dışardan bakteri içine fazla sıvı girerek bakteriyi şişirir ve olay devam ederse bakteriyi patlatır (plazmoptiz). Eğer ortamın osmotik basıncı artmış ise (hipertonik) bakterinin içinden dışarı fazla sıvının çıkması sitoplazmik membranın hücre duvarından ayrılarak büzülmesine ve ortada toplanmasına neden olur. Osmotolerant bakteriler osmotik konsantrasyonun geniş sınırları içinde ürer. Örn: *Staphylococcus aureus*. Halofil bakteriler ise NaCl'in yüksek düzeylerinde (yaklaşık 0.2 M üzerinde) üreme gösterir. Örn; *Halobacterium* spp.

Hidrostatik Basınç

Bakteriler hücre duvarının sert ve dayanıklı olması nedeniyle hidrostatik basınçlara karşı oldukça dirençlidirler. Barofilik bakteriler (Örn; *Photobacterium profundum*) yüksek hidrostatik basınçlarda daha iyi ürer.

Rutubet ve Kuruma

Bakterilerin üretildiği besiyerlerinin konulduğu etüvlerin havasındaki rutubet çok önemlidir. Optimum düzeyde rutubet olmayan ortamlarda sıvı besiyerlerinden su buharlaşır ve besiyerinde bulunan maddelerin konsantrasyonu artar, katı besiyerlerinde ağırdan gıda maddelerinin difüzyonla bakteriye ulaşması güçleşir, ayrıca bakteri su kaybeder (bakterilerin içinde %70-90 oranında su bulunur) ve metabolizması bozulur, dolayısıyla böyle ortamlar bakteri üremesi üzerine olumsuz etki yapar. Su bakterilerin üremesinde, gıda maddelerinin içeri girişinde ve içerde biriken maddelerin ve diğer metabolitlerin dışarı çıkışında ve metabolik olaylarda çok önemli göreve sahiptir. Bakterilerin kurumaya karşı dirençleri farklılık gösterebilir. Bazılarının (*Leptospira* spp., *Pasteurella* spp.) çok çabuk ölmesine karşın bir kısım bakteriler (*Staphylococcus* spp., *E.coli*, *Mycobacterium* spp. sporlar, mantarlar vs.) daha dayanıklıdırlar.

Oksijen

Bakteriler üremeleri için oksijene olan ihtiyaçlarına göre temel olarak 4 gruba ayrılmaktadır.

1. Aerobik bakteriler: Bu bakteriler havada bulunan orandaki kadar oksijen içeren ortamlarda ürerler. Örn; *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*.
2. Mikroaerofil bakteriler; Bu mikroorganizmalar havada bulunan orandaki kadar oksijen içeren ortamlarda üreyemez, oksijen oranı %2'ye kadar düşürülmüş, karbondioksit oranı %5-10 ' yükseltilmiş ortamlarda ürerler. Örn; *Brucella abortus*, *Campylobacter jejuni*
3. Anaerobik bakteriler: Bu bakteriler oksijenin bulunmadığı ortamlarda ürerler. Anaerobik bakteriler oksijene toleranslarına göre 2 gruba ayrılmaktadır
Obligat (zorunlu) anaerob bakteriler; Bu bakteriler oksijenli ortamda üreyemedikleri gibi bu ortamda çok kısa süre canlılıklarını koruyabilirler. Örn; *Bacteroides nodosus*
Aerotolerant anaerobik bakteriler: Bu bakteriler oksijensiz ortamda iyi ürerler, ancak oksijenli ortamda uzun süre canlılıklarını koruyabilirler. Örn; *Clostridium perfringens*
4. Fakültatif anaerobik bakteriler: Bu bakteriler hem aerobik ve hem de anaerobik koşullarda ürerler. Örn; *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

Redoks Potansiyeli (Oksidasyon - Redüksiyon Potansiyeli)

Oksidasyon redüksiyon elektron transferine dayalı oksidasyon (elektron kaybı) ve redüksiyon (elektron kazanma)'un birlikte gerçekleştiği bir olaydır. Bir ortamda oksidan maddelerin fazlalığında oksidasyon redüksiyon potansiyeli yüksek, redüktan maddelerin fazlalığında ise oksidasyon redüksiyon potansiyeli düşüktür. Anaerob bakteriler düşük bir O-R potansiyeline gereksinim duyarlar.

Hidrojen İyon Konsantrasyonu (pH)

Bakterilerin üremeleri için besiyerinin pH'ının optimal sınırlar içinde bulunması gereklidir. Minimal ve maksimal pH derecelerine yaklaşıldıkça üreme azalır ve durur. Bakterilerin optimal pH limitleri oldukça değişiktir. Asidofilik bakteriler (Örn; *Lactobacillus* spp., *Acetobacter* spp.) pH 0.0 - 5.5, nötrofilik bakteriler pH 5.5 - 8.0, alkalofilik bakteriler (Örn; *Mycoplasma* spp., *Vibrio* spp.) ise pH 8.0 - 11.5 de ürer. Birçok patojen bakteri nötr ortamda (pH 7.0-7.4) optimal üreme gösterir.

Bakteri türlerine göre özellikle optimal üreme ısısı, üreme pH'ı, oksijen gereksinimleri vs. farklılık gösterebilmekte, o nedenle izolasyonda bu özellikler mutlaka dikkate alınmalıdır, aksi takdirde izolasyon gerçekleşmez.



DİKKAT

Özet



Bakterilerin sınıflandırılması ve isimlendirilmesindeki esasları açıklamak.

Bakteriler canlılar aleminde prokaryot grubunda bulunmaktadır. Bakterilerin sınıflandırılmasında, fenotipik, kemotaksonomik (analitik) ve genotipik sınıflandırma tarzları kullanılmaktadır. Bu sınıflandırmalar içinde en güvenilirini genotipik sınıflandırmadır. Bir sınıflandırma şeması alem, bölüm, sınıf, takım, aile, cins, tür şeklindeki hiyerarşik sırada en büyük ve genel olan alem ile başlar, en küçük ve en özel olan tür ile sona erer. Bakteriler binomial sisteme göre isimlendirilmektedir. Bakterilerin bilimsel isimleri genellikle iki kelimededen oluşmakta ve italik yazılmaktadır. İlk kelime cins (genus) ismini gösterir ve ilk harfi büyük olarak yazılır. İkinci kelime ise, tür (species) ismi olup küçük harfler ile yazılır



Bakterilerin morfolojik ve yapısal özelliklerini tanımlamak ve karşılaştırmak.

Bakteriler S-, R-, M- ve L- tipi olmak üzere temel olarak 4 tip koloni oluştururlar. Bakteriler mikroskopik morfoloji özelliklerine göre temel olarak yuvarlak (kok), çomak(basil) ve sarmal (spiral) şeklindeki bakteriler olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Ayrıca pleomorfik bakterilerde bulunmaktadır. Bakterilerin büyüklükleri bakteri türlerine göre değişmekle birlikte 0.2 -20 (µm) arasında değişmektedir. Bakterilerin dış yapıları hücre duvarı, kapsül, mukoid/yapışkan tabaka (slime layer), S- tabaka (surface layer), flagellum, aksial filament, fimbria (pilus) dan oluşmaktadır. Bu yapılar bakterinin dış etkilerden korunma, antijenite, virulens, toksijenite, çeşitli substansların bağlanması vs gibi özellikler ile ilişkilidir. İç yapılar ise hücre membranı (sitoplazmik membran), mesosom, ribozom, sitoplazmik granül, pigment, endospor çekirdek, plazmid, transpozon ve faj dan oluşmaktadır.



Bakterilerin beslenme ve metabolizma özelliklerini açıklamak.

Bakterilerin üreyebilmesi ve yaşayabilmesi için beslenmesi gereklidir. Beslenme özelliği bakımından bakteriler arasında farklılıklar bulunmaktadır. Prototrof özellik gösteren bakteriler minimum seviyede besin maddelerinin bulunduğu ortamlarda, oksotrof özellik gösteren bakteriler ise vitamin, mineral vs gibi maddelerle zenginleştirilmiş ortamlarda üreyebilmekte ve yaşayabilmektedir. Bakterilerin beslenme tarzlarına göre sınıflandırılmasında temel olarak üç kriter dikkate alınmaktadır. Sınıflama karbon kaynakları, enerji kaynakları ve elektron kaynaklarına göre yapılmaktadır. İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan bakterilerin çoğu kemoorganoheterotrof (C, enerji ve e- kaynağı organik) grubunda bulunmaktadır. Üremekte olan hücrelerde metabolizma olayları devamlıdır. Katabolizma ile sentez için gerekli enerji ve yapı taşları hazırlanır, anabolizma ile tüketilmiş olan ve gerekli bileşikler sentezlenir. Bakterilerde enerji oluşturan oksidasyon- reduksiyona dayalı biyokimyasal olaylara solunum (respirasyon) denir. Solunum başlıca aerobik ve anaerobik olmak üzere iki tarzda olmaktadır



Bakterilerin üremelerini ve üremeleri üzerinde etkili faktörleri tanımlamak.

Bakteriler ikiye bölünmek suretiyle geometrik bir üreme ($2^0 2^1 2^2 2^3 2^4 2^5 \dots$) tarzı gösterirler. Bakteri popülasyonunda meydana gelen her bölünmeye generasyon ve iki generasyon arasında geçen zamana de generasyon süresi denir. Generasyon süresi bakterilerde çok değişiklik gösterir. Bakterilerde üreme durumu başlıca latent, üreme, durma ve ölme olmak üzere 4 evre gösterir. Bakterilerin üremeleri üzerinde ısı, radyasyon, yüzey gerilimi, osmotik basınç, hidrostatik basınç, rutubet ve kuruma, oksijen, oksidasyon reduksiyonu potansiyeli, pH, gibi faktörler etkili olmaktadır. Bakteriler üreme ısısına göre psikrofil, mezofil, termofil, oksijen ihtiyacına göre aerob, mikroaerofil, anaerob (obligat, aerotolerant), fakültatif anaerob, üreme pH'ına göre asidofil, nötrofil ve alkalofil olarak grublandırılmaktadır.

Kendimizi Sınyalım

- Aşağıdakilerden hangisi sınıflandırmada alemden (kingdom) sonraki doğru bir hiyerarşik sıralamadır?
 - Sınıf, bölüm, takım, aile, cins, tür
 - Bölüm, takım, sınıf, aile, cins, tür
 - Bölüm, sınıf, takım, aile, cins, tür
 - Bölüm, aile, sınıf, takım, cins, tür
 - Sınıf, bölüm, aile, takım cins, tür
- Aşağıdakilerden hangisi M tipi koloni oluşturmaktadır?
 - Bacillus anthracis*
 - Salmonella pullorum*
 - Mycoplasma mycoides*
 - Escherichia coli*
 - Klebsiella pneumoniae*
- Aşağıdakilerden hangisi mikroskopik incelemede bipolar görülür?
 - Salmonella* spp.
 - Clostridium* spp.
 - Campylobacter* spp.
 - Pasteurella* spp.
 - Staphylococcus* spp.
- Aşağıdakilerden hangisi asidorezistans özelliğe sahiptir?
 - Streptococcus* spp.
 - Mycobacterium* spp.
 - Leptospira* spp.
 - Listeria* spp.
 - Neisseria* spp.
- Aşağıdakilerden hangisi hücre duvarına sahip **değildir**?
 - Corynebacterium* spp.
 - Clostridium* spp.
 - Pasteurella* spp.
 - Mycobacterium* spp.
 - Mycoplasma* spp.
- Aşağıdakilerden hangisi spor oluşturur?
 - Brucella abortus*
 - Bacillus anthracis*
 - Mycoplasma bovis*
 - Mycobacterium tuberculosis*
 - Staphylococcus aureus*
- Patojen bakterilerin çoğu hangi beslenme tarzına sahiptir?
 - Kemolithoototrof
 - Kemolithoheterotrof
 - Kemoorganoheterotrof
 - Fotoorganoheterotrof
 - Fotolithoototrof
- Aşağıdakilerden hangisinin generasyon süresi en uzundur?
 - Escherichia coli*
 - Staphylococcus aureus*
 - Pseudomonas aeruginosa*
 - Clostridium botulinum*
 - Mycobacterium tuberculosis*
- Optimal üreme ısı ≤ 15 °C olan bakterilere ne ad verilir?
 - Mezofil
 - Termofil
 - Psikrofil
 - Halofil
 - Barofil
- Aşağıdakilerden hangisi mikroaerofil bakteridir?
 - Bacillus anthracis*
 - Staphylococcus aureus*
 - Clostridium perfringens*
 - Mycobacterium tuberculosis*
 - Campylobacter jejuni*

Kendimizi Sınavalım Yanıt Anahtarı

1. c Yanıtınız yanlış ise “Bakterilerin Sınıflandırılması ve İsimlendirilmesi” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
2. e Yanıtınız yanlış ise “Bakterilerin Makroskopik ve Mikroskopik Morfolojisi” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
3. d Yanıtınız yanlış ise “Bakterilerin Makroskopik ve Mikroskopik Morfolojisi” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
4. b Yanıtınız yanlış ise “Bakterilerin Anatomik Yapısı” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
5. e Yanıtınız yanlış ise “Bakterilerin Anatomik Yapısı” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
6. b Yanıtınız yanlış ise “Bakterilerin Anatomik Yapısı” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
7. c Yanıtınız yanlış ise “Bakterilerin Beslenmesi” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
8. e Yanıtınız yanlış ise “Bakterilerin Üremesi” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
9. c Yanıtınız yanlış ise “Bakterilerin Üremesi Üzerinde Etkili Faktörler” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
10. e Yanıtınız yanlış ise “Bakterilerin Üremesi Üzerinde Etkili Faktörler” konusunu yeniden gözden geçiriniz.

Sıra Sizde Yanıt Anahtarı

Sıra Sizde 1

Genotipik sınıflandırmada temel alınan genetik yapı sağlam,değişmez (stabil) bir özellik gösterir, oysa diğer sınıflandırma tarzlarında dikkate alınan özellikler veya kriterler birtakım faktörlerden etkilenebilir ve değişken bir özellik gösterebilir.Genotipik sınıflandırmada G+C/DNA oranının saptanmasına, nükleik asit hibridizasyonuna, 16S rRNA sıralarının analizine veya bakteriden bakteriye gen aktarımına dayalı yöntemler kullanılmaktadır. Günümüzde 16S rRNA gen sırası karşılaştırmaları, prokaryotların filogenetik ilişkisinin belirlenmesinde en güvenilir standart (gold standart) olarak kabul edilmektedir.

Sıra Sizde 2

Birtakım maddeler sporulasyonu uyarır ve basilin içinde karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılan polibeta hidroksibutirik asit birikir,daha sonra sırasıyla kromozomda uzama görülür,kromozom spor oluşacak bölgeye yerleşir, hücre membranından içeri doğru karşılıklı ve iki tabakalı septum uzaması başlar ve bu septum kromozomu sitoplazmadan ayırır, ön spor şekillenir sonra korteks, dış membran ve bazı türlerde ekzosporium oluşur.

Sporlar dış ortamda uzun süre canlı kalabilir, Örn; *B. anthracis*'in sporları toprakta, sulara ve merada 50-60 yıl canlı kalabilmekte, dolayısıyla bu yerler infeksiyon kaynağı olarak önemli bir rol oynamaktadır.

Sıra Sizde 3

Glukozun ayrışması sırasında bir seri biyokimyasal reaksiyonlarından sonra bir ara temel bir ürün olan pirüvik asit oluşur. Glukozun pirüvik aside ayrışmasına glikolizis denir. Glikolizis aynı zamanda Embden Meyerhof yolu olarak isimlendirilir. Bakteriler glukozun oksidasyonu için glikolizise ilave olarak başka yollara sahip olabilir. Alternatif yollar pentoz fosfat yolu ve Entner Doudoroff yoludur. Pirüvik asit oluşumundan sonra bakterilerin özelliğine bağlı olarak aerobik ve anaerobik olmak üzere iki farklı tarzda ayrışma meydana gelir. Aerobik ayrışma Krebs siklusu (trikarboksilik asit siklusu veya sitrik asit siklusu) olarak isimlendirilmektedir. Bu ayrışmalardan sonra birtakım son ürünler oluşur ve bu son ürünler birtakım testler ile tespit edilebilir. Test sonuçları da bakterilerin identifikasyonuna yardımcı olur.

Sıra Sizde 4

Bakterilerde bölünme sonrası iki yeni hücre oluşacağı için ve o hücrelerde de birer tane kromozom olması gerektiğinden replikasyon gereklidir. Watson Crick modeli DNA yapısı (çift iplikçikli ve sarmal, dupleks) replikasyonun semi-konservatif bir şekilde olabileceğini ifade eder. Bu görüşe göre, her bir iplikçik kendine homolog ve komplementer olan diğer yeni iplikçığın sentezlenmesinde kalıp ödevini görür. DNA replikasyonu esnasında birtakım enzimler (topoizomeraz, helikaz, polimeraz, primaz, ligaz) ve proteinler rol oynar. Replikasyon genellikle sabit ve belli bir yerden başlayarak diğer uca doğru gider. İplikçikler birbirlerinden ayrılırken karşılarında birbirlerini tamamlayan ve homolog olan yeni iplikçik sentezlenmeye başlar ve bu işlem tüm iplik ayrılıncaya kadar devam eder. Böylece DNA replike olur ve oluşan çift iplikçiklerden biri (ki bunda parental DNA dan da bir iplikçik vardır) kardeş hücreye geçer, diğeri ise parental hücrede kalır. Bu nedenle F1 generasyonunda çift iplikçikte bir tane orjinal ve bir tanede yeni sentezlenen iplikçik bulunur.

Sıra Sizde 5

Uygulanan ısısının, bakterilerin maksimum üreme ısı limitlerinin üzerinde olup olmaması, süresi, kuru veya nemli ısı olup olmaması, bakteri özelliği (vejetatif, sporlu, asidorezistans, kapsüllü), bakteri sayısı, bakterinin bulunduğu ortamın bileşimi ve pH'ı, bakterinin üreme dönemi etkili faktörlerdir.

Yararlanılan Kaynaklar

- Arda, M. (2006). **Temel Mikrobiyoloji**, Ankara: Medisan Yayınları.
- Bilgehan H. (2002). **Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi**, İzmir: Barış Yayınları.
- Carter, G.R. (2004). **Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology**, Ames, Iowa, USA: Iowa State Press.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R. (2000). **Clinical Veterinary Microbiology**, London, UK: Mosby International Limited.
- Pommerville, J.C. (2004). **Alcama's Fundamentals of Microbiology**, London, UK: Jones and Barlett Publishers, Inc.
- Schleifer, K.H. (2009). Classification of Bacteria and Archaea: Past Present and Future, **Systematic and Applied Microbiology**, 32:533-542
- Talaro, K.P. (2008). **Foundations in Microbiology**, New York, USA: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2004): **Microbiology An Introduction**, San Francisco, USA: Pearson Education, Inc.
- Ustaçelebi, Ş. (1999). **Temel ve Klinik Mikrobiyoloji**, Ankara: Güneş Kitabev.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J. (2008). Prescott, Harley, and Klein's **Microbiology**, New York, USA: McGraw-Hill Companies, Inc.

2

Amaçlarımız

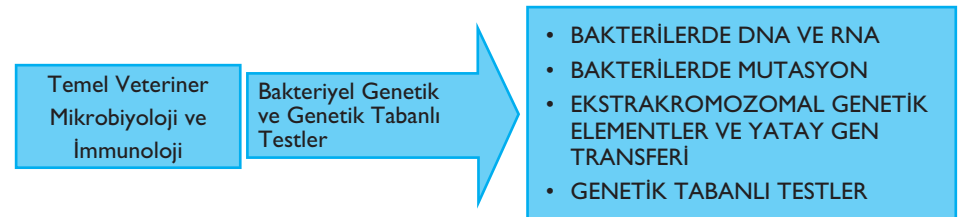
Bu üniteyi tamamladıktan sonra;

- 👁️ Bakterilerin kromozomal DNA'sının yapısını tanımlayabilecek,
- 👁️ Bakterilerin DNA'sının replikasyon, transkripsiyon ve translasyon şeklini açıklayabilecek,
- 👁️ Bakterilerde gen mutasyonu anlamını ve türlerini açıklayabilecek,
- 👁️ Kromozom dışı genetik yapılar ve önemlerini tanımlayabilecek,
- 👁️ Bakteriyolojide kullanılan önemli genetik tabanlı testlerin tanımlarını ve bazı uygulama alanlarını açıklayabileceksiniz.

Anahtar Kavramlar

- Bakteriyel DNA
- Replikasyon
- Transkripsiyon
- Translasyon
- Bakteri Mutasyonu
- Plazmid
- Transpozon
- Faj
- Plazmid profili
- DNA dizileme
- RFLP
- PFGE
- Hibridizasyon
- Polimeraz zincir reaksiyonu

İçindekiler

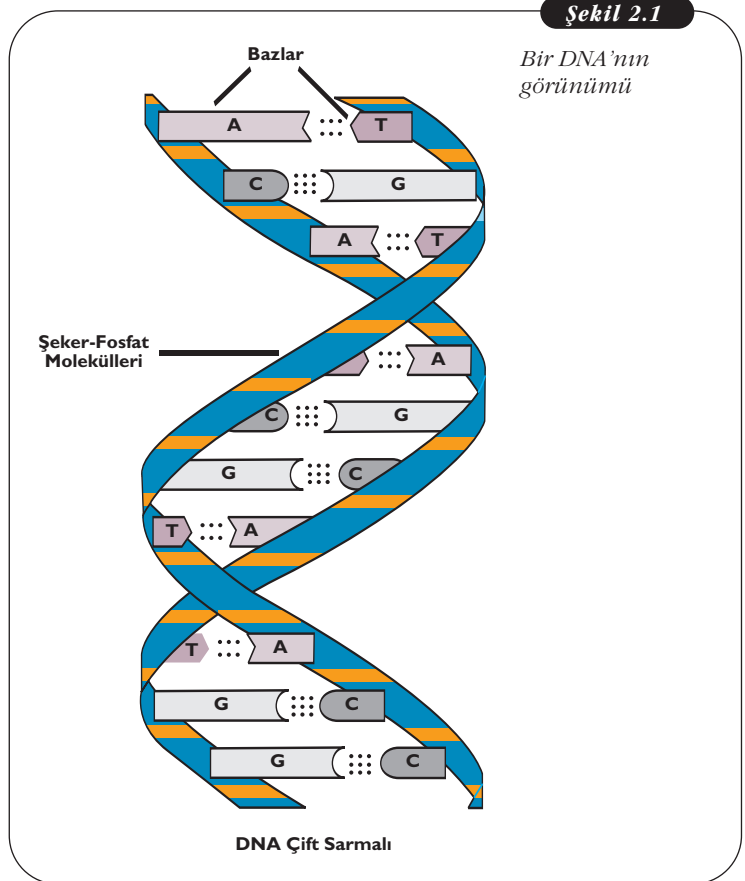


Bakteriyel Genetik ve Genetik Tabanlı Testler

BAKTERİLERDE DNA VE RNA

Bakterilerde genetik materyal DNA'dır. Yani genetik veya kalıtsal özellikler DNA molekülü tarafından belirlenir. DNA Adenin ve Timin ile Guanin ve Sitozin purin ve pirimidin bazlarının özgün bir biçimde karşı karşıya gelerek hidrojen bağlarıyla birbirine bağlanmasıyla oluşur. Tüm bazlar bir deoksiriboz şeker molekülü ile bağlanmış durumdadır ve bu şeker molekülünde fosfat bağları vardır. Bu fosfat bağları birbirine alt alta gelen purin ve pirimidin çiftlerini birbirine bağlayarak çoğalmasını sağlar. Bu durum polimerizasyon diye adlandırılır. Bir DNA molekülündeki purin ve pirimidin bazlarının çift oluşturma durumu ve bu çiftlerin ardı ardına birbirine fosfat bağlarıyla nasıl bağlandığı Şekil 2.1'de şematize edilmektedir. Adenin, timin, guanin ve sitozin adlı bu dört nükleotid bazının dizileri genetik bilgiyi içerir. Diğer bir deyişle tüm canlılarda olduğu gibi bakterilerde de kalıtsal tüm özellikleri belirler. DNA molekülü çift sarmal şeklinde bulunur. Her sarmal bir diğerine kıvrılarak sarılmış durumdadır. Bu her sarmalda normal olarak adeninin karşısında timin, guanin karşısında sitozin molekülü bulunmaktadır. Her sarmal diğerinin tamamlayıcısı, yani komplementeri durumundadır.

RNA yapısı DNA'ninkinden daha farklıdır. Yapısında bulundurduğu şeker deoksiriboz yerine riboz'dur. RNA molekülünde DNA'daki timin yerine urasil yer alır. DNA'daki gibi RNA molekülünün komplementeri yani tamamlayıcısı bir karşı sarmal olmadığından normal olarak tek zincirlidir.



RNA'nın bakteri içinde bulunan özel formları olan transfer RNA ve ribozomal RNA'larda bazı bölgelerinde çiftleşmiş (dubleks) baz çiftleri oluşur.

DNA zincirlerinden her biri bir ana molekül olarak rol oynayarak karşısına uygun olan nükleotid bazlarının yerleşmesi ile kendi eş molekülünün sentezlenmesini sağlar. Kendi eşini sentezlenmesini sağlayan bir birinden ayrılmış her bir ana DNA molekülüne (zincirine) *templeyt* adı verilir. Yeni bir DNA molekülünün üretimi için yapılan kopyalama işine **replikasyon** denir. Ve her bakteri bölünmesinde bakteri DNA'sı bu işlemi gerçekleştirir. DNA kullanımıyla RNA sentezlenmesi işlemine ise transkripsiyon adı verilir. Yeni DNA işlemi için gerekli temel enzim DNA polimeraz enzimidir. Bazen DNA polimerizasyonu veya sentezi sürecinde polimeraz enzimi bazı yanlış nükleotid dizilerinin oluşumunu engelleyemez. Bu durumda kendiliğinden (spontane) mutasyonlar oluşabilir. Bu mutasyonların oluşmaması için DNA bazen bu hataları düzeltme mekanizmaları geliştirmiştir. Bunlara hata düzeltme veya yanlış okumayı bulma sistemleri denir. Bu sayede bakterilerde değişik mutasyonlar önlenmiş olur. Ancak hata düzeltilirken süreç replikasyon işleminin uzamasına neden olur.

Replikasyon: Bakterilerde DNA'nın çoğalması anlamındadır.

SIRA SİZDE



Bakterilerde DNA ve RNA arasındaki fark nedir?

Replikasyon

Bakteriyel hücreler tek bir sirküler kromozoma veya DNA'ya sahiptir. Buna ek olarak sıklıkla kromozom dışı olarak plazmid denen DNA moleküllerini de barındırırlar. Bu plazmidler çoğu durumda bağımsız DNA parçacıklarıdır. Ancak bazı bakterilerde plazmidler o bakteri türünün tüm üyelerinde bulunabilir ve bunlara temel plazmidler veya ek kromozomlar adı verilir. Tüm bunlara ek olarak, genelde bakterilerde sirküler olan DNA yapısı, bazı bakterilerde, örneğin streptomiçeslerde, lineer yani doğrusal bir durumda bulunur.

Temel olarak hücre bölünmesinden önce her bölünen hücreye bir kromozomun girmesi için ana hücrede en az iki kopya kromozoma gereksinim vardır. Bundan dolayı kromozom hücre bölünmesiyle ayarlı olarak replike olmalıdır. Bir bakteriyel kromozomun replikasyonu belli bir noktadan başlar. Bu noktaya "oriV" denir. Replikasyon her iki yönde bir noktaya dek sürer. Bu bitiş noktasına "ter" denir. Replikasyon RNA polimeraz enzimi denen bir enzimle üretilen ufak bir RNA parçasıyla her bir sarmalda başlatılır ve DNA polimeraz III adlı bir enzimle yürütülür. Hemen daha sonra görevi esas polimerizasyondan sorumlu enzim olan DNA polimeraz I devir alır ve bu ufak RNA parçası ayrılır. Bu işlemlerin olması için her bir DNA sarmalının daha önceden ayrılmış olması gerekir. Denaturasyon işlemini yapan enzim ise helikaz enzimidir. Ayrılan dizilerin ise tekrar bir araya gelmeksizinin replikasyonun sonuna dek tek sarmal olarak kalması için ise tek zincirli DNA bağlayıcı protein (SSB) devreye girer. Genel olarak *E.coli* denen bakteride bu süreç 40 dk sürer. Daha sonra replikasyon başlangıcı ile hücre bölünmesi arasında da 20 dk geçer ve toplam süre 60 dk dır. Ancak daha uygun şartlar altında bu süre 20 dakikaya inebilir. DNA replikasyonunun başlangıcı hücre bölünmesi ile değil, hücre hacminin bir fonksiyonu olarak uyarılır. DNA replikasyonu sonlandığı zaman iki ayrı DNA molekülü bakteri hücresi kutuplarına doğru ilerler ve hücre bölünmesini başlatır. Replikasyonun başlangıcı için ise hücrenin belli bir kritik kitleye ulaşması gerekir. Daha sonra DnaA adlı protein molekülleri DNA'nın ori bölgesindeki DnaA kutuları denen bölgelerine yapışırlar. Böylece DNA zincirlerinin birbirinden ayrılmasıyla replikasyon başlar. Olgun DNA'da her pozisyondaki ade-

nin artıklarına metil gruplarının eklenmesiyle DNA metile edilmiş durumdadır. Yeni sentezlemiş DNA'nın ise sadece bir sarmalı metillenmiş durumdadır; diğer sarmalda metilasyon yoktur. Bu durum DNA molekülünün tekrar replike olmasını önler. Bu molekül ancak her 2 sarmalı da metillenince replikasyona hazır hale gelir.

Transkripsiyon ve Translasyon

Replikasyon süreci içinde aynı zamanda DNA molekülünden transkripsiyon denen bir işlemle bir master RNA molekülü sentez edilir. Transkripsiyon işlemi RNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilir. RNA polimerizasyonu da denen transkripsiyon işlemi için DNA replikasyonundaki gibi bir başlatıcı nukleotid dizisine gereksinim yoktur. Bu nedenle transkripsiyondan çok daha basit bir süreçtir. Transkripsiyon sonu oluşan bir ulak RNA (mesenger RNA; mRNA) molekülüdür. Bu mRNA molekülünde köken aldığı DNA parçasındaki genlerin kodladığı proteinlerin hangi proteinler olduğu şifreli durumdadır. mRNA molekülü içinde proteinleri veya polipeptidleri oluşturan her bir amino asit için her üç bazdan oluşan bir genetik kod içeren bölgeler bulunur. Bu genetik koda triplet veya kodon denir. Her kodon belli tek bir amino asidi kodlar. Veya bu kodon protein sentezini durduran bir dur sinyali oluşturur. Bu şekilde 64 adet farklı kodon grubu mevcuttur. Bu nukleotid üçlüsü (triplet) veya kodon bilgisi evrenseldir. Her canlı türünde aynı bilgiyi içerir. Ancak bazen farklılıklara rastlanabilir. Örneğin UGA kodonu normalde bir dur kodonu olmasına rağmen bazen triptofan veya sistein amino asitlerini kodlayabilir. Bu evrensel kodlar türlerin evrimi sürecinde oluşan bir işlemdir ve o aşamada sabitlenmiştir.

Bakterilerde protein sentezi üniteleri olan ribozom elemanları çökme katsayılarına göre iki alt üniteden oluşur. Bunlar 50S ve 30S komponentleridir. Tüm ribozomal ünite 70S olarak tanımlanır. Büyük 50S kısmı 23S ve 5S'lik iki RNA molekülü ve buna ilaveten 31 farklı polipeptid içerir. Ufak parça ise 16S'lik bir RNA molekülü ve 21 polipeptid barındırır. Bakterilerde ribozomlar mRNA'nın spesifik kısımlarına (Ribozom-bağlanma bölgesi; RBS) bağlanır. Bu dizi 16S rRNA'nın 3' ucu için kısmen komplementerdir. Bu nedenle ribozoma bağlanma hidrojen bağlarıyla komplementer baz dizileri arasında oluşur. Translasyonun başlaması için 30S alt ünitesi RBS'ye bağlanır ve bir başlatıcı transfer RNA (tRNA) bitişindeki başlangıç kodonu ile ilişkiye girer. Bu başlangıç kodonu genellikle AUG, bazen GUG, nadiren de CUG olur. Daha sonra 50S alt ünitesi bu başlangıç kompleksine katılır ve translasyon işlemi başlatılır. Bu basamakların hepsinde çok sayıda başlatma faktörleri ismi verilen ribozomlara ait olmayan protein molekülleri görev yapar. Her ribozom mRNA boyunca hareket eder ve bir dur kodonuna ulaşıncaya fonksiyonunu tamamlar. Durma noktasında bu kodonu tanımlayacak bir tRNA olmadığı için translasyon durur. Böylece "polipeptid zinciri serbestleştirme faktörü" denen proteinlerce salınır ve ribozom mRNA'dan ayrılır.

Translasyon işlemi sonunda oluşan amino asitler birbirlerine bağlanarak bakteriye özgün polipeptid moleküllerini şekillendirmiş olurlar. Bu polipeptid zincirleri translasyon sonrası belli biyolojik işlemlerden geçirildikten sonra biyolojik olarak aktif proteinlere dönüştürülürler ve bakteriler tarafından intraselüler veya ekstraselüler yapısal komponentler olarak kullanılırlar.

BAKTERİLERDE MUTASYON

Bakterilerin yapılarında veya özelliklerinde normalin dışında oluşan değişimlere yol açan DNA bozukluklarına mutasyon denir. Bu değişim fenotipik olarak bakterinin özelliklerine yansır. Örneğin, *E.coli* bakterisi laktoz şekerini kullanamayan duruma gelirse fenotipik olarak Lac- *E. Coli* olarak ifade edilir. Bunun nedeni laktozu fermente etmesini sağlayan β -galaktosidaz genindeki mutasyondur. Bu mutant *E.coli* genotipi ise *lacZ* olarak italik biçimde yazılarak ifade edilir.

Bakterilerdeki mutasyon şekilleri ve tanımlarını aşağıdaki şekilde gruplandırarak vermek mümkündür.

Nokta Mutasyonları

Nokta mutasyonlarında DNA dizisi tek bir pozisyonda değişmiş veya değiştirilmiş olur. Dizide bir nükleotid bir başkası ile yer değiştirdiğinde buna "tek baz yer değiştirmesi" adı verilir. Bu durumda gelişen ve gözlenen farklılaşma mutasyonun DNA'nın neresinde olduğuna bağlı olarak değişir. Bu değişim eğer DNA'nın protein kodlayan bir bölgesinde ise bu durumda oluşan proteinde farklılık oluşacak ve proteinin fonksiyonu bozulacaktır. Örneğin, UUA kodonu lösin amino asidini kodlar. Bu kodonda UUG ve CUA gibi iki alternatif mutasyon olduğu düşünüldüğünde, bu mutasyonlar durumunda oluşan kodonlar yine aynı amino asidi, yani lösin kodladığından mutasyonun hiçbir etkisi gözlenmez. Buna "sessiz mutasyon", oluşan kodonlara da "sinonim kodonlar" adı verilir. AUA ve GUA nokta mutasyonları çok az bir değişikliğe yol açar, çünkü oluşan amino asitler (izolösin ve valin) orijinal amino asit olan lösinine çok benzer hidrofobik amino asitlerdir. Diğer taraftan yine hidrofobik bir amino asit olan fenilalanin kodlayan UUU veya UUC mutasyonlarının oluşumunda ise polipeptidde şekilsel bir değişim oluşacağı için daha önemli bir protein bozukluğu olma ihtimali fazladır. UCA mutant kodonu ise serin amino asidini kodlar ki, böyle bir mutasyonda proteinin tüm fonksiyonu bozulur. Anlaşılacağı gibi nokta mutasyonunun biyolojik önemi amino asitler arası değişimdeki benzerliğe veya farklılığa bağlıdır. Bunlar dışında mutasyon sonucu eğer UAA veya UGA gibi kodonlar oluşursa, bunlar "dur" veya "sonlandırma" kodonları olduğu için, polipeptid üretimi durur. Bu durumda gereksinilen protein üretilmediği için oluşacak proteinin önemine bağlı olarak bakteride gözle görülür değişimler veya ölüm şekillenebilir.

Bir başka nokta mutasyon tipi de tek bir dizi pozisyonundan bir nükleotidin yok olması veya girmesidir. Bu mutasyon tipine DNA dizisinin okunan bölgesinde (anlamli bölgesi) olduğu için "anlamli bölge mutasyonu" (frame shift mutasyon) adı verilir. Bu mutasyon durumunda da bakterinin fonksiyonlarında önemli değişimler gözlenir.

Şartlı Mutantlar (Kondisyonel Mutantlar)

Bakterilerde antibiyotik veya bakteriyofaj dirençliliğini, gerekli metabolitlerin biosentezini veya karbon kaynaklarının kullanımını etkilemeyen çok sayıda gen bulunur. Bu genlerden bazıları çok önemli genler olup, bu genlerdeki mutasyonlar ölümcül etkiler taşıyabilir veya bakterinin üremesini engelleyebilir. Belli koşullar altında normal işlevini yapan genlerin defekti ancak koşullar değiştirilince ortaya çıkar. Örneğin, bir bakterinin sıcaklığa duyarlı bir mutanı oluşturduğunda, bu bakteri DNA'sı normal olarak 30.8 C'de replike olabilirken, 43 C gibi yüksek ısılarda replike olamaz, yani üreyemez.

Büyük DNA Parçalarında Oluşan Değişimlere Bağlı Varyasyonlar

Tüm mutasyonlar aslında bir bakıma nokta mutasyonu niteliğinde olmasına karşın, bakterilerde ve diğer organizmalarda oluşan varyasyonların birçoğu DNA yapısında daha önemli değişimlere yol açar. Bu varyasyonların en basiti olarak değerlendirilebileceğimiz türü “delesyon”lardır. Delesyonlarda bir gen veya birden fazla gen parçası tümüyle yok olmuş durumdadır. Bu durumda delesyona uğramış DNA bölgesinin veya genlerin fonksiyonları tamamen yok olur. Delesyon olguları DNA’da kolayca belirlenebildiği için DNA analizi ile tespiti son derece kolaydır. Delesyonlar asla geri dönüşümlü durumlar değildir; bir kez oluşunca mutasyonun düzelmesi söz konusu olamaz. DNA’da oluşan bir diğer büyük ölçekli değişim veya varyasyon türü de dış kaynaklı bir DNA parçacığının bir gen içine girmesidir. Bu giriş işlemine “insersiyon” adı verilir. İnsersiyon oluştuğunda ilgili gen tümüyle inaktive olur ve fonksiyonları ortadan kalkar. Bu tip bozukluğa yol açabilen ve DNA’ya spesifik olarak insersiyon yapan ufak DNA elementleri bulunmaktadır. Bunlara insersiyon dizileri (insersiyon sekansları; IS) denir. Bu IS parçacıklarının DNA’ya girdiklerinde oluşturdukları mutasyon “insersiyon mutasyonu” olarak bilinir. Kendiliğinden mutasyonların önemli bir kısmı replikasyon sürecindeki bir bozukluktan daha çok bir IS elementinin kopyasının DNA’ya girerek genlerin inaktivasyonu sonucu oluşur. Bir diğer varyasyon oluşturucu unsur da IS elementlerine temel olarak çok benzeyen “transpozon”lardır. Transpozonlar DNA’nın bir bölgesinden bir başka bölgesine yer değiştirirler. Transpozonlar taşıdıkları bir veya daha çok tanımlanabilir genetik işaretlerle IS elementlerinden farklılık gösterirler. Genetik biliminde en çok çalışılan transpozonlar antibiyotik dirençlilik genlerini taşıyanlardır. Transpozonlar antibiyotik dirençliliğinin gelişimi ve yayılımı ile ilgili araştırmalarda en çok kullanılan genetik unsurlardır. Bir başka mutasyon yaratan kısa DNA parçacığı ise değiştirici (invertible) DNA sekanslarıdır. DNA’nın bir bölgesini ters tarafa döndürebilir. Bu dönen bölge eğer bitişik genin ekspresyonu için gerekli ise, değişim ilgili genin fonksiyonlarını uyarabilir veya tümüyle durdurabilir. Bu etkinin en iyi örneklenebileceği durum, *Salmonella* flagellar antijenlerindeki varyasyondur.

İnsersiyon sekanslarının ve transpozonların nasıl ve ne tip mutasyon oluşturduklarını biliyor musunuz?

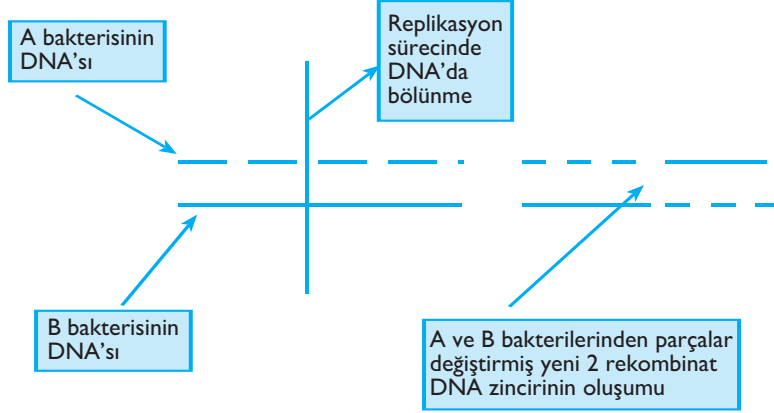


Rekombinasyon

Rekombinasyon aslında temel genetikte ayrılan homolog DNA sarmallarının tekrar bir araya gelmesi anlamında kullanılmakla beraber, bir mutasyon tipini de ifade etmektedir. En basit anlamda, iki doğrusal DNA molekülünü ele alalım. Her birinin rekombinasyon sürecinde belli parçalar halinde olduğunu düşünelim. Daha sonra iki DNA molekülünün bölünen parçaları yer değiştirerek bir diğeriyle birleşir. (Şekil 2.2) Bu yeni oluşan iki adet DNA molekülüne “rekombinant DNA” denir. DNA segmentlerinin yer değiştirdiği bu mutasyon işlemine de “homolog veya genel rekombinasyon” adı verilir.

Şekil 2.2

Rekombinasyon



EKSTRAKROMOZOMAL GENETİK ELEMENTLER VE YATAY GEN TRANSFERİ

Kromozomal DNA'daki değişimlere ek olarak, ekstrakromozomal DNA veya genetik elementlerin kazanılması veya kaybedilmesi ile de varyasyonlar oluşur. Bu ekstrakromozomal genetik elementler plazmidler veya bakteriyofaj genetik elementleridir. Bu ekstrakromozomal genetik elementler bakteriler arasında 3 yolla aktarılır. Bu yollar transformasyon, konjugasyon ve transdüksiyondur.

Transformasyon bakterinin ortamdaki çıplak DNA parçasını direkt olarak içine alması ve alınan DNA'nın kodladığı özellikleri kazanması demektir. Transformasyon için bakterinin belli bir sayıda olması ve bakteri yüzeyinin transformasyona hazır hale gelmesi gerekir. Bu hazır hale gelme durumuna **kompetans** denir. Bakteride kompetans oluştuğundan sonra çift sarmallı DNA parçacıkları hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanır ve sadece bir sarmal bakteri içine alınır. Bazı bakteri türlerinde bu DNA girişinin aynı türden bakteriden olması gerekir. Örneğin *N.meningitidis* ve *H.influenza* bakterilerinde sadece sırasıyla 10 baz çifti (bp) ve 29 bp uzunluklarında DNA parçacıklarının sadece aynı türlerden transformasyonu söz konusu olabilir. Buna karşın *B. subtilis* ve *S. pneumoniae* gibi bakteri türlerinde tüm DNA, transformasyonla bakteriye girebilir. Eğer dışarıdan giren DNA tam kromozomal DNA ise replikasyonu için girdiği bakteri DNA'sı ile rekombine olması şarttır. Giren DNA ile konakçı bakteri DNA'sının homolog olması, yani aynı türden bakteriler arasında olması rekombinasyonu garantiler. Ancak ayrı türden bakterilerden gelen kromozomal DNA'larda konakçı bakteri DNA'sı arasında bazı benzer bölgelerin olması bile transformasyon sonu olan rekombinasyona yeterli bir durum teşkil eder. Genetik araştırmalarda DNA'nın suni yolla bazen konak bakterilere sokulması gerekir. Elektrik akımı yoluyla bakterilere DNA'nın suni transformasyon işlemine "elektroporasyon" adı verilir.

Konjugasyon bir verici (donör) bakteriden DNA transferi için gerekli genleri taşıyan bir plazmidin varlığında diğer alıcı bir bakteriye aktarılmasıyla gerçekleşir. *E.coli* ve diğer birçok Gram negatif bakterilerde verici hücre yüzeyinde pilus adıyla anılan borucuklar mevcuttur. Bu pilusların yapısı değişiklik gösterebilir. Örneğin F pilusları uzun, ince ve elastiktir. Buna karşın RP4 pilusu kısa, kalın ve serttir. Piluslar alıcı hücrenin yüzeyi üzerinde reseptörler ile ilişkiye girerler ve böylece çiftleşme başlar. Daha sonra piluslar alıcı hücrede bir kanal açarak DNA'nın geçi-

Kompetans: Biyolojide bir hücrenin DNA'yı alma kabiliyeti anlamındadır.

şini sağlarlar. Bu geçiş replikatif bir işlemdir. Yani aktarımdan önce plazmid DNA'sı kopyalanarak bir kopyası aktarılır; diğeri verici bakteride kalır. Böylece plazmid popülasyondaki diğerk bakterilere aslında **epidemik** bir şekilde bulaştırılmış olur.

Çoğunlukla donörden alıcıya transfer edilen DNA bir plazmidin kopyasıdır. Bununla beraber bazı plazmidler kromozomal DNA'nın da transferini teşvik ederler. Bu plazmidlerden en önce saptananı ve önemlisi *E.coli*'de bulunan F (fertilite) plazmididir. Fakat benzer sistemlere *P.aeruginosa* gibi diğerk bakteri türlerinde de rastlanmaktadır. Konjugasyonda bir plazmid tümüyle diğerk hücreye aktarılırken, kromozomal DNA'nın tümü aktarılamaz. Bunun bir nedeni transfer için gerekli zamanın kalmayışıdır. Çünkü bir plazmidin geçişi (40 bp uzunluğunda) yaklaşık 1 dk gibi bir zamanda gerçekleşir. Bu zaman tam kromozomal DNA'nın geçişi için asla yeterli değildir.

Streptomiçeslerden enterokoklara dek birçok Gram pozitif bakteride de yukarıda sözü edilen gram negatifler gibi konjugasyon söz konusudur. Ancak bazı farklılıklar gözlenir. Örneğin gram pozitiflerde konjugasyon için gerekli gen sayısı 5, buna karşın gram negatiflerde 20 kadardır. Bu konjugatif plazmidlerin (konjugasyonu indükleyen plazmidler) Gram pozitif bakterilerde daha küçük olduğu anlamına gelir. Gram pozitiflerdeki az sayıda gene gereksinimin bir nedeni, bir pilus oluşumuna gereksinim göstermemesidir. Bu Gram pozitiflerdeki farklı bir hücre duvarı yapısının olmasına bağlıdır. Enterokoklar gibi Gram pozitif bakterilerde alıcı hücre yüzeyine feromon adı verilen yapı proteinleri salgılanır ve plazmid taşıyan verici hücre ise kendi plazmidini tarafından kodlanan ve bu feromonlara spesifik reseptörler oluşturarak birleşir. Bununla beraber alıcı hücre yüzeyinde çok sayıda plazmid taşıyan bakteriler ile birleşmek için çok farklı çeşitte ve sayıda feromonlar oluşturur.

Plazmid haricinde *E.faecalis* bakterilerinde ayrıca gen aktarımına yol açan konjugatif transpozonlar mevcuttur. Aslında transpozonlar DNA içinde yer değiştiren genetik elementler olmalarına karşın, *E.faecalis*'te bulunan konjugatif transpozon olan Tn916 gibi transpozonlar konjugasyona neden olabilmektedir. Bu transpozonlar replike olur ve kromozomal DNA'nın bir parçası olarak kalıtımsaldır. Tn916 konjugatif transpozonların prototipidir. Bu tip transpozonlar Gram pozitif koklarda çok yaygındır, ayrıca benzer elementler *Bacteroides* gibi Gram negatif bakterilerde de saptanmaktadır. Konjugatif transpozonların DNA parçacıklarını diğerk bakteri türleri ve genuslarına da aktarabildikleri ve böylece antibiyotik dirençlilik genleri dahil birçok genetik materyalin bakteriler arasında hızla yayılmasında çok önemli bir rol oynadıkları ortaya çıkmıştır. Örneğin Tn916 dahil çok sayıda konjugatif kromozom tetrasiklin direnç genini (tetM) çok değişik türde bakteri de taşımaktadır. Bu durum özgün bir genin bu transpozonlar tarafından tüm bakteriler arasında yayılabileceğini gösteren bir delildir.

Bakterilerdeki üçüncü tip genetik materyal aktarım yolu transdüksiyondur. Transdüksiyon genetik materyalin faj aracılığı ile aktarımıdır. Fajlar bakterilere özel virüslardır ve bakterilere yapışarak kendi genetik elementlerini bakterilere verirler, yani bakterileri infekte ederler. Fajlar bakterileri infekte ettikten sonra, infeksiyonun belli bir sürecinde onları lize ederler, diğerk bir deyişle parçalarlar. Bu parçalanma sürecinde sadece fajın kendi DNA'sı faj kapsidi içine alınır. Bununla beraber bazı fajlar hata sonucu konak bakteri kromozomunu parçalar ve faj kapsidi içinde bir bakteri kromozom parçasını bulundurabilir. Bu barındırılan DNA parçaları bir başka alıcı bakteriyi infekte etme kabiliyetindedir. Tabii ki tüm bakteriyofajlar transdüksiyon oluşturma yetisinde değildir. Faj transdüksiyonu

Epidemik: Epidemik salgın hastalık demektir. Epidemik ise salgın hastalığıtakine benzer olarak anlamında kullanılmaktadır.

için temel bazı gereksinimler vardır. Bunlardan biri uygun büyüklükte kromozomal DNA parçacıklarının şekillenmesi için faj infeksiyonunun uygun düzeyde gerçekleşmesidir. Diğerisi ise DNA'nın faj kapsidine paketlenmesi işleminin mümkün olduğu kadar spesifik olmamasıdır. Yani diğer bir deyişle, fajın kendi DNA'sı dışında mümkün olduğu ölçüde farklı DNA parçacıklarının da kapsid içine girmesine izin vermesidir. Bazı durumlarda transdüksiyona uğrayan bir plazmid DNA'sı da olabilir. Bu durumda bakteriye plazmid injekte edildiğinde plazmide ait DNA molekülü replike olur ve kalıtımını korur. Ancak çoğunlukla transdüklelenen bir kromozomal DNA parçasıdır ve bu parça alıcı bakteride replike olamaz. Bunun replike olması ve kalıtımını sürdürmesi için alıcı hücre kromozomuna yerleşmesi gerekir. Her gen bu tip transdüksiyonla aynı oranda aktarılma şansına sahip olduğu için bu duruma generalize transdüksiyon adı verilir. Bazı durumlarda ise faj DNA'sı konakçı bakteriyi lize etmeden onun kromozomuna yerleşerek ve **lizojeni** diye bir süreç geliştirir. Bu lizojeni sürecinde faj DNA'sı kromozomal DNA'nın bir parçasıymış gibi replike olur. Ancak bazı koşullarda bu lizojenik durum bozulur ve buradan ayrılırken bakteriyel DNA'ya ait parçaları da koparabilir. Bakteriyel DNA'ya sahip bu faj DNA'sı çok daha sıklıkla faj aracılığı ile aktarılabilen bir kabiliyet kazanır. Burada aktarılan DNA çok kısa bir DNA parçası olduğu için oluşan transdüksiyon işlemine "özelleşmiş" veya "sınırlı" transdüksiyon denir.

Benzer bir yolla yaşamını sürdüren bir diğer faj Mu fajıdır. Bu faj tranpozon benzeri bir mekanizma ile kromozomal DNA'nın bir çok bölgesine girebilir. Bundan dolayı özelleşmiş faj transdüksiyonu oluşumu Mu fajı ile çok daha kolaydır.

GENETİK TABANLI TESTLER

Mikrobiyolojideki genetik yöntemler mikroorganizmaların identifikasyonu, hasta örneklerinde aranması, genetik karakterlerinin ortaya koyulması, **patojenite** ve bağışıklık ile ilgili yapısal genetik komponentlerinin aranması ve incelenmesi, epidemiyolojileri, hastalık oluşturma yöntemleri (patogenesis) ve unsurları (virulens faktörleri), antibiyotik dirençliliklerinin hızlı tespiti ve mutasyonlarının incelenmesi gibi çok geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Bu bölümde sadece klinik mikrobiyoloji diye tanımladığımız infeksiyöz hastalıkların etkeni mikroorganizmaların aranması ve karakterize edilmesi ile ilgili olarak kullanılan önemli genetik yöntemler gruplandırılarak verilmektedir.

Plazmid Profili

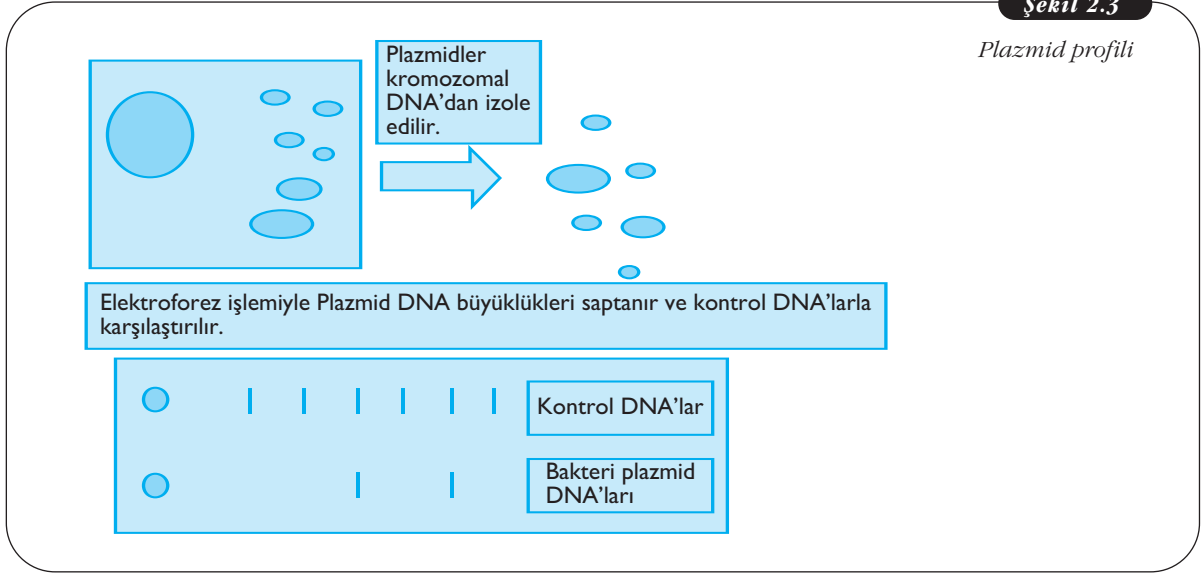
Bilindiği gibi plazmidler bakterilerin kromozomunun dışında çift sarmallı DNA elementleridir. Bakteriler bir veya birden fazla plazmide sahip olabilirler. Plazmid profil analizi ile bir bakterinin kaç tane ve hangi büyüklükte plazmid içerdiği saptanır ve diğer bakteri izolatlarıyla karşılaştırılır. Plazmid profil analizi için önce incelenecek bakteriler lize edilir, daha sonra özel bazı yöntemlerle izole edilen plazmid DNA'ları elektroforez denen bir yöntemle ayrılır. Daha sonra elektroforez işleminin uygulandığı jel boyanır ve ultraviyole ışığı altında incelenir. Böylece bakterilerin plazmid profili çıkarılmış olur. (Şekil 2.3). Plazmid profili belirlenmesi işlemi bakterilerin bir ön genetik tiplendirilmesi veya genotiplendirilmesi yöntemi olarak kabul edilir.

Lizojeni: Bir bakteriyofajın DNA'sının konak bakteri DNA'sına girerek o bakteriyi eritmeden, yani lize etmeden bakterinin yaşamını sürdürme durumudur.

Patojenite: Bir mikroorganizmanın hastalık oluşturma kabiliyetidir.

Şekil 2.3

Plazmid profili



Nükleotid Dizileme (DNA dizileme)

Bilindiği gibi DNA nükleotid dizilerinden oluşmaktadır. Nükleotid dizileme yöntemi ile incelenen DNA'daki nükleotidlerin hangi sırada buldukları saptanır. Nükleotid dizilerinin saptanması üzerinden nükleotid kodonların kodladığı olası amino asitler ve dolayısıyla oluşacak polipeptid dizileri hakkında da bir fikir edinilebilir. Nükleotid dizileme DNA tiplendirmesi veya genotiplendirme açısından en temel metottur. DNA dizilemesi için iki popüler yöntemden yararlanılır. Bunlar Kimyasal Kesim Yöntemi (Chemical Cleavage Method) ve Zincir Sonlandırma Yöntemi (Chain Terminator Method)'dir. Her iki yöntem de güncel olarak otomatize bir şekilde uygulanmaktadır ve dizileme sonuçları bir bilgisayar programı kullanımıyla analize edilmektedir. Nükleotid dizileme biraz zaman alıcı bir yöntem olmasına rağmen, DNA içindeki araştırılan genin tam dizi yapısı, mutasyon analizi yapılabilir. Aynı DNA bölgesi veya bölgeleri karşılaştırılarak bakteriler veya aynı bakterinin farklı izolatlarının birbirine genetik yakınlıkları saptanır. Ayrıca bir gen bölgesinin dizileme analizi sonucunda elde edilen bilgilere göre, başta polimeraz zincir reaksiyonu olmak üzere bazı genetik testlerde kullanılan oligonükleotid dizileri ve problemlerinin dizaynı olanaklı olur.

Özgün Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)

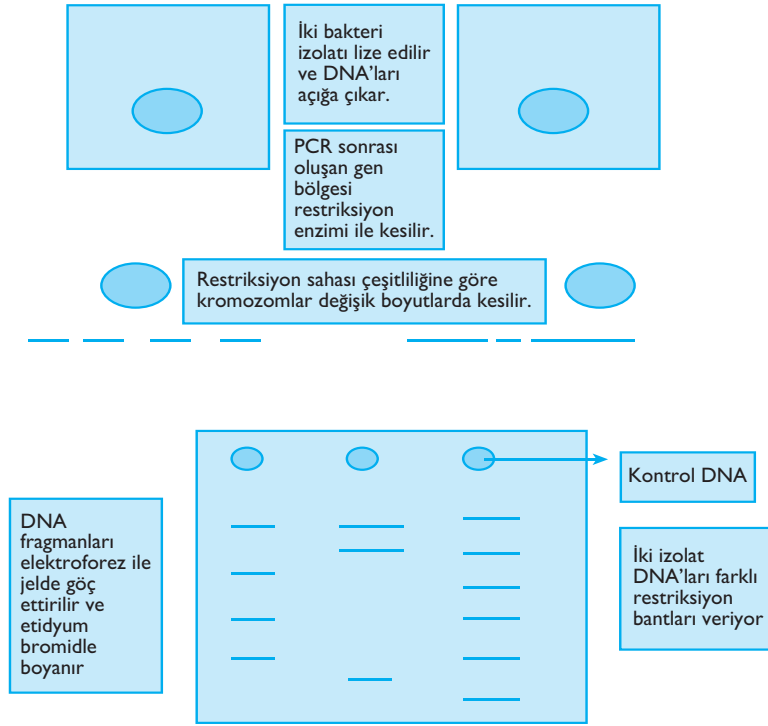
Mikroorganizmalar dahil tüm organizmalardaki nükleoid dizilerinde **polimorfizm** veya çeşitlilik mevcuttur. RFLP tekniği mutasyonlar nedeni ile restriksiyon endonükleaz enzimleri denen DNA'yı kesen özgün enzimlerin DNA'yı spesifik olarak kestiği yerlerde ortaya çıkan nükleotid bazı değişimlerini ortaya koyma özelliğini taşır. DNA'daki restriksiyon bölgesi 4-12 nükleotid bazlık uzunluktadır. Hedeflenen bakteriyel kromozom bölgesi veya plazmid DNA önceden bilinen veya rastgele seçilen restriksiyon enzimi ile kesilir. İncelenen ve enzimle kesilen DNA bölgesi genellikle kesimden önce bir PCR işlemi ile çoğaltılır. Kesim sonrası oluşan DNA fragmanları elektroforez ile agaroz veya poliakrilamid jel üzerinde ayrılır. Jelde ayırmadan sonra bandlar etidyum bromid adlı bir boya ile boyanır ve UV ışığı altında incelenir. Ayrılmış DNA parça sayıları, boyutları ve birbirinin üzerine bi-

Polimorfizm: Çok çeşitlilik gösterme durumudur.

nen bantların olup olmadığı incelenir (Şekil 2.4). Bu bantları naylon membranlar üzerine aktarılabilir ve DNA'lar naylon membran üzerinde spesifik problemlarla hibridize edilerek saptanabilir. RFLP epidemiyolojik bir değerlendirme ve bakteri izolatlarının tiplendirilmesi için çok kullanışlıdır. Aynı restriksiyon enzimlerinin kullanımıyla birden çok bakteri izolatının değerlendirilmesi ve genetik yakınlıklarının ve akrabalıklarının saptanması mümkündür. Bu yöntem DNA parmak izi saptama (DNA fingerprinting) yöntemi adı da verilir. Bu işlem insan ve hayvan hekimliğinde adli tıpta da aynı amaçla kullanılabilir. RFLP tekniğinin bir diğer çok yaygın kullanımı "ribotiplendirme"dir. Bakteri ribozomunun ufak alt ünitesi olan 16S rRNA (yaklaşık 1500 baz çifti büyüklüktedir) bakterilerin en sabit dizisidir. Bu genetik yapı bakteri genusu veya türüne çok özgündür; yani o cinse veya türe aittir. Bu 16S rRNA dizisi RFLP'ye tabi tutularak, diğer bakterilerle genetik ilişkiler ortaya çıkarılabilir.

Şekil 2.4

RFLP analizi



Elektrik Vurumlu Saha Jel Elektroforezisi (Pulsed Field Gel Electrophoresis; PFGE)

PFGE RFLP'ye benzer bir yöntemdir. Ancak burada enzimlerin kestığı DNA tüm bakteriyel kromozomdur. Hâlbuki RFLP'de kesilen kromozom veya plazmidin PCR ile artırılmış sadece bir bölgesidir. Bundan dolayı PFGE'de restriksiyon enzimleriyle kesim sonrası elde edilen DNA fragmanları RFLP'de oluşanlardan daha büyük boyuttadır. Bantları birbirinden ayrı bir şekilde görüntülemek için yapılan elektroforez işlemi özel bir elektroforez donanımı ve yöntemi ile gerçekleştirilir. PFGE yöntemi epidemiyolojik yönden önemli olup, değişik kaynaklı ve farklı coğrafik bölgelerden elde edilen bakteri izolatlarının genetik ilişkilerinin saptanmasında çok önemli bir yer tutar.

Nükleik Asit Hibridizasyonu

Bir DNA molekülünün iki sarmalı birbirinden yüksek sıcaklıklara tabi tutulduğunda, düşük tuz yoğunluklarında bulundurulduğunda veya değişik kimyasalların etkisiyle ayrılabilir. Bu denaturasyon veya ayrılma (melting) işlemi sıcaklığı düşürülmesi, tuz yoğunluğunun artırılması veya denature edici kimyasal etkenin ortamdaki kaldırılması ile geri dönüştürülebilir. Ayrılan sarmallar tekrar çift sarmal halini alır. Bu işleme renaturasyon veya birleşme (annealing) denir. Hibridizasyon işlemi sarmallar arasında homolojiyi veya eş olmayı gerektirdiğinden dolayı, her biri başka bir kökenden olan iki nükleik asit molekülü arasında oluşan bir hibridizasyon reaksiyonu nükleik asitlerin ait oldukları organizmalar arasındaki genetik yakınlığı gösterir. Hibridizasyon ile ölçüm için iki nükleik asit zincirinden birinin bilinen bir organizmadan olması gerekir. Diğer zincir ise tanımlanacak veya aranacak olan organizmaya aittir. Hibridizasyon işleminde, klinik örnekten izole edilmiş DNA bir prob (işaretli bir DNA parçası) ile karıştırılır ve denaturasyon gerçekleştirilirse, DNA sarmalları birbirinden ayrılır. Denaturasyon koşulları ortadan kaldırılır ve durum normale getirilirse, prob dizisi ile DNA arasında eğer bir homoloji söz konusu ise birleşecektir. Probin hedef DNA ile birleşme olgusuna "hibridizasyon" denir. Hibridizasyon sonuçları probun DNA'nın hibridizasyon yüzdesi, benzerlik yüzdesi, ilişki yüzdesi şeklinde ifade edilir. Bir hibridizasyon denemesi için temel olarak hedef bir nükleik asit (DNA veya RNA), restriksiyon endonükleaz enzimine, işaretlenmiş problara, agaroz jel elektroforez cihazına, naylon veya nitroselüloz kağıtlara ve uygun koşullara ihtiyaç vardır. Tipik hibridizasyon denemeleri şu basamaklardan oluşur: Tek zincirli problemlerin üretimi ve işaretlenmesi, hedeflenen nükleik asit dizisinin tek zincirli hale getirilmesi, hedef ve prob DNA'larının birleşme için bir arada bırakılması ve hibridizasyon reaksiyonunun saptanması. Problemler kısa nükleik asitlerdir ve bilinen hedef DNA'nın aranmasına yönelik olarak tasarlanırlar. Daha sonra problemler hibridizasyonun saptanabilmesi için işaretlenir. Bir problemin sentezi için öncelikli olarak hedef DNA'nın nükleotid dizisi mutlaka bilinmelidir. Problemlerin hazırlanmasında genellikle a. plazmidler, λ fajları veya kozmidlere klonlama, b. yaklaşık 20 oligonükleotid bazı içeren problemlerin kimyasal yolla sentezi, c. bilinen dizinin PCR ile çoğaltılması işlemleri kullanılır.

Problemler hibridizasyonu takiben hedef nükleik asit dizisinin saptanması için mutlaka daha önceden işaretlenmiş olmalıdır. İşaretleme radyoaktif veya non-radyoaktif maddelerle yapılır. ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I elementleri en çok kullanılan radyoaktif izotoplardır. Radyoaktif işaretlerle işaretli problemlerin kullanıldığı durumlarda, hibridize olan DNA'lardaki birleşmenin olup olmadığı veya hibridizasyon miktarı radyoaktivite ölçülerek gerçekleştirilir. Bu işlem için sintilografi ölçücüsü veya X-ışınımmı otoradyografisi kullanılır.

Nonradyoaktif problemler biyotin, digoksinin ve akridin ester gibi kimyasallardır. Örneğin, biyotin B vitamininin ufak bir parçasıdır ve yumurta beyazında bulunan bir kimyasal olan avidin'e özgün olarak bağlanır. Her bir biyotin molekülü 4 adet avidin molekülüne bağlanabilir. Bundan dolayı biyotinli problemler hibridize olduklarında, DNA aranması enzim bağımlı avidin molekülleri ile yapılır. Daha sonra kullanılan enzimin özgün substratının ortama uygulanmasıyla, renk değişimi gözlenir. Digoksinin işaretli problemleri aramak için ise enzim işaretli anti-digoksinin antikollarını kullanmak gerekir. Daha sonra uygun substrat katılarak reaksiyon gözlemlenir.

Hibridizasyon uygulandığı ortama göre 2 grupta ele alınabilir: 1.Solusyon fazla hibridizasyon sıvı ortamların içinde gerçekleştirilir. 2.Katı fazla hibridizasyon (Bu tip hibridizasyonun önemli örnekleri Southern blot hibridizasyon, Northern blot hibridizasyon, Sandwich hibridizasyon) naylon membranlar üzerinde veya ELISA pleytleri çukurlarında veya patolojik dokuların içinde gerçekleştirilir.

Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) çok az miktardaki DNA veya RNA molekülünün enzimatik olarak çok fazla miktara getirilmesidir. Bu sayede 1-2 kopya DNA milyonlarca kopyaya çoğaltılır. Dolayısıyla bu işleme nükleik asit artırılması veya amplifikasyonu denir. PCR işlemi uygulanmaksızın, az miktardaki nükleik asit hibridizasyon işlemleri ile saptanamaz. PCR ile kısa bir süre içinde DNA veya RNA kopya sayısı yaklaşık 10^7 adede artırılabilir. PCR işlemi için işlemi başlatacak, aranan hedef DNA'nın her bir sarmalının bir ucuna spesifik olarak tasarlanmış ve sentezlenmiş bir çift başlatıcı DNA parçacığına gerek vardır. Başlatıcı bu moleküllere "primer" denir. Primerler DNA polimeraz enziminin de PCR içeriğine katılmasıyla uygun olduğu nükleotid dizilerine bağlanarak uzar. Böylece hedefin her sarmalından bir başka kopya sarmal sentezlenir ve sonuçta her bir DNA molekülü iki katına çıkmış olur. Bu işlem çok kez tekrarlanarak milyonlarca kopya hedef DNA oluşturulur. PCR sonu elde edilen PCR ürünlerine "amplikon" denir. PCR reaksiyonu içinde temel olarak bulunan materyaller şunlardır: hedef DNA, primerler, sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz enzimi, nükleotid bazları (Adenin, Timini Guanin, Sitozin), Su ve Magnezyum. İçine bu maddelerin konulduğu tüpler veya kapiller borucuklar PCR makinelerine yerleştirilir ve makinelerin PCR koşulları ayarlanır. Tipik bir PCR için uygulanan sıcaklık koşulları ve adları şunlardır. Önce 94-95C'de 15 sn-1dk denatürasyon, 52-60 C'ler arası 15 sn- 2 dk arası primerlerin hibridizasyonu ve 72 C'de 15 sn- 3 dk arası DNA polimeraz enziminin primerleri uzatması. Bu 3 aşamadan oluşan bir PCR döngüsü yaklaşık 25 ile 40 kez tüplere uygulanır ve PCR işlemi bitirilir. Primerler genellikle problar gibi 20-30 baz uzunluğunda nükleotid dizileridir. Kimyasal olarak sentetik bir şekilde sentezlenir. Ancak problar gibi işaretlenmezler.

PCR ürünleri daha sonra jel elektroforezisi ile klasik bir şekilde saptanabilir. Bunun haricinde ürünler gerçek zamanlı PCR (Real Time PCR) yöntemleriyle amplifikasyon sürecinde ve sonrasında belirlenebilir. Gerçek zamanlı PCR işlemlerinde ürünlerin teyidi uygulanan tekniğin türüne göre değişir. Örneğin Syber-Green boya tabanlı bir gerçek zamanlı PCR uygulandığında, amplikon özgünlüğü genellikle oluşan ürünün erime eğrisi sıcaklığı (Tm) analiz edilerek teyit edilir. Gerçek zamanlı PCR'da ayrıca ürünlerin özgünlüğü ve miktarı spesifik problemlerin da kullanımıyla olanaklı hale getirilebilir.

DNA yerine RNA'nın PCR ile artırılabilmesi için önce RNA'nın DNA'ya çevrilmesi gerekir. Bu işlem ters transkriptaz (reverz transkriptaz) enzimi ve tek zincirli bir primer kullanımı ile yapılır. RNA'dan DNA oluşturma işlemine revers transkripsiyon denir ve bu işlem PCR öncesi uygulanarak hedef **siklik** DNA (cDNA) oluşturulmuş olur Daha sonra. cDNA templeyt olarak kullanılarak normal PCR işlemi uygulanır (Şekil 2.5).

PCR'ın değişik kullanım alanları olan tipleri bulunmaktadır. "Nested PCR", bir PCR ürününün hedef DNA olarak kullanımıyla başka bir PCR uygulanması demektir. **Multipleks** PCR, birden fazla hedef DNA'nın birden fazla primer çifti kullanımı ile aynı anda çoğaltılması için yapılan PCR işlemidir. Kompetitif PCR bir çift primer ile hedef DNA ve başka bir DNA'nın amplifikasyon için yarıştırlmasıdır.

Siklik: Çember şeklinde veya yuvarlak yapılı anlamındadır.

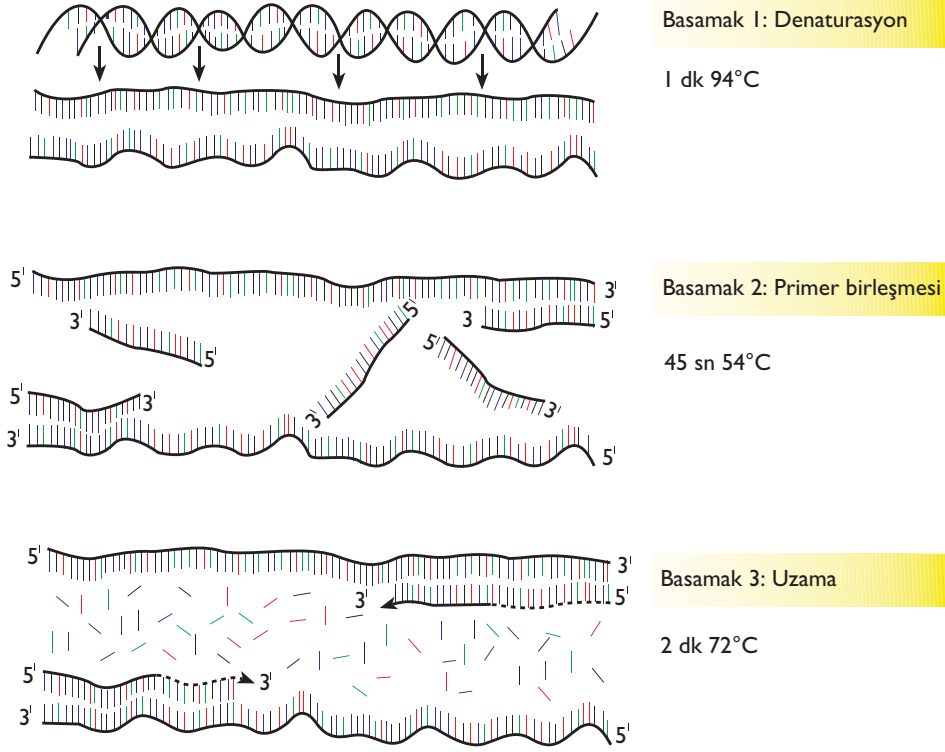
Multipleks: Bu kelime multiple kelimesinden köken almıştır. Multiple çoklu veya birden fazla anlamına gelir.

Şekil 2.5

PCR aşamaları

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

30-40 siklus 3 basamak tekrarlanır:



Özet



Bakterilerin kromozomal DNA'sının yapısını tanımlamak.

Bakterilerde kromozomal DNA çift sarmallı bir yapıdır. DNA'da adenin ve timin ile guanin ve sitozin nükleotid bazları karşı karşıya gelerek hidrojen bağlarıyla birbirlerine bağlanırlar. Bu nükleotidler birer deoksiriboz şekeri molekülü ile birleşmişlerdir. DNA molekülü bu şekerlerin birbirine fosfat-şeker köprüleriyle bağlanmasıyla uzar. DNA'nın yeniden kopyalanması replikasyon diye adlandırılır.



Bakterilerin DNA'sının replikasyon, transkripsiyon ve translasyon şeklini açıklamak.

Replikasyon için DNA'nın denature olması gerekir. Denaturasyonla tek zincirli hale gelen DNA'nın her zinciri bir kalıp olarak kullanılarak, yeni bir DNA molekülü sentezlenir. Bu işlemlerin her biri özel birer enzimatik süreçtir. Replikasyon süreci içinde bir DNA zincirinden bir master mRNA molekülü oluşturulur. Bu işleme transkripsiyon denir. Oluşan RNA'dan ise bakteri ribozomlarında ise polipeptid zincirleri sentezlenir. Polipeptidlerin bu oluşum sürecine de translasyon adı verilmektedir.



Bakterilerde gen mutasyonu anlamını ve türlerini açıklamak.

Bakterilerde DNA üzerindeki genlerde bazı değişimler olur. Bu değişimlere mutasyon denir. Mutasyon ile bakterinin görünen karakterlerinde değişim veya önemli genlerde oluşan mutasyonlarda bakterinin ölümü gözlenebilir. Bakterilerde mutasyonlar sadece bir veya birkaç nükleotid farklılaşmasından kaynaklanıyorsa bu tip mutasyonlara nokta mutasyonları adı verilir. Bazen mutasyonlar büyük gen bölgelerinin değişimi veya kaybolması şeklinde karşımıza çıkar. Gen kayıplarına delesyon denir. Büyük ölçekli mutasyonları oluşturan diğer işlemler ise insersiyon sekanası, transpozon gibi dış kaynaklı genetik yapıların kromozoma girmesiyle şekillenir. Bir başka mutasyon işlemi ise benzer kromozomal DNA'lar arasında bölgesel değişimlerdir. Bu tip mutasyonlara rekombinasyon denir.



Kromozom Dışı genetik yapılar ve önemlerini söylemek.

Bakterilerde kromozom dışında bir veya birden fazla genetik element bulunabilir. Örneğin plazmidler bunlardan biri olup, sirküler DNA yapısında ve kendini kopyalayabilen elemanlardır. Her bakteri DNA'sı replikasyonunda plazmidler de eş zamanlı olarak replike olur ve bakteriden bakteriyeye aktarılır. Plazmidler antibiyotik dirençliliği, bakteri virülens faktörleri gibi birçok bakteri karakterini kodlayan genetik yapılarıdır. Bir diğer ektrakromozomal genetik yapı ise bakteriyofaj DNA'sıdır. Plazmidler bir bakteriden diğerine konjugasyon ve transformasyonla aktarırlarken, fajlar aracılığı ile genetik madde aktarımı transdüksiyon ile şekillendirilir. Konjugasyon işlemi piluslar aracılığı ile plazmid aktarımı, transformasyon işe serbest bir DNA parçasının bakteriyeye direkt olarak girişi anlamına gelir.



Bakteriyolojide kullanılan önemli genetik tabanlı testlerin tanımlarını ve bazı uygulama alanlarını açıklamak.

Bakteriyolojide hastalık etkenlerinin klinik hasta örneklerinde aranması, izole edilen etkenlerin identifikasyonu ve etkenlerin genetik tiplendirilmesi amacıyla DNA tabanlı bazı testler uygulanmaktadır. Bunlarda PCR testi bakterilerin aranmasında ve tilendirilmesi amacıyla en sık kullanılan testtir. Bakteri kromozomunun veya ekstra kromozomal elementlerinin dizi analizlerinden mutasyon analizi ve bakterilerin genotiplendirilmesinde yararlanır. Plazmid profil analizi en basit ve ön fikir verici bir tiplendirme yöntemidir. Diğer bakteri tiplendirme yöntemleri olan PFGE ve RFLP sırasıyla incelenen tüm bakteri DNA'sı ve bir gen bölgesinin özgün restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek uygulanır.

Kendimizi Sıyalım

- DNA yapısında her bir amino asidi kodlayan nükleotid baz dizisi birimine ne ad verilir?
 - Nukleozom
 - Ribozom
 - Kodon
 - Lizozom
 - Templeyt
- Bir DNA'da bir gen bölgesinin kaybı şeklinde gözlenen mutasyona ne ad verilir?
 - Nokta mutasyonu
 - Anlamli Bölge Mutasyonu
 - İnsersiyonel Mutasyon
 - Delesyon
 - Komplementasyon
- Transdüksiyon işleminde bakteriler arasında DNA aktarımı nasıl oluşur?
 - Fajlar aracılığı ile oluşur.
 - Plazmidler ve piluslar aracılığıyla oluşur.
 - Transpozonlar yardımıyla şekillenir.
 - Çıplak DNA'nın direkt olarak bakteri membranından girişiyle oluşur.
 - Bakteri membranının elektrik akımıyla geçirgenliğinin artırılmasıyla meydana gelir.
- Bakterilerdeki piluslar aracılığıyla olan genetik maddede aktarımına ne ad verilir?
 - Tranformasyon
 - Rekombinasyon
 - Transdüksiyon
 - Replikasyon
 - Konjugasyon
- Aslında konjugasyonu uyarmayan bir genetik element olan transpozon, hangi bakteride bu duruma neden olur?
 - E.coli*
 - E.faecalis*
 - Streptomiçes*
 - Bacteriodes*
 - Pseudomonas aeruginosa*
- Bir bakterinin tüm DNA'sının restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilerek ve özel bir elektroforez işlemi uygulanarak yapılan genetik analize ne ad verilir?
 - PFGE
 - RFLP
 - PCR
 - Plazmid Profili tayini
 - Dizi analizi
- Ribotiplendirme hangi tekniğin yaygın kullanımıyla yapılan bir işlemdir?
 - PFGE
 - RFLP
 - PCR
 - Plazmid Profil Tayini
 - Dizi analizi
- RNA'nın özel enzimlerle siklik DNA'ya çevrilerek uygulanan PCR işlemine ne ad verilir?
 - Real-Time PCR
 - Reverse Transkriptaz PCR
 - Nested PCR
 - Multipleks PCR
 - Kompetitif PCR
- Bir PCR sonucu oluşan DNA ürününe ne ad verilir?
 - Amplikon
 - Primer
 - Polimeraz
 - Denaturasyon
 - Templeyt
- Hibridizasyon yönteminde kullanılan ve denature durumdaki hedef DNA'ya bağlanma yetisindeki tasarlanmış işaretli DNA parçacıklarına ne ad verilir?
 - Primer
 - Templeyt
 - Nükleotid
 - Konjugat
 - Prob

Kendimizi Sınavalım Yanıt Anahtarı

1. c Yanıtınız yanlış ise “Transkripsiyon ve Translasyon” konusunu yeniden okuyunuz.
2. d Yanıtınız yanlış ise “Büyük DNA Parçalarında Oluşan Değişimlere Bağlı Versiyonlar” konusunu yeniden okuyunuz.
3. a Yanıtınız yanlış ise “Ekstrakromozomal Genetik Elementler ve Yatay Gen Transferi” konusunu yeniden okuyunuz.
4. e Yanıtınız yanlış ise “Ekstrakromozomal Genetik Elementler ve Yatay Gen Transferi” konusunu yeniden okuyunuz.
5. b Yanıtınız yanlış ise “Ekstrakromozomal Genetik Elementler ve Yatay Gen Transferi” konusunu yeniden okuyunuz.
6. a Yanıtınız yanlış ise “Elektrik Vurumlu Saha Jel Elektrofrezisi (Pulsed Field Gel Electrophoresis; PFGE)” konusunu yeniden okuyunuz.
7. b Yanıtınız yanlış ise “Özgün Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)” konusunu yeniden okuyunuz.
8. b Yanıtınız yanlış ise “Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri” konusunu yeniden okuyunuz.
9. a Yanıtınız yanlış ise “Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri” konusunu yeniden okuyunuz.
10. e Yanıtınız yanlış ise “Nükleik Asit Hibridizasyonu” konusunu yeniden okuyunuz.

Sıra Sizde Yanıt Anahtarı

Sıra Sizde 1

RNA yapısı DNA'ninkinden daha farklıdır. Yapısında bulundurduğu şeker deoksiriboz yerine riboz'dur. RNA molekülünde DNA'daki timin yerine urasil yer alır. DNA'daki gibi RNA molekülünün komplementeri yani tamamlayıcısı bir karşı sarmal olmadığından normal olarak tek zincirlidir. RNA'nın bakteri içinde bulunan özel formları olan transfer RNA ve ribozomal RNA'larda bazı bölgelerinde çiftleşmiş (dubleks) baz çiftleri oluşur.

Sıra Sizde 2

Transkripsiyon işlemi sonunda DNA'dan mRNA meydana gelir. Translasyon işlemi ise ribozomlarda mRNA'dan polipeptid zincirlerinin sentezi ile sonuçlanır.

Sıra Sizde 3

İnsersiyon sekansları ve transpozonlar DNA'ya girerek mutasyonlar oluşturan genetik elemntlerdir. IS'ları girdikleri bölgedeki genin görevinin inkative edilmesine yol açarlar. Transpozonlar ise genellikle çoklu antibiyotik dirençliliklerini bakterilerde taşıyan genetik maddelerdir. Bunlar da IS'ları gibi genlerde inaktivasyon şekillendirirler.

Yararlanılan Kaynaklar

- Agrawal, S. (2008). **Techniques in Molecular Biology**, Delhi.
- Clack, D.P. (2010). **Molecular Biology**, San Diego.
- Dale, J.W., Park, S.F. (2004). **Molecular Genetics of Bacteria**, West Sussex.
- Dale, J.W., Von Schantz, M. (2007). **From Genes to Genomes**, West Sussex.
- Fitzgerald-Hayes, M., Reichsman F. (2010). **DNA and Biotechnology**, London.
- Levin, R.W. (2010). **Rapid Detection and Characterization of Foodborne Pathogens by Molecular Techniques**, New York.
- MacKay, I.M. (2007). **Real-Time PCR in Microbiology**, Norfolk
- Schumann, W. (2006). **Dynamics of the Bacterial Chromosome**, Weinheim.
- Syvanen, M., Kado, Clarence, I.K. (2002). **Horizontal Gene Transfer**, London.

3

Amaçlarımız

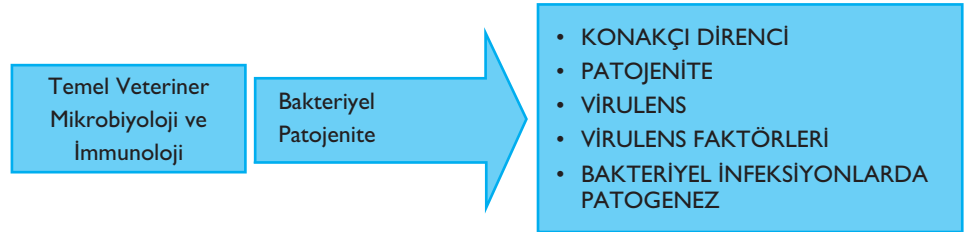
Bu üniteyi tamamladıktan sonra;

- 👁️ Konakçı direncini tanımlayabilecek, konakçı direncinin önemli unsurlarını sıralayabilecek,
- 👁️ Patojeniteyi ve virulensi tanımlayabilecek, virulens faktörlerini açıklayabilecek,
- 👁️ Bakteriyel patogenezinin aşamalarını açıklayabileceksiniz.

Anahtar Kavramlar

- Doğal direnç
- Spesifik bağışıklık
- Patojen bakteri
- Virulens faktörleri
- Fimbrial adezin
- Ekzotoksin
- Endotoksin
- Adezyon
- İnvazyon
- Ekzotoksijenik mekanizma
- Endotoksijenik mekanizma

İçindekiler



Bakteriyel Patojenite

KONAKÇI DİRENCİ

Bakterilerin duyarlı bir konakçıda hastalık oluşturabilmesi için vücuda girmesi, üremesi, yayılması ve toksin salgılaması gerekir. Konakçı ise sahip olduğu savunma mekanizmaları ile bakteriye karşı koyarak hastalık oluşumunu engellemeye çalışır. Bakteriyel infeksiyonlara karşı konakçı direnci başlıca iki temel korunma mekanizması tarafından sağlanır. Bunlar doğal direnç ve kazanılan bağışıklıktır. Doğal direnç vücudun bakteriye karşı gösterdiği ilk savunma mekanizmasıdır ve kazanılan bağışık ile karşılaştırıldığında farklı özelliklere sahiptir. Bu farklılıklar şöyle sıralanabilir:

1. Doğal direncin etkisi hızlı (birkaç saat) bir şekilde gelişir, kazanılan bağışıklığın etkisi ise yavaştır, günler haftalar geçmesi gerekir.
2. Doğal direncin etkisi nonspesifiktir, kazanılan bağışıklık ise spesifiktir, yani bakteriye özgü etki gösterir.
3. Vücut aynı bakteriye tekrar maruz kaldığında doğal direncin etkisi aynıdır, artmaz, kazanılan bağışıklığın etkisi ise artar.

Doğal Direnç

Herhangi bir bakteri ile temas olmaksızın tamamen konakçının anatomik ve fizyolojik yapısından kaynaklanan spesifik olmayan bir savunma mekanizmasıdır. Doğal direnci oluşturan faktörlerin başında genetik özellikler gelir. Genetik özellikleri nedeniyle bazı hayvan ırkları bazı hastalıklara yakalanmaz. Örneğin koyunlar Antraks hastalığına duyarlı oldukları halde Cezayir koyunları bu hastalığa genetik olarak dirençlidir. İnsanlarda görülen birçok hastalığın (kızıl, boğmaca vb.) hayvanlarda görülmemesi de türlere bağlı bir genetik direnç örneğidir. Aynı tür ve ırkın farklı bireyleri arasında da genetik faktörler yanı sıra bakım besleme barınma farklılıkları nedeniyle hastalıklara direnç ya da duyarlılık gelişebilir.

Doğal direnci, vücut ısısı, hormonlar vb. gibi fizyolojik özellikler de etkilemektedir. Örneğin kanatlılar vücut ısılarının yüksekliği nedeniyle memelilerde görülen hastalıklara direnç gösterirler, benzeri şekilde balıkların hastalıkları da sıcakkanlı hayvanlara bulaşmamaktadır. Tiroksin, steroid ve östrojen gibi hormonların düşük dozları bağışıklığı uyarırken yüksek dozdaki steroid, testosteron ve progesteron bağışıklığı baskılayıcı etki gösterir. Steroid düzeyi stres altındaki hayvanlarda artar ve onları infeksiyona duyarlı hale getirir.

Sebum: Derideki yağ bezlerinin salgısı.

Silia: Bazı epitel hücreler üzerinde bulunan kirpiksi yapılar

Kolon: Kalın bağırsağın rektumdan önceki bölümü

Doğal direncin oluşmasına yardımcı olan ve vücudu dışarıdan girecek bakterilere karşı koruyan dış (birincil) ve iç (ikincil) savunma sistemleri mevcuttur. Dış savunma sistemi vücudun fiziksel ve mekanik bariyerlerinden ve bu bariyerlerin etkisini destekleyen çeşitli antimikrobiyel salgılardan oluşur. Örneğin derinin, vücutta mikroorganizmaların girmesini engeleyen tüyler ve epitel örtüsü gibi fiziksel yapısı yanı sıra ter ve **sebum** gibi salgıları mevcuttur. Bu salgılar, antimikrobiyel etkisi olan laktik asit ve serbest yağ asitleri içerir. Derinin düşük pH'ya ve normal komensal bakteriyel floraya sahip olması da patojen bakterilerin vücuda girişini engelleyen faktörlerdir. Mukoza da yüzeyinde bulunan mukus tabakası ve bazı mukozal yüzeylerde bulunan silialı hücreler sayesinde vücudu bakterilerden koruyabilir.

Üst ve alt solunum sisteminde bulunan **silialı** epitel hücreleri ve mukus tabakası birlikte önemli bir koruyucu etkiye sahiptir. Burun boşluğu, ağız ve soluk borusunda bakteri taşıyan partikülleri yakalayarak öksürük ve tıksırık ile dışarı atılmasını sağlar. Sindirim sisteminde tükürükte bulunan lizozim, laktoferrin ve peroksidaz, midede bulunan asidik ortam (pH 2-3), ince bağırsaklardaki proteolitik etkili lizozim enzimi, safra ve pankreatik enzimler bakterileri yok edici etkiye sahiptir. Ayrıca bağırsaklardaki kriptin adı verilen peptitler mekanizması tam olarak bilinmeyen bir şekilde bazı bakteriler üzerine toksik etki gösterir. **Kolondaki** normal mikrobiyel florada bulunan Gram negatif bakterilerin ürettiği bakteriyosin ya da yağ asitleri istenmeyen bakterilerin yerleşimini engeller. Dışkılama da sindirim sisteminde istenmeyen bakterileri vücuttan uzaklaştıran önemli bir mekanizmadır.

Üriner sistem, idrar boşaltımı ve idrarın asit yapısı nedeniyle bakterilerin invazyonundan korunur. Genital sistemde vaginanın dayanıklı epitelyum yapısı, düşük pH'sı ve salgıda bulunan laktik asit, bakterilerin girişini engelleyen önemli bir bariyerdir.

Gözlerde gözyaşı bir yandan mekanik olarak gözü temizlerken diğer yandan içerdiği çok miktardaki lizozim sayesinde bakterileri lize eder. Lizozim serebrospinal sıvı, ter ve idrar hariç tüm vücut sıvılarında bulunur ve bakterilerin hücre duvarında bulunan peptidoglikan tabakasını bozarak antibakteriyel etki gösterir. Vücutta lizozim gibi antibakteriyel etki gösteren doğal antimikrobiyel moleküller mevcuttur. Bunlardan oleik asit gibi doymamış yağ asitleri bakterisidal etki gösterirken doymuş yağ asitleri ise fungisidal etkilidir. Ayrıca doğal antibakteriyel moleküllerden peptit ve protein lizin ve arjininden zengin yapıları sayesinde bakterileri öldürür. Doğal direncin nonspesifik bir unsuru olan lektin gibi karbonhidrat bağlayıcı proteinler de bakterilerin karbonhidrattan zengin hücre duvarlarını yıkıma uğrattırır.

SIRA SİZDE



Bakterisidal ve fungisidal etki ne demektir?

Konakçı vücudunun dış (birincil) savunma sistemini aşmayı başaran bakteriler ikincil savunma hattı olan iç savunma sistemi ile karşılaşır. Memelilerde iç savunma sistemi kan ve çeşitli vücut sıvılarındaki antimikrobiyel sıvısal moleküller ve fagositik hücrelerden oluşur. Kan ve vücut sıvılarındaki antimikrobiyel sıvısal moleküller "humoral faktörler" olarak da adlandırılır. Humoral faktörler; properdin, interferon, defensinler, doğal antikorlar ve komplemandır. Properdin serumda bulunan bir proteindir. İnterferon vücutta infeksiyondan sonra çeşitli hücrelerce salgılanır ve indirekt yolla (vücuttaki öldürücü hücreleri aktive ederek) antimikrobiyel etki gösterir. Defensinler, bağırsak, karaciğer hücreleri ve diğer birçok vücut hücresi tarafından sentezlenirler. Doğal antikorlar spesifik olmayan ve kökeni tam olarak bilinmeyen zayıf etkili moleküllerdir ve sağlıklı bireylerin kanında bulunurlar.

Komplement sistemi ise kan serumunda bulunur ve zincirleme reaksiyonlar sonucu aktive olarak bakterileri indirekt yollarla yok eden komponentlerden oluşur.

Vücutta iç savunma sisteminin önemli bir diğer unsuru hücresel faktörlerdir. Çoğunluğu kanda bir kısmı da dokularda bulunan bu hücreler içinde monositler, granulositler, mast hücreleri, lenfositler, doğal öldürücü (NK) hücreler, lenfokinle aktive olan öldürücü hücreler (LAKC), makrofajlar ve benzer hücreler bulunur. Monosit, makrofaj, granulosit ve trombositler bakteriler ile yangısal reaksiyonlara girerek mücadele ederler. Nötrofil, euzinofil ve makrofaj gibi fagositik hücrelerin de iç savunma hattında önemli bir rolü vardır. Bu hücreler bakterileri fagosite ederek konakçı savunmasına katkıda bulunurlar.

Fagositoz ne demektir?



Kazanılan Bağışıklık (Spesifik İmmunite)

Konakçının doğal savunma sistemini aşmayı başaran mikroorganizmalar immun-sistem hücreleri ile karşılaşılır ve bu hücrelerin aktivitesi sonucu vücutta aynı mikroorganizmalara spesifik bir direnç gelişir. Bu direnç kazanılan bağışıklık yada spesifik immunité olarak adlandırılır. Kazanılan bağışıklık, aktif ve pasif bağışıklık olmak üzere iki şekilde meydana gelir. Değişik patojeniteye sahip hastalık etkenlerine karşı vücutta meydana gelen bağışıklık “doğal aktif bağışıklık” olarak; aşılardan vücutta oluşturulan bağışıklık ise “yapay aktif bağışıklık” olarak adlandırılır. Pasif bağışıklık ise başka bir hayvanda oluşan ya da üretilen antikorların normal ya da hasta hayvanlara verilmesi ile oluşturulan koruyucu etkisi uzun sürmeyen bir bağışıklık türüdür. Pasif bağışıklık da doğal ve yapay olarak iki şekilde oluşturulabilir. Bağışık bir anneden yavruya plasenta ya da kolostrumla antikor geçişi “doğal pasif bağışıklık” olarak adlandırılır. “Yapay pasif bağışıklık” ise bazı hastalıkların tedavisi amacıyla başka hayvanlarda üretilen bağışık serumun hasta hayvanlara verilmesi ile oluşturulur.

Hayvanlarda ve insanlarda kazanılan bağışıklık vücudun immun sistem hücrelerinin işbirliği ile meydana gelir ve humoral (sıvısal) ya da hücresel(selüler) bağışıklık olmak üzere iki farklı şekilde gelişir. Humoral ve hücresel bağışıklık ileriki bölümlerde ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

PATOJENİTE

Bakteri, virus ya da mantarların hastalık oluşturabilme yeteneğine “patojenite” denir. Hayvanlarda ve/ya da insanlarda hastalık oluşturabilme yeteneğine sahip bakterilere de “patojen bakteriler” denir. Patojen bakterilerin konak hücreye tutunma, konak hücre ve dokuları invaze etme, toksin salgılama ve konağın immun sisteminden kaçabilme gibi özelliklerinin olması gerekir. Konakçıda girdikleri bölgede sınırlı kalan lokal infeksiyonlar ya da kan ve lenf yoluyla vücuda yayılarak bir veya birkaç sistemde bozukluklar oluşturabilirler. Vücuda yayılan böyle infeksiyonlara “sistemik” ya da “generalize” infeksiyonlar denir. Patojen bakteriler kesinlikle sağlıklı bireylerde flora etkenleri gibi normal olarak bulunmazlar ve sağlıklı bir bireye girdiklerinde infeksiyon ya da hastalık oluştururlar. Hayvanlarda çok önemli hastalıklara neden olan *Bacillus anthracis*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Mycobacterium bovis*, *Yersinia pestis* gibi bakteriler patojen bakterilere örnek olarak verilebilir. Hayvan ve insan vücudunda hastalık oluşturmaksızın bulunan bakteriler de vardır, bunlar normal florayı oluştururlar ve “apatojen bakteriler” olarak isimlendirilirler. Ancak normal flora içinde bulunan apatojen bakterilerden bazıları

rı konakçı direncinin bozulduğu durumlarda hastalığa sebep olabilir, bunlara da “fırsatçı patojen bakteriler”, “fakültatif patojenler” ya da “opportunist bakteriler” denir. *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pasteurella* türleri fırsatçı patojen bakterilerdir. Böyle bakteriler, konakçı direnci güçlü olan sağlıklı bireylerde kesinlikle hastalık oluşturmazlar.

Fırsatçı patojen bakterilerin de patojen bakteriler gibi hastalık oluşturmaları hastalığa neden olan gerçek etkenin ortaya konulması gerekliliğini düşündürmüştür ve bu durumu 19. Yüzyılda Robert Koch çözümlenmiştir. Robert Koch, bir bakteriye hastalık etkenidir denilebilmesi için bunun ispatlanması ve konfirme edilmesi gerektiğini belirtmiş, bunun için de bazı kriterler tanımlamıştır. Bu kriterlere “Koch Postulatu” denir. Koch postulatına göre;

1. Hastalık etkeni olduğu düşünülen mikroorganizma hasta bireyden izole edilmeli ve saf kültür olarak elde edilmeli,
2. Elde edilen mikroorganizma duyarlı deney hayvanlarına inokule edildiğinde aynı hastalığı oluşturmali,
3. Aynı mikroorganizma deneysel olarak hastalandırılan denekten tekrar izole edilebilmelidir.

Koch postulatlarına daha sonra konakçıda oluşan antikor yanıtının araştırılması ve izole edilen etkenin virulens faktörlerinin araştırılması gerekliliği de kural olarak eklenmiştir.

VİRULENS

Patojen bakterilerin hastalık oluşturma yeteneğinin derecesi ya da gücü “virulens” olarak tanımlanır. Virulensi yüksek olan bakteriler vücuda az miktarda girseler bile hastalık oluşturabilirler, bu tür bakterilere “virulent bakteriler” denir. Virulensi düşük olan bakterilerin hastalık oluşturabilmesi için vücuda oldukça yüksek dozda girmesi gerekir ya da konakçının immun sisteminin baskılanmış olması gerekir. Fırsatçı patojenler virulensi düşük bakterilere iyi bir örnektir. Virulens, invazyon kabiliyeti ve toksijeniteyi de içerir. Yani virulent bir bakteri konak hücreye girer, iç katmanlara doğru invaze olur, ulaştığı yerde çoğalır, bazıları toksin salgılar, doku içine yayılır ya da lenf ve kan dolaşımına geçerek tüm vücuda yayılır. Virulent bakteri vücutta tüm bu etkileri oluştururken bir yandan da konakçının savunma sistemine karşı koyar ve bu şekilde hastalık oluşturur. Bakteriye bu yeteneği kazandıran, yapısında mevcut olan ya da ürettiği bir takım moleküllerdir ki bunların hepsine birden “virulens faktörleri” denir.

VİRULENS FAKTÖRLERİ

Adezyon Faktörleri

İnfeksiyonun ilk basamağı olan bakterinin konakçı vücuduna girişinden sonra bakteri konak hücreye bağlanarak tutunur, bu olaya “adezyon” denir. Bakterinin konak hücrede bulunan spesifik reseptörlere bağlanmasını sağlayan moleküllerine “adezyon molekülleri” ya da “adezyon faktörleri” denir. Bakterilerdeki adezyon faktörleri arasında fimbria adı verilen özel yapılar bulunur, bunlara “fimbrial adezinler” denir (Resim 3.1). Fimbrialar adezyon ve kolonizasyon faktörleridir, konjugasyonu sağlayan seks pilusundan farklı yapılarıdır. Ayrıca bazı bakterilerde fimbria yerine hücre yüzeyinde bulunan ve adezyonu sağlayan özel moleküller bulunur. Bunlara da “afimbrial adezinler” adı verilir. Fimbrial adezinler *Escherichiae coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae* gibi bakterilerin önemli viru-

lens faktörleridir. *E.coli*'nin fimbrial adezinleri FimH, PapG, SfaS, PrsG gibi harflerle kodlanmıştır. *Haemophilus influenzae*'nin fimbrial adezini HifE, *K. pneumoniae*'nin ise MrkD olarak isimlendirilmiştir. *Haemophilus influenzae*'nin HmV1/HmV2, Hia gibi isimler alan afimbrial adezinleri de vardır. *Staphylococcus aureus* (Fnba, Fnbb), *Bordetella pertussis* (PHA, Pertactin) ve daha birçok bakteri afimbrial adezinleri aracılığıyla konak hücrelere tutunurlar.

Bakterilerde bulunan glikokaliks yada kapsül, S katmanı, Slime tabaka (mukoid yapı), M proteini, teikoik ve lipoteikoik asit gibi yapılar da adezyon molekülleri gibi görev yaparlar. Kapsül bir yandan konakçı hücrelerine adezyonu sağlarken diğer yandan fagositozu inhibe ederek infeksiyonun gelişiminde önemli rol oynar. Kapsül bakterilerde çok önemli bir virulens faktörüdür, öyle ki kapsülünü kaybeden bazı bakteriler, örneğin *Streptococcus pneumoniae*, konakçı savunma sistem hücrelerince hızlı bir şekilde öldürülür. S katmanı bazı bakterilerde hücre duvarı dışında yer alan bir yapıdır. Konak hücreye adezyonu sağlamak dışında bakteriyi konakçı savunma sistemine karşı koruyarak virulensini arttıran bir faktördür. Slime tabaka denilen yapı hücre dışında yer alan, kolaylıkla ayrılabilen, dayanıksız ince bir zarıdır. Teikoik ve lipoteikoik asitler ise Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı komponentlerinden olan adezyon molekülleridir.

İnvazyon Faktörleri

Bakterilerin konakçı hücreye veya dokulara girişi ve yayılışı infeksiyonun “invazyon” safhasıdır. Bu safhada da bakterilerin “invazyon faktörleri” görev alır. Bakterilerde görülen belli başlı invazyon faktörleri şunlardır:

Koagulaz

Plazmadaki fibrinojeni koagule eden (pıhtılaştırıcı) *Staphylococcus aureus* tarafından sentezlenen bir enzimdir. Bu pıhtı, etkeni fagositozdan ve konakçının savunma sisteminden korur.

Kollajenaz

Vücudun bağlayıcı sisteminde (kas, iskelet, kıkırdak) bulunan kollajen yapıyı parçalayan bir enzimdir. *Klostridium* türleri tarafından sentezlenir.

Deoksiribonukleaz

Vücutta yangı ve infeksiyon durumunda oluşan eksudatın içindeki ölü fagositlerin DNA' sını eriterek içlerindeki bakterilerin dokulara yayılımını kolaylaştırır. A grubu Streptokoklar, Stafilokoklar ve *Klostridium*lar tarafından sentezlenen bir enzimdir.

Elastaz ve Alkalın Proteaz

Pseudomonas aeruginosa tarafından sentezlenen, hücrelerarası membran proteinlerini parçalayan bir enzimdir.

Sitolizin

Hücreleri eriten enzimlere genel olarak “sitolizin” denir. Streptokok, Stafilokok türleri ve *Escherichia coli* başta olmak üzere birçok bakteri tarafından sentezlenen ve alyuvarları eriten enzim “hemolizin”dir. Yine Streptokok ve Stafilokok türleri tarafından sentezlenen “lökositidin” enzimi ise konakçı savunmasında aktif rol oynayan lökositleri lize eder.

Hyaluronidaz

Streptokoklar (A,B,C ve G grup), Stafilokoklar ve Klostridiumlar tarafından sentezlenen bir enzimdir, konakçı bağ dokusundaki hyaluronik asidi bozarak infeksiyonun dokulara yayılmasını sağlar.

Hidrojen peroksit (H₂O₂) ve Amonyak (NH₃)

Mikoplazma ve Ureaplazma türlerinin toksik etkili metabolik ürünleridir. Solunum ve urogenital sistemdeki epitel hücreleri hasara uğrattırır.

İmmunoglobulin A1 (IgA1) proteaz

İmmunoglobulin A1 konakçıda mukoza altındaki plazma hücrelerince salgılanan ve mukozal yüzeylerde bulunan bir antikordur. *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* gibi bakteriler salgıladıkları proteaz enzimleri ile IgA1' i parçalayarak yok ederler.

SIRA SİZDE



Antikor ne demektir, görevi nedir?

Lesitinaz ya da Fosfolipaz

Klostridium türleri tarafından sentezlenen bu enzim hücrelerin plazma membranında bulunan lesitini parçalar böylece etkenin kolayca yayılımını sağlar.

Streptokinaz (Fibrinolizin)

Stafilokoklar ve A,C,G grubu Streptokoklar tarafından sentezlenen bir enzimdir. Bu enzimin pıhtılaşmış plazmayı eritici etkisi vardır, böylece bu bakterilerin dokularda yayılması kolaylaşır.

Antifagositik Faktörler

Birçok bakteri lökosit ve makrofajlar tarafından fagosite edilerek yok edilmeye çalışılır. Kapsüllü birçok bakteri daha virulent ve fagositoza daha dirençlidir. Ayrıca serumun bakterisit etkisine de kapsül sayesinde direnç gösterirler. *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Neisseria meningitidis* gibi birçok bakteri yapısında bulunan kapsülleri sayesinde fagositoza direnç gösterirler. Bunun gibi *Streptococcus pyogenes*'in hücre duvarı yapısında bulunan M proteini, *Neisseria gonorrhoeae*'nin pilileri, *S.aureus*' un yüzey protein A yapısı ve gram pozitif bakterilerin hücre duvarı yapısında bulunan teikoik ve lipoteikoik asit molekülleri de fagositozu engelleyen yapılarıdır.

Toksinler

Bazı bakteriler tarafından vücut içinde ya da vücut dışında meydana getirilen zehirli moleküllere genel olarak "toksin" denir. Bakterinin toksin sentezleme yeteneğine ise "toksijenite" adı verilir. Toksijenite bakterinin virulensini arttıran önemli bir faktördür. Toksinler nedeniyle vücutta meydana gelen hastalık durumuna "intoksikasyon", toksinin kanda bulunma durumuna ise "toksemi" denir. Bazı toksinler öyle etkilidir ki hastalığı oluşturan bakteri tedavi edilse bile toksininin vücutta ki etkisi devam eder. Bakteriler tarafından oluşturulan toksinler ekzotoksinler ve endotoksinler olmak üzere başlıca iki gruptur. Ekzotoksinler bakterilerin dış ortama salgıladıkları **ekstraselüler** yapılarıdır. Endotoksinler ise hücre duvarı yapısında bulunur ve bakteri parçalandığında açığa çıkar. Endotoksinler ve ekzotoksinlerin başlıca özellikleri karşılaştırmalı olarak Tablo 3.1'de verilmiştir.

Ekstraselüler: Hücre dışı.

Ekzotoksin	Endotoksin
Protein (polipeptid) yapısındadır	Lipopolisakkarit yapısındadır
Canlı bakterilerden salınır	Bakterinin ölümünden sonra ya da (az bir kısmı) üremeleri esnasında ortaya çıkar
Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler tarafından sentezlenirler	Sadece Gram negatif bakterilerde vardır
Farklı toksinlerin konakçıya etki şiddetleri farklıdır	Tüm endotoksinler benzer şiddette etkilidirler
Isıya dayanıksızdır, 60°C nin üstünde hızla harap olur	250°C ye dek ısıya dayanıklıdır
Antijenik özelliği kuvvetlidir, vücutta antitoksin oluşturur, antitoksin koruyucudur	Zayıf derecede immunojenidir
Yüksek derecede toksiktir, nanogram miktarlarında bile öldürücüdür	Orta derecede toksiktir, 10-100 mikrogram miktarı etkili olur
Toksoid hale dönüşür (ısı, formalinin vb ile)	Toksoid hale dönüşmez
Konak hücrede spesifik reseptörlere bağlanır	Hücrelerde spesifik reseptörleri bulunmaz
Genellikle konakçıda ateş oluşturmaz	Ateş oluşturur
Genellikle ekstrasözomal genlerle yönetilirler	Kromozomal genlerle yönetilirler

Tablo 3.1
Ekzotoksin ve endotoksinlerin özellikleri

Ekzotoksinler

Ekzotoksinler Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerce sentezlenen, ısıya duyarlı (60-80°C de inaktif olurlar), protein yapıda (çok az bir kısmı enzim yapısında), eriyebilir substanslardır. Ekzotoksinler bilinen en öldürücü moleküllerdir. Protein yapıları ekzotoksinlere yüksek düzeyde immunojenite özelliği kazandırır. Yani konakçının spesifik immun sistemini uyatarak “antitoksin” olarak adlandırılan antikorların oluşumunu sağlarlar. Antitoksinler intoksikasyon veya toksemilerde tedavi amacıyla kullanılırlar. Toksin proteinleri formaldehit iodin vb. bazı kimyasallar ile inaktive edilebilirler, toksinlerin bu formuna “toksoid” denir. Toksoid immunojeniktir yani immun sistemi uyarıcı etkisi vardır bu nedenle toksoidler tetanoz gibi bazı hastalıklarda aşı olarak kullanılırlar.

Ekzotoksinler yapılarına ve fizyolojik etkilerine göre; 1-AB tip ekzotoksinler, 2-Spesifik doku ekzotoksinleri, 3-Membran parçalayıcı ekzotoksinler ve 4-Süperantijenler olmak üzere dört gruptur. Ekzotoksinlerin A ve B olmak üzere, birbirine disülfid bağları ile bağlanmış olan iki bölümü bulunur. Toksik etkili olan bölüm A, hücrelere bağlanmayı sağlayan bölüm ise B’ dir. Bu ekzotoksinler “AB tip toksinler” olarak adlandırılırlar. AB tip toksinlerin çoğunu da kapsayan “spesifik doku ekzotoksinleri” adı verilen diğer bir grup ekzotoksin de vücutta etkiledikleri doku/hücre yada organlara göre isimlendirilirler. Örneğin sinirleri etkileyenlere “nörotoksin”, bağırsakları etkileyenlere “enterotoksin”, dokuları etkileyenlere “sitotoksin”, karaciğeri etkileyenlere “hepatotoksin”, böbreği etkileyenlere “nefrotoksin”, kalbi etkileyenlere ise “kardiyotoksin” adı verilir.

AB tip ve/veya spesifik doku ekzotoksinleri grubunda yer alan bazı ekzotoksinler ve vücuda etkileri şöyledir:

1. Antraks toksini: *Bacillus anthracis* tarafından sentezlenir, vücutta lokalize ödemler oluşturur, hedef hücrelerde ölüme neden olur.

2. Botulinum toksini: *Clostridium botulinum* tarafından sentezlenen, kaslarda yumuşak felçlere sebep olan bir nörotoksindir.
3. Kolera toksini: *Vibrio cholera* tarafından salgılanan, ishal, asidoz ve dolaşım bozukluğuna neden olan bir enterotoksindir.
4. Difteri toksini: *Corynebacterium diphtheriae* tarafından sentezlenen, konakçı hücrede protein sentezini inhibe ederek hücre ölümlerine sebep olan bir sitotoksindir.
5. Enterotoksinler: *Clostridium perfringens*, *E.coli*, *S.aureus* türleri tarafından sentezlenen kusma ve ishallerine sebep olan toksinlerdir.
6. Bordetella adenilat siklaz toksini: *Bordetella* türleri tarafından sentezlenen toksin hücrelerde yapı ve fonksiyonu bozar, ölüme sebep olur.
7. Shiga toksin: *Shigella dysenteriae* toksinidir, protein sentezini engelleyerek hücre ölümüne sebep olur.
8. Shiga like toksin: *Shigella türleri ve E.coli* tarafından sentezlenen shiga toksin gibi etki gösteren bir ekzotoksindir.
9. Tetanoz toksini: *Clostridium tetani* tarafından sentezlenen tetanospazmin isimli kaslarda spazm, sinir blokajı ve felç oluşturan bir nörotoksindir.
10. *Pseudomonas* ekzotoksin A: *Pseudomonas aeruginosa*'ın sentezlediği difteri toksini gibi etki gösteren bir ekzotoksindir.

Membran parçalayıcı ekzotoksinler, konak hücrenin içine girip plazma membranında delikler açarak ya da membran bütünlüğünü bozarak hücrenin parçalanmasına sebep olurlar. Streptokok, Stafilokok ve pnömokoklarca üretilen lökositinler lökositleri parçalayan ekzotoksinlerdir. Birçok patojen bakteri tarafından salgılanan hemolizinler eritrositleri parçalayarak etki gösterirler. *Streptococcus pyogenes* tarafından üretilen Streptolizin-O (SLO) kuvvetli bir hemolizindir. Fosfolipaz enzimi de membran parçalayıcı etkiye sahip bir ekzotoksindir. *Clostridium perfringens* alfa toksini fosfolipaz aktivitesi ile hücreleri lize eder ve öldürür.

Süperantijenler, çok küçük miktarı bile kuvvetli bir immun sistem uyarıcısı olan protein yapıda ekzotoksinlerdir, T hücrelerinden çok fazla miktarda sitokin salınımını uyarırlar ve endotel hücrelerde hasar, çoklu organ yetersizliği, hipotansiyon, sepsisemi, eklem yangıları, böbrek yangıları ve şok gelişimine neden olurlar. Stafilokoklarca sentezlenen enterotoksinler (SE-A, SE-B), eksfoliyatif toksin (ExF-T) ve Toksik Şok Sendrom Toksini (TSST-1), *Pseudomonas aeruginosa* ekzotoksini (PEA-A), *Mycoplasma arthritidis*'in MAM proteini süperantijenlere örnek olarak verilebilir.

Endotoksinler

Endotoksinler Gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan ısıya dayanıklı, lipopolisakkarit (LPS) yapılarıdır. Bakteri dışına salınmaz ancak bakteri öldüğünde açığa çıkarlar, çok az bir kısmı bakterinin üremesi esnasında serbest kalır. LPS' in toksik özellikte olan komponenti Lipid A olarak adlandırılır. Endotoksin zayıf immunojeniktir ancak konakçıda sistemik bozukluklar oluşturabilir. Bunlar; ateş, septik şok, damar içi kan pıhtılaşması, ishal, bağırsak kanamaları, yangı, halsizlik gibi belirtilerdir.

Sideroforlar

Demir, bakterilerin metabolizmaları ve üremeleri için gerekli bir gelişme faktörüdür. Konakçıda demir serbest değildir çeşitli doku, kan ve salgılarda bağlı halde bulunur. Kandaki demir hemoglobin ve transferrine, süt ve diğer salgılardaki demir ise laktoferrine bağlı olarak bulunur. Patojen bakteriler konakçıda canlı kala-

bilmek ve yayılabilmek için demiri bağlamak üzere çeşitli mekanizmalar geliştirirler. Bu mekanizmalardan biri de siderofor adı verilen düşük molekül ağırlıklı maddelerdir. Birçok patojen bakteri tarafından üretilen sideroforlar, laktoferrin ve transferrine bağlı demiri bile alarak bakteriye verebilirler. Bu nedenle siderofor bakterilerde önemli bir virulens faktörüdür. “Enterochelin” *Escherichia* ve *Salmonella* türleri tarafından üretilen bir siderofordur. Mikobakteri türleri tarafından salınan “exochelin” de siderofora diğer bir örnek olarak verilebilir.

BAKTERİYEL İNFEKSİYONLARDA PATOGENEZ

Hayvanlar yaşam boyu infeksiyon etkenleri ile karşılıklı etkileşim halindedir. Ancak yine de bu etkenler her zaman hayvanlarda hastalık oluşturmaz. Hastalık oluşumu için uygun şartların oluşması gerekir. Genel olarak konakçı direnci ile bakteriyel virulens arasındaki denge bozulduğunda infeksiyon için uygun şartlar oluşmuş olur. Bakteriler konakçı savunma sistemini aşıp vücuda girdiğinde infeksiyon oluşumunu başlatırlar. Her bakterinin vücuda giriş yolu farklıdır ve kendine özgüdür. Aynı şekilde her bakterinin vücut içinde kolonize olma, yayılma ve infeksiyon geliştirme mekanizması da değişir. Bununla birlikte bakteriyel infeksiyonun başlangıç ve gelişim aşamaları birbirine benzer basamaklardan oluşur. Bu basamaklar şöyle sıralanabilir:

1. Bakterinin konakçı vücuduna girişi
2. Konak hücreye tutunması (adezyon) ve iç katmanlara yayılması (invazyon)
3. Bakterinin üremesi
4. Konakçı hücrelerinde hasar oluşturması

Bakterinin Konakçıya Girişi (Bulaşma)

Bakterilerin vücuda girdikleri yer, hastalık meydana getirmelerinde ve tipik hastalık tablosunun oluşumunda önemli rol oynar. Bakteriler birçok farklı yolla konakçıya bulaşır. Belli başlı bulaşma yolları sindirim, solunum, direkt temas (deri, genital) ve indirekt temastır. Ayrıca artropodlar vb. vektörler de hastalığın bulaşmasında önemli rol oynar. Bazı bakteriler konakçıya tek bir yoldan değil birçok yoldan girerek hastalık oluşturabilirler. Örneğin *Brucella abortus* sindirim, deri, konjunktiva, genital mukozaya, meme ve solunum yolları ile girerek sığırlarda Bruselloz hastalığını oluşturur. Leptospiralar da sindirim, solunum, genital, konjunktiva, mukoz membranlar ve deri (suyla ıslanıp yumuşamış deri) gibi birçok yolla vücuda girebilirler. Bazı etkenler de tek bir yolla vücuda girerek hastalık oluştururlar. Örneğin Lyme hastalığını oluşturan *Borrelia burgdorferi* sadece kenelerin kan emmesi sonucu vücuda deri yoluyla girer ve sonrasında kan dolaşımına karışır. Bazı grup bakterilerin de tipik hastalık tablosunu oluşturabilmesi için belli yollarla vücuda girmesi gerekir. Örneğin Sığır Bulaşıcı Plöropnömonisi' nin etkeni olan *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides* SC solunum yoluyla bulaşır ve tipik hastalık tablosunu solunum sisteminde bozukluklar oluşturarak meydana getirir.

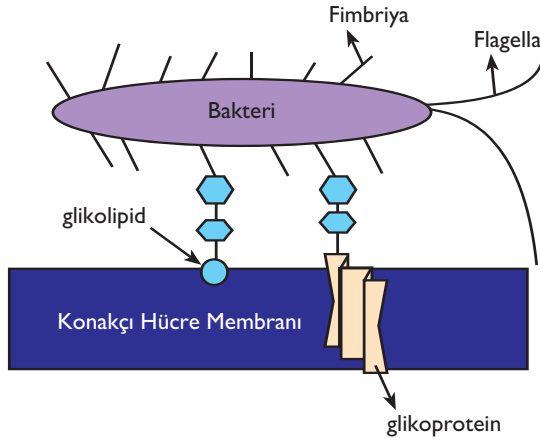
Adezyon ve İnvazyon

Bakteriler vücuda girdikten sonra konakçı hücrelerine fimbrial ya da afimbrial adezinleri (yüzey adezyon molekülleri) sayesinde tutunurlar. Bu olaya “adezyon” denir. Her bir bakterinin fimbrial ve afimbrial adezinler ile bağlanması için konakçı hücrede özel reseptörler bulunur, yani konak hücre reseptörü ile bakteri arasında spesifik bir ilişki vardır. Fimbrial adezinler konakçı hücre yüzeyinde bulunan glikolipid, galaktoz, mannoz, sialogangliosid GMI ve tipV kollagen gibi isimler alan

özel reseptörlere bağlanırlar, buna “fimbrial adezyon” denir (Şekil 3.1). Bakterinin afimbrial adezinler adı verilen yüzey adezyon molekülleri ile konak hücreye tutunmasına da “afimbrial adezyon” denir (Şekil 3.2). Afimbrial adezinler için de konak hücrelerde spesifik reseptörler bulunur. Fibrin, fibronectin, salivar glikoprotein ve actinomyces gibi isimler alan hücre reseptörleri afimbrial adezinler için özel olan reseptörlerdir. Bakterinin glikokaliks ve slime tabakası ise fimbrial ve afimbrial adezinlerden farklı olarak, bakteri ile konakçı arasında özgül olmayan bir adezyon sağlar. Spesifik ya da özgül adezyonun, özgül olmayan adezyona göre farkı, bakterinin tropizmi ile ilişkilidir, yani hastalandıracağı doku yada hücreye ilgisidir. Böylece patojen bakteri belli bölgeleri ve alanları infekte eder. Örneğin solunum sistemine tropizmi olan bakteri pnömoni oluşturur fakat genital sistemi etkilemez. Bakterinin hücreye adezyonu, bakteriyi konakçı dokularının yüzeyindeki mukus ve sıvıların uzaklaştırıcı etkisinden koruyarak virulensini arttırmış olur. Adezyondan sonra bakteri, konakçı dokularında kolonize olabilir, yani tutunduğu yerde üreyerek sayıca çoğalır. Bakterinin kolonize olması konakçının normal florasını geçebilmesine bağlıdır, bu da virulensi yüksek bakterilerde mümkündür.

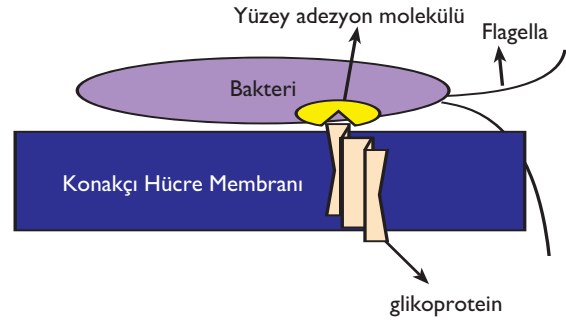
Şekil 3.1

Fimbrial adezyon



Şekil 3.2

Afimbrial adezyon



Adezyondan sonra bakteri hücreye girer ve dokulara yayılır buna “invazyon” denir. Bakteriler kollajenaz, hyaluronidaz, koagulaz vb. gibi virulens faktörleri sayesinde hücrelere invaze olurlar. Virulensi yüksek olmayan bakterilerin invazyonu ise deri ve mukozadaki yüzey bariyerlerinin bozulması ile ilgilidir. Travmalar, cerrahi yaralar, antibiyotik kullanımı ya da vücutta başka hastalık bulunması gibi nedenlerle yüzey bariyerleri bozulabilir. Bakterinin hücrelere invazyonu değişik yollarla olur. Bazı bakteriler hücre aralarından ve makrofajlar aracılığı ile dokulara invaze olurken, bazıları da konak hücrenin psödopodları ile yutulur ve hücre içinde vakuolde ya da stoplazma içinde çoğalırlar. Buralarda çoğalan bakteriler hücrelerin yakınındaki kapillar lenfatik damarlar, sonrasında büyük lenf damarları yoluyla kan dolaşımına karışır ve vücuda yayılır. Bazı patojen bakteriler invazyon yapmadan da tutundukları bölgede infeksiyona neden olabilirler.

Bakterinin Üremesi

Bakteriler vücutta ulaştıkları doku ve organlarda, besin, pH, ısı vb. yönlerden uygun ortamlar bulduklarında çoğalırlar. Bazı bakteriler kanda ürerken bazıları konakçının değişik doku ve hücrelerinde ürerler. Bu tip bakteriler “intraselüler bakteriler” olarak isimlendirilirler ve makrofaj, nötrofil gibi vücut savunmasında görevli olan hücreler içinde de üreyerek vücuda bu hücreler içinde yayılabilirler. Hücre içindeki sayıları artınca fagositik hücreler parçalanır ve bakteriler ortama yayılarak diğer hücreleri de infekte ederler ve yayılmalarına devam ederler. Hayvanlarda önemli infeksiyonlar oluşturan *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Rhodococcus equi* gibi etkenler intraselüler bakterilere örnek olarak verilebilir.

Bakterinin Konakçıda Hasar Oluşturması

Bakterinin toksijenitesi vücutta hasar oluşturmada en önemli rolü oynar. Bakteri ekzotoksinleri ve endotoksinlerinin vücutta meydana getirdikleri harabiyet ekzotoksijenik ve endotoksijenik olmak üzere iki mekanizma ile açıklanabilir.

Ekzotoksijenik Mekanizma

Bakterilerin en önemli virulens faktörlerinden olan ekzotoksinler vücutta birkaç farklı mekanizma ile hasar oluştururlar. Bazı ekzotoksinler yemlere bulaşmış olan bakteri tarafından üretilir ve sindirim yoluyla vücuda alınır. Bu bir çeşit gıda zehirlenmesidir. İnsanlarda da aynı yollarla gıda zehirlenmeleri meydana gelebilir. Hayvanlarda toksin üremiş olan yemlerle, insanlarda da bu çeşit gıdaların yenmesi ile meydana gelen Botulismus hastalığı buna en iyi örnektir. *Clostridium botulinum* tarafından üretilen botulinum toksini çok kuvvetli etkisi olan bir toksindir, çok az bir miktarı bile hastalık oluşturmaya yeter. Bu toksin ağız yoluyla alındıktan sonra sindirim sisteminden emilerek motor sinirlere ulaşır ve sinir-kas bağlantısında asetil kolin salınımını bloke ederek felçler oluşturur. Solunum kaslarını etkilerse solunum felci sonu ölüm şekillenir. Bazı ekzotoksinler vücut yaralarında ya da abselelerinde üreyen bakteriler tarafından sentezlenir ve buradan vücuda yayılarak etkisini gösterir. Gazlı gangren hastalığının etkeni *Clostridium perfringens* bu şekilde etki gösterir, ürettiği alfa toksin bir yandan lokal hasar oluştururken, bir yandan da kan dolaşımına karışarak eritrositleri lize eder ve ödem oluşturur. Tetanoz hastalığına neden olan *Clostridium tetani*'nin ürettiği tetanospozmin denilen ekzotoksin de yaralardan vücuda sinirler yoluyla yayılır ve sinir blokajı sonucu felçler oluşturur. Bakteriler vücutta mukozal yüzeylerde buldukları sırada da ekzotoksin üretebilirler. Örneğin *Escherichia coli* bağırsakta enterotoksin üreterek ishale sebep olur. Ekzotoksin üreten bakteriler, Antraks' ta olduğu gibi indirekt yollarla aşırı sitokin üretimini uyarak hayvanlarda sistemik şok ve ölüme neden olurlar.

Endotoksijenik Mekanizma

Gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapısında bulunan lipopolisakkaritlerin bakteri ölümünden sonra ya da (çok az bir kısmında olduğu gibi) bakterinin üremesi sırasında ortama yayılması sonucu yangı meydana gelir. LPS yapının Lipid A kısmı asıl toksik olan bölümdür ve vücutta savunma sistem hücreleri ile bir dizi reaksiyonlar sonucu yangı oluşumuna neden olur. Sonuçta ateş, hipotansiyon, lökopeni, hipoglisemi, beyin, kalp ve böbrek yetmezlikleri meydana gelir.

Özet



Konakçı direncini tanımlamak, konakçı direncinin önemli unsurlarını sıralamak.

Konakçı direnci, bakteriyel enfeksiyona maruz kalan duyarlı konakçının spesifik ve non spesifik savunma mekanizmasıdır. Konakçı direnci doğal direnç ve kazanılan bağışıklık olmak üzere iki ana unsurdan oluşur. Doğal direnç dış (birincil) ve iç (ikincil) savunma hatlarından oluşur. Birincil savunma sistemi konakçının yapısında var olan genetik, fizyolojik özellikler, fiziksel mekanik bariyerler ile antimikrobiyel salgılardan oluşur. İkincil savunma sistemi ise properdin, interferon, defensinler, doğal antikorlar gibi humoral faktörler ve monositler, granulositler, mast hücreleri, lenfositler, doğal öldürücü (NK) hücreler, makrofajlar gibi hücresel faktörlerden oluşur. Kazanılan bağışıklık ise vücutta özel bağışıklık sistemi hücreleri tarafından oluşturulur, spesifik bir özellik gösterir. Aktif ve pasif olmak üzere iki şekilde oluşur. Aktif bağışıklık enfeksiyon ya da aşılardan oluşur. Pasif bağışıklık ise anneden yavruya geçen bağışıklık şeklidir. Ayrıca tedavi amaçlı üretilen serumlarla da nakledilebilir.



Patojeniteyi ve virulensi tanımlamak, virulens faktörlerini açıklamak.

Mikroorganizmaların hastalık oluşturabilme yeteneğine "patojenite" denir. Patojen mikroorganizmaların hastalık oluşturma yeteneğinin derecesi ya da gücüne "virulens" denir. Bakteriye virulens yeteneğini kazandıran yapıları ya da ürünleri virulens faktörleri olarak isimlendirilir. Adezyon yani hücreye tutunmada görevli virulens faktörleri: fimbria, yüzey molekülleri, S katmanı, M proteini ve kapsüldür. İnvazyonda görevli yapılar: Kollajenaz, hyaluronidaz, koagülaz, sitolizin, deoksiribonukleaz, hidrojen peroksit, amonyak, IgA1 proteaz, elastaz, alkalın proteaz, lesitinaz, streptokinazdır. Fagositozu önleyici faktörler: kapsül, teikoik-lipoteikoik asit ve bazı bakterilerdeki hücre duvarında bulunan özel moleküllerdir. Toksemi oluşturucu faktörler ise ekzo ve endotoksinlerdir.



Bakteriyel patogenezinin aşamalarını açıklamak.

Bakteriyel patogenezis, yani bakterilerin hastalık oluşturma mekanizması bakterinin vücuda girişi ile başlar; bakteri vücuda sindirim, solunum, direkt ve indirekt yollardan girer. İkinci aşamada bakteri adezyon faktörleri aracılığıyla konak hücreye tutunur (adezyon) ve invazyon faktörleri sayesinde de derin dokulara yayılır (invazyon). Üçüncü aşama bakterinin konakta üremesidir. Bazı bakteriler kanda ürer, intraselüler olarak isimlendirilen diğer bir grup bakteri ise fagositer hücreler içerisinde üreyerek vücutta yayılmalarına devam ederler. Dördüncü aşama bakterinin konakçı hücre ve dokularında hasar oluşturmalarıdır. Bakterinin hasar oluşumunda en önemli yapısı toksinleridir. Ekzotoksinler birkaç farklı yolla hasar oluştururlar. Bazıları sinir- kas sistemini etkileyerek felçler oluşturur, bazıları kan hücrelerini parçalayarak ödemlere sebep olur, bazıları gıda zehirlenmelerine, bazıları da enterotoksemilere sebep olur. Endotoksinler ise indirekt yollarla yangı oluşturur, septik şoka kadar gidebilen bozukluklara sebep olurlar.

Kendimizi Sınayalım

- Doğal direnç ile ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi **yanlıştır**?
 - Etkisi birkaç saat içinde meydana gelir.
 - Etkisi spesifiktir.
 - Tekrarlayan infeksiyonlarda etkisinin şiddeti artmaz.
 - Anatomik ve fizyolojik özellikler doğal dirençte rol oynar.
 - Genetik özellikler doğal dirençte rol oynar.
- Aşağıdakilerden hangisi doğal dirençte iç (ikincil) savunma sisteminin bir ögesidir?
 - İnterferon
 - Sebum
 - Siliyalı epitel
 - Tüyler
 - Derinin normal florası
- Aşağıdakilerden hangisi sindirim sisteminin doğal savunma faktörlerinden biri **değildir**?
 - Lizozim
 - Laktoferrin
 - Siliyalı epitelyum hücresi
 - Peroksidaz
 - Safra
- Aşağıdakilerden hangisi gözyaşında bulunan doğal antimikrobiyel moleküldür?
 - Steroid
 - Östrojen
 - Tiroksin
 - Sebum
 - Lizozim
- Hayvan ve insan vücudunda hastalık oluşturmaksızın bulunan normal florayı oluşturan bakterilere ne ad verilir?
 - Patojen
 - İnvaziv
 - Fırsatçı patojen
 - Apatojen
 - Opportunist
- Aşağıdakilerden hangisi bakterilerde adezyon faktörlerinden biridir?
 - Fimbria
 - Hemolizin
 - Kollajenaz
 - Hiyaluronidaz
 - Hidrojen peroksit
- Aşağıdakilerden hangisi invazyon faktörlerinden biri **değildir**?
 - Deoksiribonukleaz
 - Alkalin proteaz
 - Hyaluronidaz
 - Teikoik asit
 - Koagulaz
- Aşağıdakilerden hangisi ekzotoksinlerin özelliklerinden biridir?
 - Sadece gram negatif bakterilerce sentezlenir.
 - Protein yapısındadır.
 - 250°C ye dek ısıya dayanabilir.
 - Toksoid hale dönüşmez.
 - Zayıf derecede toksiktir.
- Patojen bakterilerin konakçıda demiri bağlamak için kullandıkları moleküllere ne ad verilir?
 - Endotoksin
 - Ekzotoksin
 - Kapsül
 - M proteini
 - Siderofor
- Bakterinin konakçı hücre yüzeyine tutunmasına ne ad verilir?
 - Bulaşma
 - İnvazyon
 - Adezyon
 - Toksemi
 - İntoksikasyon

Kendimizi Sınavalım Yanıt Anahtarı

1. b Yanıtınız yanlış ise “Doğal Direncin Özellikleri” konusunu yeniden gözden geçiriniz
2. a Yanıtınız yanlış ise “Doğal Direnç-İç Savunma Sistemi” konusunu yeniden gözden geçiriniz
3. c Yanıtınız yanlış ise “Doğal Direnç-Dış Savunma Sistemi” konusunu yeniden gözden geçiriniz
4. e Yanıtınız yanlış ise “Doğal Direnç-Dış Savunma Sistemi” konusunu yeniden gözden geçiriniz
5. d Yanıtınız yanlış ise “Patojenite” konusunu yeniden gözden geçiriniz
6. a Yanıtınız yanlış ise “Adezyon Faktörleri” konusunu yeniden gözden geçiriniz
7. d Yanıtınız yanlış ise “İnvazyon Faktörleri” konusunu yeniden gözden geçiriniz
8. b Yanıtınız yanlış ise “Ekzotoksinler” konusunu yeniden gözden geçiriniz
9. e Yanıtınız yanlış ise “Sideroforlar” konusunu yeniden gözden geçiriniz
10. c Yanıtınız yanlış ise “Bakteriyel İnfeksiyonlarda Patogenez” konusunu yeniden gözden geçiriniz

Sıra Sizde Yanıt Anahtarı

Sıra Sizde 1

Bakterisidal etki bakterileri öldürücü etki, fungusidal etki ise mantarları öldürücü etkidir.

Sıra Sizde 2

Vücuda giren bir mikroorganizmanın savunma sistem hücreleri tarafından yakalanıp yutulmasına fagositoz denir.

Sıra Sizde 3

Vücutta bağışıklık humoral (sıvısal) ve hücrel (selüler) olmak üzere iki yolla gelişir. Humoral bağışıklığın temel unsuru B lenfositlerdir. Antikorlar da B lenfositler tarafından üretilir. Yani B hücresinin antijene yanıtı sonucu oluşan ve bu antijen ile spesifik olarak birleşebilen bağışıklık elemanlarına antikor denir. Vücudun spesifik bağışıklığında görevlidir.

Yararlanılan Kaynaklar

- Arda, M. (2000). **Temel Mikrobiyoloji**, Ankara: Medisan Yayınları
- Bilgehan H.(2002). **Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi**, İzmir: Barış Yayınları.
- Carter,G.R. (2004). **Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology**, Ames,Iowa,USA:Iowa State Press
- Diker, K.S. (2005). **İmmunoloji**, Ankara: Medisan Yayınevi.
- Kreier J.P., Mortensen (1990). **Infection, Resistance and Immunity**, New York, Harper and Row.
- Strohl, W.A., Harriet, R., Fisher, B.D. (2001). **Lippincott's Illustrated Reviews, Microbiology**, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins
- Tizard, I.R. (2000). **Veterinary Immunology An Introduction**, USA: W.B. Saunders Company.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J. (2008). Prescott, Harley, and Klein's **Microbiology**, NewYork, USA: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Anonim. <http://web.inonu.edu.tr~bdurmaz/bakterikonak.htm>

4

Amaçlarımız

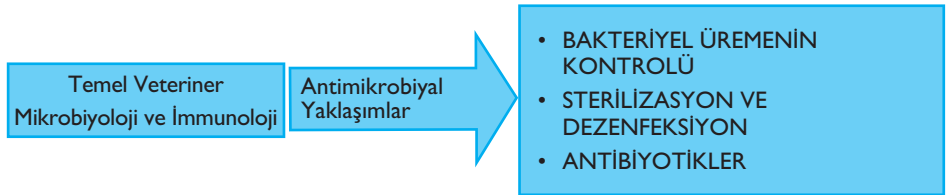
Bu üniteyi tamamladıktan sonra;

- Bakteriyel üremenin kontrolünde kullanılan yöntemleri açıklayabilecek,
- Sterilizasyon ve dezenfeksiyon yöntemlerini tanımlayabilecek,
- Antibiyotiklerin etki mekanizmalarını ve kullanım alanlarını özetleyebilecek,
- Antimikrobiyal etkinlik testlerini açıklayabileceksiniz.

Anahtar Kavramlar

- Antimikrobiyal
- Sterilizasyon
- Antisepsi
- Dezenfeksiyon
- Antibiyotik
- Tedavi

İçindekiler



Antimikrobiyal Yaklaşımlar

BAKTERİYEL ÜREMENİN KONTROLÜ

Bakteriler uygun koşullarda ikiye bölünerek çoğalırlar. Genel anlamda herhangi bir kısıtlayıcı faktör olmadığı durumlarda üreme devam eder. Gerek in vivo gerekse in vitro koşullarda bakteriyel üremenin kontrolü için bazı temel mekanizmalar bulunmaktadır. In vivo bakteriyel üremelerde, vücudun savunma sistemi tarafından bakteriyel üremenin kontrolüne yönelik mekanizmalar bulunur. Bu mekanizmalar, bakterilerin üremesini kontrol edebildiği gibi bazı bakterilerde bu durum gerçekleşmeyebilir. Ayrıca vücudun savunma sistemi dışında, bakteriyel üremenin kontrolü için dışarıdan alınan ilaçlar da kullanılır (**kemoterapi**). Bu ilaçlar genel anlamda kemoterapotikler olarak tanımlanır. In vitro koşullar uygun olduğunda bakterilerde üreme kısa bir alıştırma döneminden (latent dönem) sonra hızla şekillenir (logaritmik dönem). Üreme için uygun ortamın olmaması, bakterilerin zamana bağlı olarak ölmesine neden olur. Çoğu zaman bu süre aylarca devam edebilir. Bu süreci kısaltmak ve bakterilerin ortamdaki giderilmesi için sterilizasyon ve dezenfeksiyon yapılır.

Ortamda bulunan mikroorganizmaların kontrolünde temel olarak iki faktör bulunmaktadır. Bunlardan ilki, mikroorganizmalarının sayısının azaltılması/tamamen ortadan kaldırılması diğeri ise üremenin kontrolüdür. Bu işlemlerin etkinliğinin sağlanmasında, ortamın özelliği değerlendirilmelidir. Şöyleki organik madde varlığı ve nem, uygun sıcaklıkla birleştiğinde bakteriyel üremenin hızla şekillendiğini aksi takdirde bu faktörlerin kontrol edildiği/olmadığı durumlarda bakterilerin üremelerinin sınırlandırıldığı görülmektedir. Bakteriyel üremenin sınırlandırılması ve bakterilerin tamamının giderilmesi, özellikle mikroorganizmalarla ilgili çalışma ortamlarında önem taşır. Örneğin bakterileri üretmek için kullanılan besiyerlerinin herhangi bir mikroorganizma içermemesi gerekir. Aynı şekilde hayvansal üretim yapılan işletmelerde patojenlerin ortadan kaldırılması ve toplam mikroorganizma sayısının azaltılması, sağlıklı ve verimli bir üretim için gereklidir. Aynı durum gıda üretim yerlerinde ve gıdalarda da mikroorganizmaların kontrolü, hem gıda güvenliği hem de raf ömrü açısından önem arz eder.

Mikroorganizmaların ve mikrobiyal üremenin kontrolü, hayvan sağlığında, gıda endüstrisinde ve çevre açısından değerlendirilmelidir. Enfeksiyonlardan korunmada ve mikrobiyal bulaşmanın kontrolünde, antisepsi, dezenfeksiyon ve sterilizasyon işlemlerinden yararlanılmaktadır. Mikroorganizmaların ortamlardan giderilmesi sterilizasyon ve dezenfeksiyon başlığında anlatılmıştır.

Kemoterapi: Paul Ehrlich tarafından enfeksiyon hastalıklarının ilaçlarla tedavisi anlamında kullanılan bir terimdir. Bu amaçla kullanılan ilaçlar, konakçıya toksik etki göstermeden mikororganizmalar üzerine etkili olmalıdır.

Biyogüvenlik: Hayvansal üretimde mikrorognazma hareketlerinin kontrolü anlamına gelir. Bu işlemin başarılı olması için yapılan tüm uygulamalar, biyogüvenlik önlemleri kapsamında değerlendirilir.

STERİLİZASYON VE DEZENFEKSİYON

Sterilizasyon ve dezenfeksiyon, hayvansal üretimde birçok alanda kullanılmaktadır. Hayvanlara cerrahi müdahalelerde kullanılan ekipmanların, malzemelerin ve elbiselerin steril hale getirilmesi, potansiyel bulaşmaların önüne geçer. Aynı şekilde hayvansal üretim yapan işletmelerde hastalıkların kontrolü anlamında kullanılan **biyogüvenlik** ifadesi, mikroorganizmaların kontrolü için yapılan uygulamaları içerir. Hayvansal üretimde ve hayvan sağlığı uygulamalarında, sterilizasyon ve dezenfeksiyon uygulamalarını anlamak ve uygulamaya aktarmak, mikroorganizmaların neden olduğu problemlerin çözümünde gereklidir. Bu konuda kullanılan bazı terimler bulunmaktadır. Bunlar sterilizasyon, dezenfeksiyon ve antisepsi olarak tanımlanabilir.

Sterilizasyon, tüm canlı mikroorganizmaları elimine etmek, yıkılamak anlamındadır. Bu işlemde mikroorganizmaları tüm formları öldürülür. Sterilizasyon işlemi, mikroorganizmaların tüm formlarının tamamıyla giderilmesi işlemidir ve sonucu mutlak olmalıdır. Steril edilen malzeme, ortam bu işlemde sonra kontaminasyonlardan korunmalıdır, aksi takdirde yeniden mikroorganizmalarla bulaştığında sterilizasyondan bahsetmek mümkün değildir.

Dezenfeksiyon ise, patojenik mikroorganizmaların fiziksel ve kimyasal yöntemlerle giderilmesidir. Tüm *dezenfektanlar*, bakterilerin vejetatif formlarına etkilidir, ancak bazıları sporlarına da etkindirler.

Antisepsi, hayvanlarda mikroorganizmaların kimyasallarla giderilmesi işlemidir. Bu işlem için kullanılan maddelere *antiseptik* adı verilir. Sterilizasyon ve dezenfeksiyon uygulamaları, yüzeylerde, ürünlerde, havada, mikroorganizmaların kontrolünde kullanılırken; antisepsi özellikle deri ve mukoz membranlarda mikroroganizmaların azaltılması amaçlanmaktadır.

Sterilizasyon ve dezenfeksiyon işlemlerinde farklı yöntemlerden yararlanılmaktadır. Genel olarak bu işlemlerde, fiziksel yöntemler ve kimyasal maddeler kullanılmaktadır.

SIRA SİZDE



Hayvansal üretimde biyogüvenlik uygulamaları sadece dezenfeksiyon işlemlerini mi kapsar?

Fiziksel Yöntemler

Mikroorganizmaların tamamıyla veya kısmı olarak ortamdan giderilmesinde kullanılan fiziksel yöntemler arasında ısı, ışınlama (ultraviyole, radyasyon) ve filtrasyon gibi teknikler bulunmaktadır. Bu yöntemler başlıklar halinde açıklanmıştır.

Isı İle Sterilizasyon

Mikroorganizmaların sitoplazmalarında ısı işleminin etkisiyle koagule olan proteinler bulunmaktadır. Bu nedenle yüksek derecelere çıkan ısıtma işlemi, mikroorganizmaların ölmesine neden olur. Isı ile yapılan sterilizasyonun etkinliği, mikrorognazimanın yapısı, ısı derecesi, ısının uygulama süresi ve ortamın özelliklerine bağlı olarak değişir. Isıl işlemin etkinliğini artıran bir başka özellik ise, ortamın nemidir. Nem arttıkça mikroroganizmaların ölmesi, koagülasyon artışına bağlı olarak hızla şekillenir. Bu nedenle nemli ısı, kuru ısıya göre sterilizasyonda daha etkindir. Isı ile sterilizasyon genel anlamda ekonomik, etkin ve kolay uygulanabilir olmasıyla birçok laboratuarda sterilizasyon için kullanılmaktadır. Isı ile sterilizasyon, nemli ve kuru ısı olmak üzere iki başlık altında incelenmektedir.

Nemli ısı ile sterilizasyon, mikroorganizmaların giderilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu işlemlerden *kaynatma*, en yaygın kullanımdır. Genel olarak kaynatma ile bakterilerin vegetatif formları ölürken bazı bakterilerin sporları da ölür. Ancak bu işlem sporların tamamını gidermeye yetmez. Bu nedenle kaynatma tam anlamıyla bir sterilizasyon olarak tanımlanamaz.

Nemli ısının sterilizasyon amacıyla kullanımında basınçlı *bubar uygulamaları*, **otoklav** denilen cihazlarda gerçekleştirilir. Bu işlemde bir atmosfer basınç altında su buharının sıcaklığı 121 °C'dir ve bu değerlerde 15-45 dakika uygulama tüm mikroorganizmaların giderilmesiyle sterilizasyon gerçekleşir. Otoklav çalışma sonrasında içeride basınç yüksek olduğundan soğuması beklenmelidir. Fazla buharın boşaltılması ve basıncın düşmesi sonrasında kapak açılır. Günümüzde daha yüksek derecelere ulaşabilen (134-135 °C) otoklavlar bulunmaktadır ve bu cihazlarda sterilizasyon kısa sürede (3-4 dakika) gerçekleştirebilmektedir.

Tindalizasyon, yüksek ısıda bozulabilecek maddeleri içeren sıvıları üç gün ardışık olarak günde yaklaşık 1 saat süreyle 56-70 °C'de ısıtma işlemi olarak tanımlanır. Bu işlem sonrasında ilk gün bakterilerin vegetatif şekilleri daha sonraki günlerde spor formalarının açılması sonrasında vegetatif forma dönüşen bakterilerin öldürülmesi amaçlanmaktadır. Bu işlem fazla kontamine olmayan sıvılar için uygulanabilir. Günümüzde bu materyallerin sterilizasyonunda filtrasyon gibi daha etkin metodlar kullanılmaktadır.

Pastörizasyon işlemi, başta süt olmak üzere insan gıdalarında bulunan insan patojenlerinin ısıtma ile büyük oranda öldürülmesini amaçlamaktadır. Bu işlemin yavaş metodunda ısıtma işlemi 63 °C'de 30 dakika ve hızlı metodunda ise 72 °C'de 15 saniye olmak üzere uygulanır ve bu işlemden sonra süt hızlı bir şekilde soğutularak bakteri üremesinin önüne geçilir.

Yüksek sıcaklık (UHT), özellikle insan gıdası olarak tüketilen ve mikroorganizmaların kolaylıkla üreyebileceği besinlerin sterilizasyonunda uygulanmaktadır. Bu işlem 135 °C'nin üzerindeki sıcaklığın kısa sürede 3-4 saniye gibi uygulanması ve hızla soğutma işlemi içerir. Bu işlemde en yaygın kullanım sütün sterilizasyonudur.

Isı ile sterilizasyonun bir diğer uygulama şekli *kuru ısı* ile sterilizasyondur. Kuru ısının etkisi ile mikroorganizmalar su kaybeder ve dolayısıyla hızlı bir şekilde kuruma şekillenir. Mikroorganizmaların giderilmesinde, kuru ısı uygulamaları alevde yakmak, alevden geçirmek ve kuru sıcak hava ile sterilizasyon olmak üzere üç şekilde uygulanır. Birincisi, steril edilecek malzeme direkt olarak alevde kızıl dereceye kadar ısıtılmasıdır. Diğer laboratuvar malzemelerinin (tüp, erlenmayer gibi) ağızları kullanmadan önce ve kullanımdan sonra alevden geçirilerek mikroorganizmalardan arındırılmasıdır. Son olarak kuru hava ile sterilizasyon ise, sıcak hava fırınları (Pastör fırını) kullanılır ve fırın içinde hava 160 °C'ye kadar ulaştırılır. Bu derecelerde 2 saatlik bir bekleme sonrasında sterilizasyon gerçekleştirir.

Işınlama

Genel sterilizasyon yöntemlerinin sınırlı kullanıldığı alanlarda ışınlama mikroorganizmaların sterilizasyonu amacıyla kullanılmaktadır. Işınlama hem mikroorganizmalar hem de çevreye etki etmeleri nedeniyle kullanımlarının uygun yerlerde yapılması gerekmektedir ve bu özelliklerinden dolayı sınırlı bir kullanıma sahiptirler. Sterilizasyon amacıyla kullanılan ışınlama metodları aşağıda başlıklar halinde sunulmuştur.

Otoklav: Sterilizasyon amacıyla yaygın kullanılan buhar basıncı ve yüksek ısı ile çalışan cihazdır.

Ultraviyole (UV) Işınlari: Bakteri, mantar, virus ve hücreler üzerine öldürücü etkisi olan ve yüzey dezenfeksiyonunda kullanılan dalga boyları 10-380 nm olan ışınlardır.

1. İyonizan olmayan ışınlama
 - a. **Ultraviyole ışınları**
 - b. İnfrared ışınları
- c. Ultrasonik dalgalar
2. İyonizan ışınlama
 - a. Elektromanyetik radyasyonlar (ikx ve gama ışınları)
 - b. Partiküler radyasyonlar (alfa, beta ve katod ışınları)

Filtrasyon

Bir sıvıda ve havada partiküler yapıları tutan filtreler ile yapılan sterilizasyon işlemdir. Bu uygulamalar mikrobiyolojide sıklıkla kullanılır. Besiyerlerinin veya besiyeri bileşimine giren ve ısıya hassas yapıların filtrasyon ile sterilizasyonu gerçekleştirilmektedir. Ayrıca virolojik çalışmalarda kullanılan tamponlu suların bu şekilde bakteriyel kontaminasyonların elimine edilmesi mümkündür. Ayrıca laboratuvarlarda, biyolojik madde üretim yerlerinde, bulaşmaların engellenmesinde ve kontrolünde sıklıkla filtrasyon işlemlerinden faydalanılmaktadır. Ortam temizliğinde kullanılan filtreler genellikle **HEPA filtreler** olarak tanımlanmaktadır.

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan filtreler arasında, porselen filtreler, diatom toprağı filtreler, asbest süzgeçli filtreler, cam tozu filtreler ve selüloz membran filtreler olmak üzere gruplandırılırlar.

Kimyasal Yöntemler (Dezenfeksiyon)

Hastalık etkenlerinin kimyasal maddelerle öldürme işlemi, dezenfeksiyon olarak tanımlanmaktadır. Bu işlem için kullanılan kimyasallara dezenfektan adı verilir. Günümüzde farklı ortamlarda etkinleri iyi bilinen dezenfektanlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Dezenfektanların bakteriler üzerine etkileri belirli bir süreye bağlı olarak şekillenir ve logarimik bir azalma gözlenir. Bu durum bir ortamdaki mikroorganizmaların tamamıyla giderilmesi için zamana bağlı bir özellik olduğunu göstermesi bakımından önem arz eder. Ortamda mikroorganizma yoğunluğuna bağlı olarak öldürme süresi de uzar. Bu durum belirli bir aşamaya kadar etken madde konsantrasyonu ile ilişkilidir ancak belirli rakamların üzerinde mikororganizma varlığı, yoğunluktan daha çok zamana bağlı bir etkileşim gösterir. Dezenfektanların etkin olması için temel bileşenler vardır. Bunlar, dezenfektanın yoğunluğu, kimyasal yapısı, mikroorganizmaların özelliği, mikroorganizma miktarı, süre, ortam sıcaklığı, ortamın pH, ortamda organik madde varlığı, uygulama tekniği gibi etkili faktörler bulunmaktadır. Dezenfektanlar mikroorganizmaları öldürmesi için mutlaka teması gereklidir. Bu nedenle dezenfektanların mikroorganizmalara temasını önleyen bir durum varsa (organik kirlilik gibi), mikroorganizmaların ölmesi mümkün değildir. Bu durumda özellikle ortamda organik madde varlığı önemli bir engeldir ve dezenfektanların etkinliği ciddi düzeyde azaltmaktadır. Bu engelin ortadan kaldırılması için kuru temizlik aşaması önem kazanmaktadır.

HEPA Filtreler: Yüksek etkinlikte partikül yakalayıcı (High Efficiency Particulate Arresting) anlamında olup laboratuvarlarda, biyolojik madde üretim yerlerinde ve mikrobiyal kontaminasyonları azaltmada/kontrol etmede kullanılmaktadır.

SIRA SIZDE



Mikroorganizmaların giderilmesinde en etkin yöntem nedir?

Kimyasal Yöntemlerin Etki Mekanizması

Dezenfektanların mikroorganizmalar üzerine etki tarzları değişkendir. Bunlar.

1. Bakteri membranının fonsiyonunu bozanlar
2. Proteinleri denatüre edenler
3. Enzim aktivitesini bozanlar
4. Nükleik asit üzerine etki olanlar

Bakteri Membranının Fonksiyonunu Bozanlar

Dezenfektanlar, yüzey gerilimini düşürür ve ozmotik basıncın artmasına neden olur. Bu etkiler nedeniyle mikroorganizmaların hücre membranının yarı geçirgenlik özelliği bozulur ve beslenmede oluşan problemler nedeniyle, metabolizmanın tamamıyla durması ile sonuçlanır. Bu şekilde etki eden dezenfektanlar, mikroorganizmalar için hipertonic bir ortam oluşturarak plazmoliz nedeniyle ölmelerine neden olur. Yüzey geriliminin düşmesine neden olan kimyasal maddeler, bakterilerde geçirgenliğin bozulmasına ve ölümüne katkıda bulunur. Bu şekilde etkileyen dezenfektanlar arasında fenol ve fenol bileşikleri, sentetik deterjanlar (kuarterner amonyum bileşikleri, sabunlar, sodyum lauryl sülfat), organik solventler (metanol, aseton) bulunmaktadır.

Proteinleri Denatüre Edenler

Bazı dezenfektanlar mikroorganizmaların protein yapılarını bozarlar ve bu şekilde etki sonrasında enzim aktivitesi olmadığından ölüm şekillenir. Bu şekilde etki eden dezenfektanlar arasında asitler ve alkaliler sayılabilir.

Enzim Aktivitesini Bozanlar

Bakterilerde hayati öneme sahip olan enzimlerin yapısının bozulması, mikroorganizmaların ölümüne neden olur. Enzim aktivitesini direkt olan bozan ağır metaller (gümüş, civa, bakır), tuzlar, oksidan maddeler (hidrojen peroksit, ozon, sodyum hipoklorid) bu grupta sayılabilir.

Nükleik Asitleri Etkileyenler

Bazı kimyasal maddeler, mikroorganizmaların genetik yapısı ile birleşikler oluşturarak replikasyona ve dolayısıyla protein sentezine mani olurlar. Protein sentezinin durması sonrasında mikroorganizmanın yaşaması söz konusu olamaz. Bu şekilde etki eden boyalar (malaşit yeşili, kristal viyole, akriflavin, metilen mavisi) mikroorganizmaların üremesinin kontrol edilmesi amacıyla kullanılırlar.

Dezenfektanlar

Dezenfektanlar ve dezenfeksiyon işlemleri uzun yıllardan beri hayvan sağlığını korumak amacıyla kullanılmaktadır. Doğal **dezenfeksiyon** güneş ışığı, ısı veya basit olarak dinlendirme gibi uygulamaları kapsar ancak uzun süre aldıklarından dolayı günümüz için çok kullanışlı değildir. Birçok patojenin uzun süre canlı kalabilmesi, hızlı üretim için artan ekonomik baskı, kimyasal dezenfektanların kullanımını artırıcı bir rol üstlenmiştir.

Etkili bir dezenfeksiyon için kullanılacak dezenfektanın seçimi oldukça önem taşımaktadır. Bu nedenle seçilen dezenfektanın bazı temel özelliklerinin bilinmesi ve kullanım amacına uygun olması gerekir. Bu amaç için seçilen dezenfektanlarda, dezenfekte edilecek yüzeyin tipi, ortamın organik madde içeriği, ortam sıcaklığı, dezenfektan sulandırmada kullanılacak suyun kalitesi, dezenfektanın temas zamanı ve dezenfektanın aktivite spektrumu bilinmelidir. Ayrıca dezenfektanın etkinliği, güvenliği ve maliyeti öncelikli olarak değerlendirilmelidir.

Dezenfektanların etkinliğini sınırlayıcı faktörler arasında, dezenfekte edilecek yüzeyin özellikliği dikkate alınmalıdır. Dezenfeksiyon işleminin başarıya ulaşması için yüzeyin düzgün olması ve dezenfektan ile mikroorganizmanın direkt temasını önleyecek bir engelin olmaması gereklidir. Örneğin kümes dezenfeksiyonunda ze-

Dezenfeksiyon:
Hastalık oluşturan mikroorganizmaların öldürülmesi işlemidir.

mininin toprak veya kumlu olması, dezenfektanın etkinliğinin azalması muhtemeldir. Dezenfekte edilecek yüzeylerde organik kalıntıların olması ve kümes ortamındaki sıcaklık dezenfektanın etkilerini sınırlayıcı faktörlerdir. Özellikle kümes zeminini ve yan duvarların alt kısımlarında birikmiş olan dışkıların giderilmesi, seçilen dezenfektanın etkinliğini artıracaktır.

Birçok dezenfektanın mikroorganizmalar üzerinde etkinliği belirli sıcaklık derecelerinde belirlenmiştir. Bu derecelerin dışındaki durumlarda özellikle de soğuk bir ortamda dezenfektanın etkinliği azalır. Bu nedenle soğukta da etkinliği belirlenmiş dezenfektanların seçilmesi ve/veya dezenfektanın temas zamanını uzatılmasında yarar vardır.

Dezenfektan sulandırmasında kullanılacak suyun kalitesi de bazı dezenfektanların etkinliğini sınırlar. Sert sulara iodoformlar ve kuarternler amonyum bileşikleri daha fazla etkilenirler.

Dezenfektanların aktivite spektrumunun geniş olması ortamda bulunan bakteri, virus, mantar, protozoa gibi mikroorganizmaların giderilmesinde avantaj sağlayacaktır. Ayrıca ortamda inaktive edilecek patojen miktarının çok değişken olması, dezenfektanların farklı konsantrasyonlardaki sulandırmalarının çeşitli sıcaklıklarda, organik bileşiklerin varlığında ve temas zamanı gibi değişkenlerin dikkate alınması yararlı olacaktır. Bazı dezenfektanların mikroorganizmalar üzerine etkinlikleri bakterilerin üreme veya spor formlarına göre değişkenlik gösterir. Bakteri sporları, vegetatif formlarına göre oldukça dirençlidir ve sadece belirli dezenfektanlar etkili çalışır. Bu dezenfektanlar arasında, halojenler, civa klorid, formalin, **etilen oksit** bulunmaktadır. Mikobakteriler de diğer bakterilere göre daha dirençlidir ve bu etkenlerin giderilmesi için fenolik ve alkol türevleri kullanılır. Virusların öldürülmesi de bakterilerin vegetatif formlarına göre daha zordur ve bu nedenle halojenler, oksidanlar ve formalin kullanılmaktadır. Dezenfektanların öldürücü etkiye sahip olması istenir. Bu amaçla kullanılan kuarternler amonyum bileşenleri yüksek konsantrasyonları dışında bakteriyostatik etkilidir.

Hayvansal üretimde mikroorganizmaların giderilmesi amacıyla çok çeşitli dezenfektanlar kullanılmaktadır. Bu dezenfektanların kullanımı için özelliklerinin iyi bilinmesi ve üretici firmanın bildirdiği kullanım şekillerine uygun olarak kullanılmalıdır. Aşağıda pratikte kullanılan bazı dezenfektanlar hakkında kısa bilgi verilmiştir.

Alkoller

Bu grupta yer alan etanol ve isopropanol, temizlik, kurutma, dezenfeksiyon ve antisepsi amacıyla kullanılırlar. Genellikle %60-70 düzeyinde optimum etki gösterirler. Alkoller, hızlı etkili, geniş spektrumlu bakterisidal ve mikobakterisidal aktivite gösterirler. Mantar ve viruslar üzerine etkileri daha yavaştır ve bakteri sporları üzerine genellikle etkisizdirler. Kalıntı bırakmamaları önemli bir avantajdır.

Fenol (Karbolik Asit) ve Kresol

Fenoller katrandan elde edilen bileşiklerdir. Genellikle suda eriyik formları ile pazara sunulan pahalı bir dezenfektandır. Etkileri direkt temasta olduğundan dolayı, spreyleme şeklinde uygulandığında yüzeyin temiz olması önemlidir. Fenollerin yüzeylerde etkinliklerini arttırmak için sabunlarla beraber kullanılırlar. Genellikle bakteri ve mantarlara etkin dezenfektanlardır.

Kresoller, katranın ekstraksiyonundan elde edilen ve fenollerle yakın ilişkili bir dezenfektandır. Bisfenol bileşikleri olarak oldukça etkin bir dezenfektan olup ge-

Etilen oksit:
Mikroorganizmaların
vegetatif ve sporlarına etkili
ısı ile gaz haline dönüşen,
toksik bir maddedir.

nellikle mazot ve su ile karıştırılarak kümes dezenfeksiyonunda kullanılırlar. Ayrıca bu karışım kırmızı kenelere de etki eder.

Halojenler

Bu grupta yaygın kullanımda olan iki grup dezenfektan bulunmaktadır. Klor bileşikleri ve iyodunlar bulunmaktadır. Klor bileşikleri inorganik ve organik olmak üzere iki şekilde incelenebilir. İnorganik klor bileşikleri (Hipokloritler), Hipokloritlerin temeli klordur ve inorganik klor bileşikleri olarak tanımlanırlar. Bunlar arasında, sodyum hipoklorit, potasyum hipoklorit, lityum hipoklorit ve kalsiyum hipoklorit bileşikleri sayılabilir. Genellikle %1-15'lik konsantrasyonları dezenfeksiyon amaçlı kullanılır. Yumurtaların yıkanması, kuluçkada ve kuluçka ekipmanlarının dezenfeksiyonu gibi yerlerde sıklıkla kullanılırlar. Tüm yüzeylerde kullanılabilirler fakat bu yüzeylerde ön temizlik yapılması etkinliğini artırır. Kumaş ve metallerle zarar verir. Hipokloritler genellikle sodyum hipoklorit bileşikleri şeklinde pazara sunulurlar ve suların dezenfeksiyonu amacıyla kullanılırlar. Ancak aşı yapılacak sularda bulunması aşının etkinliğini azaltır.

Organik klor bileşikleri (kloraminler), etkileri suda çözündüklerinde veya organik maddelerle temasta yavaş bir şekilde klor salarak gösterirler. Etkileri inorganik klor bileşiklerine göre daha yavaş fakat daha uzun sürelidir. Kloraminler çevre sağlığını korurlar ve bu nedenden dolayı kullanımları daha fazladır. Bu bileşikler arasında kloramin-T, kloroazodin, halozon ve sodyum dikloroizosiyanyurat sayılabilir.

İyodunlar uzun zamandır dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar üzerine oldukça etkindir. Ticari preparatlar, iyodun suda eriyebilirliğini artıran ve suyla sulandırıldığında yavaş yavaş serbest iyot salan iyodofor bileşikleri şeklinde hazırlanırlar ve tüm kanatlı yetiştiriciliğinde kullanılmaktadır. İyodoforlar ayrıca indikatör sistemi içeren maddelerle pazara sunulduklarında, reng açılmasına göre etkinlikleri takip edilebilmektedir.

Aldehidler

Kanatlı sektöründe aldehidler geniş kullanım alanı bulmuşlardır. En çok kullanılan aldehidler, formaldehid ve gluteraldehidlerdir. Formaldehid bir gazdır ve dezenfektan olarak daha çok formaldehidin suyla %40'lık konsantrasyonu kullanılır ve formalin olarak isimlendirilir. Ayrıca paraformaldehid olarak da bilinen ve ısıtılınca farmoldehid gazı salan toz formları da bulunmaktadır.

Formaldehid genellikle potasyum permanganat ile birlikte kullanılır. İki bileşik karıştırıldığında oluşan kimyasal reaksiyon sonrasında oluşan gaz ile fümigasyon işlemi yapılır. Genel kullanımı 1 birim potasyum permanganata 2 birim formalindir. Bazı kaynaklarda 2'ye 3 oranında bildirilmektedir. Formaldehidin bazı dezavantajları bulunmaktadır. İritan oluşu, deri ve mukozaları tahriş etmesi, kokusu ve insanlar için toksik olması önemli dezavantajlarıdır. Fümigasyon yapan kişinin mutlaka gaz maskesi kullanması ve karışımın kab dışına taşmayacak şekilde hazırlanması dikkat edilecek konular arasında bulunmaktadır. Bu dezavantajlarına karşın özellikle kuluçkalık yumurtaların dezenfeksiyonunda yoğun olarak kullanılmaya devam etmektedir.

Formalin, su ile püskürte şeklinde dezenfeksiyon işleminde kullanılmasına karşın, çoğunlukla potasyum permanganat ile birlikte veya paraformaldehid olarak fümigasyon şeklinde kullanılmaktadır. Fümigasyon işlemi, kümeslerde, kuluçka makinelerinde ve embriyolu yumurtaların dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır. Fümigasyon ile dezenfeksiyonun etkin olması için iki temel bileşen sağlanmalıdır. Bun-

lardan birisi ortam sıcaklığının 21 °C'den fazla nemin de %70 olması önemlidir.

Gluteraldehid, formaldehide göre daha etkili ve etki spektrumu oldukça geniştir. Virus ve bakteri sporları dahil tüm mikroorganizmalar üzerine etkilidir. Alkali ortamlarda etkinlikleri artar.

Kuarterner Amonyum Bileşikleri (Katyonik Deterjanlar)

Kullanımı oldukça geniş olan kuarterner amonyum bileşikleri, tüm yüzeylerde, kuluçkalarda, kümes ve kuluçka ekipmanlarında kullanılabilirler. Daha çok bakteri ve mantar üzerine oldukça etkin bileşiklerdir. Ancak sert sularda etkinlikleri azalır.

Anyonik deterjanlar, iyi temizleme potansiyeline sahiptirler ve uzun antibakteriyel etki gösterebilirler. Bakteri sporlarını öldürmezler, mikobakteriler üzerine etkileri yoktur, antivirüsidal aktiviteleri sınırlıdır.

Diğer

Kanatlı yetiştiriciliğinde, dezenfeksiyon amacıyla bakır sülfat, sönmemiş kireç, UV radyasyon, sıcak su ve kuru hava kullanılmaktadır. Ancak bu uygulamaların kullanımını ve/veya etkinliği sınırlıdır.

Dezenfektanların Etkilerinin Belirlenmesi

Dezenfektanların antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesinde, **fenol indeksi**, öldürme eğrisi, toksisite testi, aktivite spektrumunun belirlenmesi, inaktivasyon testi kullanılmaktadır. Bu terimler arasında yer alan fenol indeksi, test edilecek dezenfektanın 5 dakikada öldüremediği ancak 10 dakikada öldürebildiği en yüksek sulandırma oranının, fenolün aynı süre ve sulandırmada öldürebildiği sulandırmaya oranı olarak hesaplanır. Dezenfektanların etkinliklerinin belirlemede ayrıca organik madde varlığı ve ortam sıcaklığı da önemli bileşenler arasında sayılmaktadır.

Dezenfektanların etkinlerinin düşük sulandırmada şekillenmesi, suda kolay eriyebilmesi, farklı ortamlarda dayanıklı olması, organik madde varlığında çalışabilmesi, etki süresinin kısa olması, farklı sıcaklıklarda etkin çalışabilmesi, kötü kokulu olmaması, insan ve çevreye zarar vermemesikullanıldıkları yerde aşındırıcı etkisi olmaması ve kalıntı bırakmaması, ucuz ve kolay uygulanabilir olması gibi özelliklere sahip olması gereklidir.

Son yıllarda dezenfektanların etkinlerinin uzun süre devamını sağlayacak teknolojilerle üretildiklerini görmekteyiz. Bu amaçla üretilen nanoteknoloji ürünlerinin, mikrobiyal üremeyi kontrol ettiği ve mikroorganizmalar üzerine uzun süreli etkili oldukları ortaya konmuştur. Bu ürünlerin kullanımı her geçen gün artma eğilimindedir.

Dezenfestasyon

Dezenfestasyon, kümeslerde, protozoa ve nemotod gibi parazitlerle ekto parazitlerin giderilmesi işlemidir. Bu işlem için kullanılan kimyasal maddelere ise dezenfestant adı verilmektedir. Dezenfestasyon işlemi kimyasallarla yapılabildiği gibi aynı zamanda yakma gibi fiziksel işlemlerle de yapılabilir. Bazı dezenfestantlar, insanlar ve hayvanlar için toksik etkili olabilir. Hayvan barınaklarında ve çevresinde kullanılan dezenfestantlara örnek olarak, gaz yağı, nikotin sülfat, malation ve sülfokinoksasilin verilebilir. Bunlar ya püskürtme ya da tozların serpilmesi ile kullanılır.

Fenol indeksi:
Dezenfektanların etkinlikleri belirlemede kullanılan ve fenol ile karşılaştırmaya yarayan bir parametredir.

ANTİBİYOTİKLER

Antibiyotik kullanımı, hem insan sağlığı hem de hayvan sağlığında oldukça yaygındır. Modern kemoterapi Ehrlich tarafından doğru şekilde tanımlanmasından sonra hızla gelişmiştir. Ancak bu gelişimden önceki yıllarda da mikroorganizmalar üzerine etkin bazı kimyasallar tedavi amaçlı kullanılmıştır. Bunlar arasında, civa, arsenik bileşikleri ve boyalar sayılabilir. Antibiyotiklerin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi ve özellikle Fleming tarafından mantar kültürünün (*Penicillium notatum*; 1929) stafilokokların besiyerinde üremesini inhibe ettiğinin belirlenmesinden sonra önemli gelişmeler sağlanmıştır. Penisilinin, insan ve hayvanlarda düşük toksitesinin yanında yüksek antibakteriyel etki göstermesi, bu alanda gelişmeleri hızlandırmıştır. Günümüzde doğal ve sentetik antibiyotikler antimikrobiyal tedavide ve hayvansal üretimde performans arttırmak amacıyla kullanılmaktadır. Günümüzde antibiyotik kullanımının ulaştığı durumu sayılarla özetlemek gerekirse; Avrupa Birliği ülkelerinde 1997 yılında insan sağlığı için 5.460.000 kg, hayvan sağlığında tedavi amaçlı 3.465.000 kg ve büyüme faktörü olarak 1.575.000 kg antibiyotik kullanılmıştır. Hayvansal üretimde kullanılan antibiyotiklerin toplam canlı ağırlığa oranlaması sonrasında ortalama 54 mg/kg antibiyotik kullanıldığı ve bu rakamın ülkeler arasında 6 ile 148 mg/kg arasında değiştiği hesaplanmıştır. Hayvansal üretimde kullanılan antibiyotiklerin, özellikle gıda kaynaklı patojenlerin ve enterik bakterilerin çevreye saçılması, insan sağlığı açısından potansiyel bir risk oluşturmaktadır. İnsanların antibiyotikli veya dirençli bakteri içeren hayvansal ürünleri ve bunlarla bulaşık sebzelerin tüketmesi ile direnç profili önemli bir boyut kazanmaktadır.

Hayvanlarda koruyucu ve/veya tedavi amaçlı antibiyotik kullanımının belirli prensipler çerçevesinde yapılması, antibiyotiklerin etkinliği arttıracak gibi özellikle de antibiyotik direncinin kontrolünde önemli bir katkı sağlayacaktır. Hayvansal üretimde mikroorganizmaların antibiyotik direncinin kontrolü, indirekt olarak insanlardan izole edilen bakterilerdeki direnç profilinin çözümünü de katkı sağlayacaktır. Hayvansal kaynaklarda antibiyotik kullanımının bir diğer önemli boyutu, gıdalarda antibiyotik kalıntı problemidir ve gıda güvenliği açısından önem arz eder.

Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları

Antibiyotikler, genel olarak bakteriler üzerine etkilerini iki şekilde gösterirler ve bu etkilerine göre ilaçlar gruplanabilirler: Bakterisidal ilaçlar ve bakteriyostatik ilaçlar. Bakterisidal ilaçlar, bakteriler üzerine hızlı öldürücü etki gösterirler. Bunlar arasında, penisilin, streptomisin, polimiksin, neomisin sayılabilir. Bakteriyostatik ilaçlar ise, bakterilerin üremesini engellerler. Bu ilaçlara tetrasiklinler, sülfonamidler ve kloramfenikol örnek olarak gösterilebilir. Bakterisidal ve bakteriyostatik etki, ilacın konsantrasyonu ve mikroorganizmanın üreme aşamasına göre değişiklik gösterebilir. Eritromisinin düşük dozları bakteriyostatik etki gösterirken yüksek konsantrasyonlarda bakterisidal etki gözlenir. Penisilin üreme fazındaki bakteriler üzerine kuvvetli öldürücü etki gösterirken durma dönemindeki bakteriler üzerine öldürücü etkisi düşüktür. Antibiyotiklerin bakteriler üzerinde etkileri farklı mekanizmalar ile ortaya çıkar. Bu mekanizmalar aşağıda sıralanmıştır.

1. Hücre duvarı sentezine mani olanlar
2. Sitoplazmik membran üzerine etkili olanlar
3. Protein sentezine mani olanlar
4. Nükleik asit üzerine etkili olanlar

Hücre duvarı sentezine mani olan antibiyotikler, bakterilerin peptidoglikan sentezinin polisakkarit zincirleri arasındaki bağlantının oluşmasını engelleyerek hücre duvarı sentezini engellerler. Bu ilaçlar, daha önceden hücre duvarı oluşmuş bakteriler üzerine etki etmezler. Bu grup antibiyotikler arasında penisilinler, yarı sentetik penisilinler, basitrasin, sikloserin, ampisilin, karbesilin, metislin, sefalosporin ve vankomisin gibi ilaçlar sayılabilir.

Sitoplazmik membrana etkileyenler, bakterilerin hücre membranının fonksiyonunu bozarlar ve bakterinin ölüne neden olur. Polimiksin ve kolistin, özellikle Gram negatif bakteriler üzerine etki gösterirler ve ozmozisi bozarak bakterilerin ölümüne neden olurlar. Bu antibiyotikler arasında polimiksin, kolistin, nistatin ve amfoterisin B sayılabilir. Son iki etken maddenin antifungal etkileri vardır.

Protein sentezine mani olan antibiyotikler, bakterilerde protein sentezinin farklı aşamalarını olumsuz etkileyerek etki gösterirler. Protein sentezi bir bakteride oldukça önemlidir ve bu sentezin durması bakterilerin ölmesi ile sonuçlanır. Genel olarak antibiyotikler, bakterilerde transkripsiyonu engelleyerek ve translasyon aşamasında etki ederek etkilerini gösterirler. Transkripsiyonu engelleyerek etki eden antibiyotikler arasında aktinomisin, mitomisin, rifampisin sayılabilir. Translasyon aşamasında etki eden antibiyotikler ise ribosomal alt ünitelerden 30S ve 50S ribozomal alt ünitelere etki ederek protein sentezine engel olurlar. 30S ribozomal alt üniteyi etkileyen antibiyotikler arasında tetrasiklinler, streptomisin, kanamisin, neomisin, gentamisin ve spektinomisin sayılabilir. 50S'lik alt üniteye etkili olanlar arasında, kloramfenikol ve makrolidler (eritromisin, linkomisin, puromisin) sayılabilir.

Nükleik asit üzerine etkili olan antibiyotikler, bakterilerdeki nükleik asitlerin çift sarmal yapısını bozarak, DNA ve RNA polimeraz enzimlerine etki ederek, nükleik asit sentezine engel olarak ve DNA yapısında ve fonksiyonlarında bozukluklara neden olarak etki ederler. Bu grupta bulunan antibiyotiklere örnek olarak, mitomisin, nalidiksik asit, novobiyosin, griseofulvin, rifampin ve kinolonlar verilebilir.

Bakteriyel üremenin analog ürünlerle inhibisyonu (sülfonamidler, sülfonlar), üreme fazındaki bakterilerin üremelerini bozarak etki ederler ve üremiş bakteriler üzerine herhangi bir etkileri sözkonusu değildir. Sülfonamidler ve sülfonlar, antibakteriyel tedavi amacıyla kullanılmaktadır.

Antimikotik ajanlar, mantarların tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlara arasında griseofulvin, amfoterisin B ve nistatin sayılabilir. Bu erken maddeler, özellikle lokal sağaltımda ve sistemik mantar infeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır.



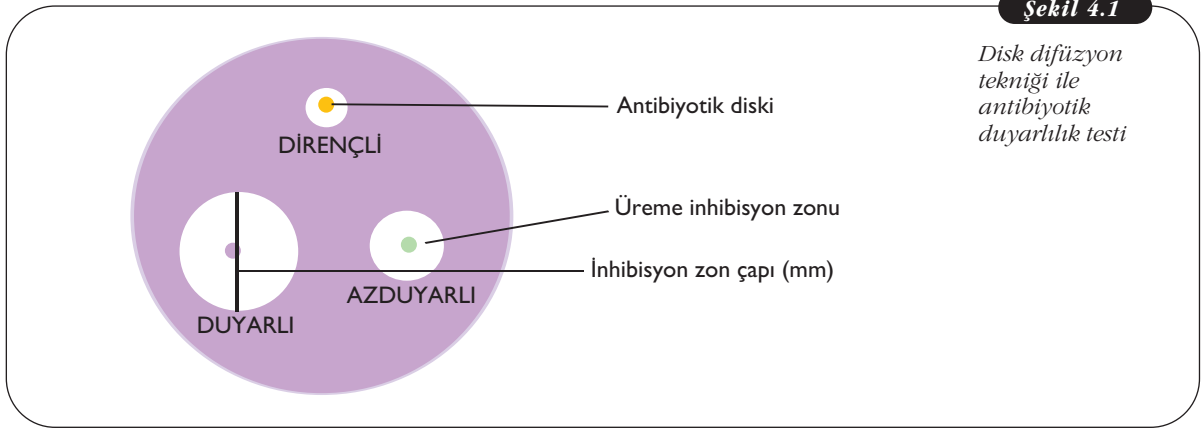
Antibiyotikler tüm hastalıklarda kullanılabilir mi?

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıklarını belirlemek için genel olarak iki yöntem vardır. Bu yöntemler disk difüzyon ve tüpte dilüsyon olarak tanımlanır. Bu yöntemlerle izole edilen bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıkları belirlenerek tedavi amaçlı kullanılırlar. Bu testler, özellikle direnç profilleri antibiyotiklere göre farklılık gösteren bakteriler ile oluşan infeksiyonların tedavisinde etkinliği arttırmak için önem taşır.

Disk Difüzyon Tekniği

Bu teknik, izole edilen bakterilerin dirençli oldukları antibiyotiklerin belirlenmesinde yarar sağlayan ve pratik açıdan oldukça etkin bir yöntemdir. Katı besiyerinde standart olarak sağlanabilen antibiyotik içeren diskler ile yapılır ve bu teknik

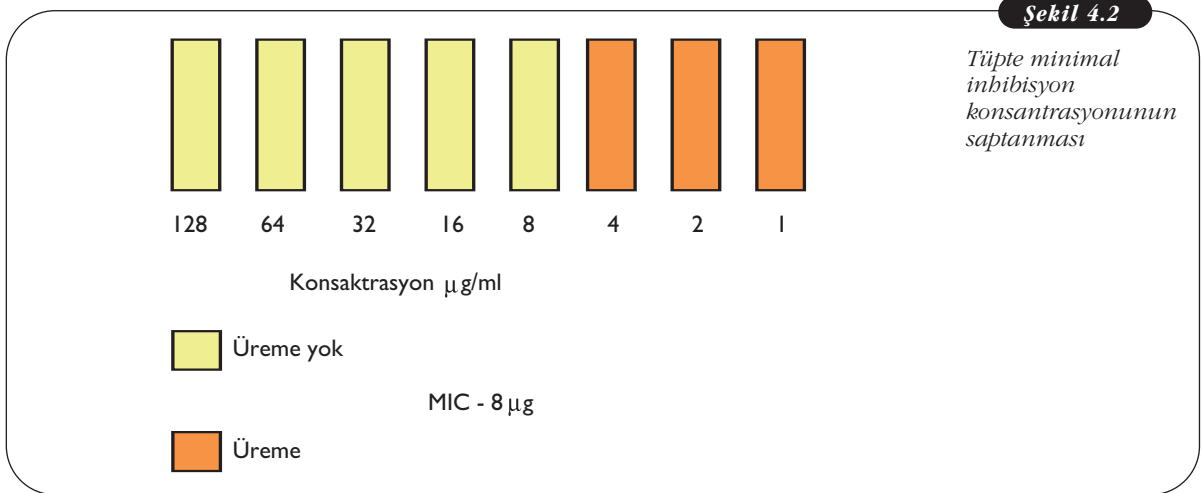


hastalık teşhis laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Kirby-Bauer yöntemi olarak tanımlanan bu testte, antibiyotiklere duyarlılığı belirlenecek mikroorganizmanın sıvı kültüründen Mülller Hinton agara 0.1-0.2 ml yayma ekim yapılır. Kurumayı takiben test edilecek antibiyotiklerin diskleri (elle veya özel dispenser ile) yerleştirilir ve inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda diskin etrafında oluşan bakteriyel üremenin inhibe edildiği zonların çapı ölçülerek sonuçlar değerlendirilir (Şekil 4.1). Bu çaplara göre duyarlı, intermedier (az duyarlı) ve dirençli olmak üzere değerlendirilir yapılır. Bu yöntem rutin laboratuvarlarda aerobik mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılığı belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bakteriler dışında, zor üreyen bakteriler ve anaeroblar içinde özel koşullar sağlandığında uygulanabilir. Aynı besiyerinde 6-8 adet antibiyotik duyarlılığı belirlemek için kullanıldığından oldukça ekonomiktir.

Antibiyotik duyarlılık test sonuçları, in vitro bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıklarını belirlemek için yaygın kullanımdadır. Tedavi için belirleyicidir ancak tedavi için kullanılacak antibiyotik için hedef dokuda uygun yoğunluğa ulaşması önem taşır.

Tüp Dilüsyon Tekniği

Bu yöntem antimikrobiyal ilaçların minimal inhibisyon konsantrasyonunu (MİK) ve minimal letal konsantrasyonunu (MLK) belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu amaçla antimikrobiyal maddenin yüksek dozlarından başlayarak 2 veya 10



katlı sulandırmaları sıvı ortamlarda yapılır. Sulandırma yapıldıktan sonra üzerine test edilecek mikroorganizmanın sıvı kültüründen eşit miktarda (0.1ml) tüm tüplere ilave edilir ve etüvde inkubasyona bırakılır. İnkubasyondan sonra üremenin inhibe edildiği son sulandırma MİK olarak belirlenir (Şekil 4.2). Bu sulandırmadan sıvı ve/veya katı besiyerlerine ekim yapılır ve inkubasyona kaldırılır. Üreme olması MİK, üreme olmaması MLK olarak tanımlanır. MİK belirlemek amacıyla otomatize sistemler bulunmaktadır. Bakterilerde minimal inhibisyon konsantrasyonunun saptanması için yapılan işlemler disk difüzyon tekniğine göre daha zordur ve genellikle rutin analizlerde kullanılmazlar. Bakterilerde MİK50 ve MİK90 olarak ifade edilen bazı terimler vardır. Bu terimlerden MİK50, test edilen bakteri suşlarından yarısını inhibe eden konsantrasyon; MİK90 ise test edilen bakterilerin %90'ının inhibe eden konsantrasyon anlamında kullanılmaktadır. İki terimin pratik alanda anlamları oldukça önemlidir ve tedavi dozunun belirlenmesi için kullanılırlar. Genel anlamda MİK50 ve MİK90 arasında doz olarak çok farklılık bulunması, izole edilen suşlar arasında direnç profillerini göstermesi bakımından önemli bir göstergedir.

E-Test

E-test, disk difüzyon tekniğine benzer şekilde düzenlenen ve bakterilerde antibiyotiklerin MİK değerlerinin belirlenmesine imkan sağlayan bir testtir. Bu testte kullanılan striplerde antibiyotiklerin farklı konsantrasyonları bulunur, besiyerinde ekilen bakteri üzerine yerleştirilerek inkubasyona bırakılır ve oluşan zon çaplarına göre bakterinin MİK değeri saptanır. Bu testte elde edilem sonuçlar, agar dilüsyon sonuçları ile uyumludur.

Otomatize Sistemler

Günümüzde teşhis laboratuvarlarının iş yükünün artması ve yoğun analizler sonrasında yapılan işlemlerin standardizasyonu ile laboratuvar nedenli problemlerin ortadan kaldırılması amacıyla hem identifikasyonda hem de MİK değerlerinin saptanmasında otomatize sistemlerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Bu amaçla geliştirilen ve ticari olarak sağlanabilen sistemler mevcuttur ve rutin laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Bu sistemde elde edilen veriler çok sayıda bakterinin farklı antibiyotiklere karşı MİK değerlerini ortaya koymaktadır. Hem standart hem de işgücü kayıpları açısından avantajlar sağlamaktadır ve sonuçları konvansiyonel uygulamalarla benzerdir.

Antibiyotik Kullanımında Temel İlkeler

Antibiyotikler, hayvanlarda klinik tabloların önlenmesinde ve bazı durumlarda koruyucu programlar şeklinde kullanılmaktadır. Antibiyotiklere bağlı problemlerin önlenmesi ve özellikle tedavide başarı için bazı temel kurallara uyulması yararlı olacaktır. Bu nedenle öncelikle hastalığın doğru teşhisini takiben, aşağıdaki hususlar göz önünde bulundurulmalıdır.

- Uygun antibiyotik seçimi
- Uygun doz
- Uygun tedavi yolu
- Uygun süre

Antibiyotik kullanımından sonra başarı, hastalıkla ilgili klinik tablonun ortadan kalkması ve iyileşmenin şekillenmesiyle değerlendirilir. Ancak her zaman başarılı sonuçlar ortaya çıkmaz. Başarısızlığın nedenleri arasında, uygun olmayan ilaç se-

çimi, yetersiz doz, yanlış uygulama ve kötü sindirim (emilme problemi) ve ilacın infeksiyon bölgesine geçişinin az olması sayılabilir. Ayrıca bakteriyostatik ilaçların seçilmesine bağlı olarak konakçıya (sürüye) bağlı nedenler arasında immunsupresyon ve lokalize infeksiyon olması, başarısızlığı açıklamaktadır. Başarısızlıkta mikroorganizmaya bağlı durumlar da sözkonusudur. Bunlar ilaca karşı direnç gelişimi, süperinfeksiyon ve karışık infeksiyon ve sadece birinin tedavisi edilmesidir.

Tedavinin başarıya ulaşması için ilk şart doğru ilaç(lar)ın seçimidir. Bu amaçla duyarlılık, ilacın aktivite spektrumunu, ilacın farmakokinetik özellikleri, ilacın dozu, ilacın verilme yolu ve ilacın yan etkileri iyi bilinmelidir. Sürü tedavilerinde, problemin doğru teşhisi, tedavi seçeneklerinin gözden geçirilmesi, tedaviye başlanması ve uygulama sonrası değerlendirme yapılması kullanılan tedavinin başarıya ulaşması için önemli aşamalarıdır.

Antibiyotiklerde aranan özellikler arasında bakteriler üzerinde düşük konsantrasyonda bakterisidal etki göstermesi, yan ve toksik etkilerinin düşük olması, hedef dokularda yoğunlaşabilmesi, doku enzimleri tarafından etkilenmemeli, ucuz ve stabil olması gereklidir.

Antibiyotiklerin kullanımında bazı önemli noktalar bulunmaktadır. Bunlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- Tedavide kullanılacak ilacın uygun dozda, uygun miktarda, uygun yolla ve uygun süreyle verilmeli tedavi şansını artırır.
- Antibiyotiklerin kombine edilmesinde, bu antibiyotikler arasında sinerjizm olmalıdır, aksi takdirde beklenen etki gözlenmediği gibi antogonizma nedeniyle etkisiz bir tedavi ortaya çıkar.
- Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç profilini saptamaya yönelik geniş çaplı projeler yürütülmelidir. Bu çalışmalara öncelikle insan sağlığını etkileyen bakterilerin izlenmesi ile başlanmalıdır.
- Gıda zincirinde hem kalıntı hem de dirençli bakterilerin kontrolüne yönelik çalışmaların yapılmalıdır.
- Veteriner hekimler, üreticiler ve tedarikçiler, antibiyotiklerin doğru kullanımı ve antibiyotik direncinin önemi konularında bilgilendirilmelidir.
- Klinik vakaların tedavilerinde antibakteriyel ilaç seçimi, antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre yapılmalıdır.
- Klinik tabloların tedavisinde dar spektrumlu antibiyotikler ile tedavi yapılabilecekse, öncelikle bu antibiyotiklerin kullanımı tercih edilmelidir.
- Koruyucu amaçlı antibiyotik uygulamaları, sadece hastalık kayıplarının potansiyel kayıp risklerinin yüksek olduğu durumlarda (tavuk kolerası, sığırlarda yanıkara gibi) kullanılmalıdır.
- Sindirim sisteminin kontrolü amacıyla kullanılan antibiyotiklerin direnç gelişimine etkisi unutulmamalıdır.
- Antibiyotik verilirken ve yasal arınma süresince hayvanlar ve bu dönemdeki ürünler kullanılmamalıdır.

Özet



Bakteriyel üremenin kontrolünde kullanılan yöntemleri açıklamak.

Bakteriler uygun ortamlarda hızla çoğalırlar. Bu nedenle hayvansal üretimde, gıda üretiminde çevre kontrolünde mikroorganizmalar elimine edilmeli ve üreme kontrol edilmelidir. Bu amaçla genel olarak antisepsi, sterilizasyon ve dezenfeksiyon uygulamaları kullanılmalıdır. Bu yöntemlerden amaca uygun olanı seçilmeli ve mikroorganizmalar elimine edildikten sonra mikroorganizmaların üremesi sınırlandırılmalıdır.



Sterilizasyon ve dezenfeksiyon yöntemlerini tanımlamak.

Sterilizasyon bir ortamda tüm mikroorganizmaların öldürülmesidir. Bu işlemi gerçekleştiren fiziksel ve kimyasal yöntemlerden yararlanılmaktadır. Kimyasal maddeler kullanılarak mikroorganizmaların öldürülmesi dezenfeksiyon olarak tanımlanmaktadır. Bu amaçla, birçok kimyasal madde kullanılmaktadır.



Antibiyotiklerin etkilerini açıklamak ve kullanım alanlarını özetlemek.

Antibiyotikler bakterilerin hücre duvarının sentezini önleyerek, sitoplazmik membranın geçirgenliğine mani olarak, protein sentezini inhibe ederek ve nükleik asitler üzerine etki ederek bakterisidal ve/veya bakteriyostatik etki gösterirler. Ayrıca analog maddelerde üremeyi inhibe ederek bakteriyostatik etki gösterirler.



Antimikrobiyal etkinlik testlerini açıklamak.

Antibiyotiklerin klinik vakaların tedavi edilmesi amacıyla bakteriler üzerine etkileri belirlenmelidir. Bu amaçla laboratuvarlarda agar dilüsyon, tüpte dilüsyon teknikleri, E-test ve otomatize testler uygulanarak antibiyotiklerin bakteriler üzerine etkinlikleri belirlenir. Bu testlerden sonra MİK ve MLD değerleri belirlenir.

Kendimizi Sınayalım

- Aşağıdakiler hangisi infeksiyon hastalıklarının ilaçlarla tedavisi anlamında kullanılan terimdir?
 - Bakterisidal
 - Dezenfeksiyon
 - Sterilizasyon
 - Kemoterapi
 - Antisepsi
- Aşağıdakilerden hangisi fiziksel yöntemle sterilizasyonda kullanılmaz?
 - Kaynatma
 - Tindalizasyon
 - Dezenfektan
 - UV ışınları
 - Filtrasyon
- Otoklavla sterilizasyonda kullanılan sıcaklık ve süre aşağıdakilerden hangisinde birlikte ve doğru verilmiştir?
 - 121 °C 15-45 dakika
 - 115 °C 30-45 dakika
 - 72 °C'de 15-45 saniye
 - 165 °C'de 30-45 dakika
 - 165 °C'de 15 saniye
- Aşağıdakilerden hangisi antibiyotiklerin bakteriler üzerine etki şekillerinden biri **değildir**?
 - Bakteri sporlarının oluşumunu engelleme
 - Sitoplazmik membranı etkileme
 - Protein sentezine mani olma
 - Nükleik asit üzerinde etkili olma
 - Hücre duvarı sentezine mani olma
- Kirby-Bauer yöntemi aşağıdakilerden hangisi ile açıklanabilir?
 - Minimal inhibisyon konsantrasyonu
 - Minimal letal doz
 - E-test
 - Tüpte dilüsyon testi
 - Disk difüzyon
- Yüksek ısıdan bozulan maddeler içeren sıvılara üç gün ardışık ısıtma işlemi uygulanmasına ne ad verilir?
 - Pastörizasyon
 - UHT
 - Filtrasyon
 - HEPA
 - Tindalizasyon
- Aşağıdaki hangi dezenfektan bakterilerde membran fonksiyonunu bozarak etki eder?
 - Fenol
 - Asitler
 - Alkaliler
 - Boyalar
 - Ozon
- Tetrasiklin grubu antibiyotiklerin bakteriler üzerindeki etkileri hangi yolla gerçekleşir?
 - Hücre duvarı sentezini bozarak
 - Sitoplazmik membrana etki ederek
 - Protein sentezini bozarak
 - Nükleik asit fonksiyonunu etkileyerek
 - Proteinleri denatüre ederek
- Aşağıdaki antibiyotiklerden hangisi bakterilerde nükleik asitler üzerinde etkilidir?
 - Penisilinler
 - Gentamisin
 - Tetrasiklinler
 - Kinolonlar
 - Amoksisilin
- Aşağıdaki dezenfektanlardan hangisi gaz formunda etki eder?
 - Etilen oksit
 - Alkoller
 - Asitler
 - Gluteraldehid
 - İyod

Okuma Parçası

Kümes hayvanlarının sağlıklı yetiştirilmesi ve hayvanların hastalıklardan korunmasında hijyen ve dezenfeksiyon oldukça önemlidir. Verimliliğin sağlanmasında ilk bileşen sürülerin sağlıklı yetiştirilmesidir. Kanatlı yetiştiriciliğinin tüm aşamalarında hijyenik önlemlerin alınması ve gerekli dezenfeksiyon işlemlerinin uygulanması şarttır. Bu işlemler bir bütündür ve tüm çiftlik genelinde eksiksiz yapılmalıdır. Kümesler, kümese giren ekipman, su, yem, personel, kuluçkalık yumurtalar, kuluçhaneler, kuluçka makineleri, civciv arabaları ve diğer ekipmanlar uygun teknikler ile mikroorganizmalardan arındırılmalıdır. Dezenfeksiyon genel anlamda, infeksiyöz etkenlerin çeşitli kimyasal ve fiziksel işlemlerle yok edilmesidir. Bu işlemler tam anlamıyla uygulandıktan sonra işletmelerde sürdürülen tüm işlemler hijyenik önlemler alınarak yürütülmesi olası mikrobiyel kontaminasyonların önüne geçilmesini mümkün kılar. Kanatlı sürülerinin yumurta ve et üretimlerinin, çıkım güçlerinin ve yaşayabilirliklerinin artırılması ile ilgili sağlanan genetik ilerlemelerin tam olarak ortaya çıkarılabilmesi, sağlıklı sürülerin yetiştirilmesi ile mümkün olabilir. Aksi takdirde sağlanan genetik gelişmeler, etkisi gösteremez. Son yıllarda dünyada yaygın olarak görülen hastalık salgınlarından ortaya çıkan bir gerçek de, hastalıklardan korunma metodlarında daha dikaktli davranılması gerekliliğidir.

Günümüzde sürüler için sağlık taramalarının düzenli bir program ile yapılması, aşılama ve bazı ilaç uygulamaları hayvan sağlığının gelişimine yardımcı olmaktadır. Hijyen ve biyogüvenlik uygulamalarının belirli standartlarda olması infeksiyon etkenlerinin sürüleri etkilemesini sınırlamaktadır.

Hijyen, infeksiyöz karakterde mikroorganizmaların kümese girişinin engellenmesinin sağlanmasıdır. Uygulamalarda infeksiyonun yayılmasını minimize etmek amaçlanmalıdır. Herhangi bir hijyen programından beklenen en iyi sonuç, infeksiyöz hastalık etkeni olan mikroorganizmanın yayılma şekilleri ve idare sistemi ile ilgili alınacak önlemlerle girişin nasıl engelleneceği veya azaltılacağı konularıdır. Kontrol aracı olarak hijyen ve dezenfeksiyonun potansiyel önemi bir infeksiyöz hastalığın epidemiyolojisinin bilinmesiyle ilişkilidir. Örneğin yüzeylerin ve ekipmanların efektif dekontaminasyon yöntemleri, vektörlerin (rodent, vahşi kuşlar, insektler vs) kontrolü, bir bölgede infeksiyonun yayılmasını en aza indirmek gibi işlemler ve önlemler alınmalıdır. Hijyen uygulamaları ve dezenfeksiyon programları

nın etkinliği kanatlı idare sistemlerinin temel bir parçası olmalıdır.

Kanatlı işletmelerinde, dezenfeksiyon işlemlerine ilave bazı önlemlerin alınarak olası kontaminasyon kaynaklarının giderilmesi gerekir. Bu faktörlerin başında rodentlerin kontrolü gelmektedir. Dezenfekte edilmiş olan bir tesisten rodentler giderilemiyorsa sonuçta bazı bakteriyel ve/veya viral kontaminasyonlar şekillenebilecektir. Bu işlem için işletmelerin yapısına ve yerleşimine bağlı olarak, rodent mücadele programlarının uygulanmasında yarar vardır. Bir başka önemli konu ise insektlerin kontrolü olacaktır. İnsektler de rodentlerde olduğu gibi hastalık etkenlerinin taşınmasında rolleri bulunmaktadır.

İnfeksiyon kaynaklarını uzaklaştırmak ve yeniden kontaminasyonun engellenmesi için yapılacak diğer bir işlem de ölü kanatlıların kümeslerin çevresinden uzaklaştırılmasıdır. Bunun için yakma fırınları, ölü çukurları ve rendering kullanılabilir. İşletme için uygun olan yöntemin seçilmesi ve ölülerin mutlaka imhası gerekir. Ölülerin imhasında en sık kullanılan yöntemler arasında ölü çukuru kullanılmaktadır. Ayrıca her üretim bitiminde kümes dezenfeksiyonu yapılmaktadır. Kümes dezenfeksiyonunun yapılmasında temel prensipler aşağıda özetlenmiştir.

Kanatlı kümeslerinin dezenfeksiyonunda belirli bazı aşamaların yapılmasında yarar vardır. Bu aşamaların sırasıyla yapılması mikrobiyel dekontaminasyonu sağlar ve etkin bir dezenfeksiyon yapılmış olur. Kümeslerin ve ekipmanların ön temizleme işlemleri gerçekleştirilmeli ve sonrasında kümes ve ekipmanlar tamamen dezenfektanın uygun konsantrasyonu ile yıkanmalıdır. Ayrıca kümeslerin suluk sistemleri sanitize edilmelidir. Bu işlemden sonra dezenfeksiyonu tamamlanan kümesler ve ekipmanlar kullanılarak kümes yeni sürü için hazırlanmalıdır. Son aşamada fumigasyon ve püskürtme ile dezenfeksiyon işlemleri yapılır ve kümes yeni civcivler için hazır hale gelir. Bu işlemlerden sonra çevresel temizlik, rodent ve yabani hayvanların kontrolü, kümese giriş çıkışların kontrol altına alınması gibi önlemler atlanmamalıdır. Bir kümesin dezenfeksiyonu aşağıdaki gibi yapılabilir.

Kuru temizlik, kümesteki altlık tamamen çıkarılmalı, altlık kümesten uzak bir bölgeye aktarılmalıdır. Kümes dışına çıkarılabilen ekipman dışarı çıkarılmalı ve içinde dezenfektanlı su bulunan bir varil içine konmalıdır. Kümeste çıkarılamayan ekipman varsa yıkama esnasında

zarar görmeyecek şekilde düzenlenmelidir. Yıkama esnasında yıkamayı yapan kişilerin zarar görmesi engellenmelidir.

Yukarıdaki aşamalardan sonra ön yıkama yapılmalıdır. Bu aşamada dezenfektanın uygun konsantrasyonu ile yoğun kirlenmiş bölgeler temizlenmelidir. Gerekirse fırçalanmalıdır.

Bu aşamadan bir gün sonra yıkama işlemine geçilmelidir. Bu işlem, uygun oranda sulandırılmış dezenfektanın metrekareye 0.3-0.5 litre olacak şekilde püskürtülerek tüm kümesin yukarıdan aşağıya yıkanması ile yapılmalıdır.

Su sistemini dezenfeksiyonu için öncelikle su depoları dezenfektanlı su ile iyice yıkanmalıdır. Daha sonra depolara dezenfektanlı su doldurulmalı ve tüm nipellden veya suluklardan dezenfektanlı su geçirilmelidir.

Diğer önemli hususlar arasında, kümes içinde kalan yemliklerin yıkanabilir kısımları yıkanmalıdır. Yıkama esnasında ekipmanların üzerinde dışkı kalıntılarının kalmamasına özen gösterilmelidir. Kümesteki tüm tamiratlar yıkama işlemleri tamamlandıktan sonra yapılmalıdır de basıçlı dezenfektanlı su ile yıkanmalıdır. Yukarıdaki işlemler tamamlandıktan sonra kümes girişlerine dezenfektanlı su konur ve girişler kontrollü yapılır. Kümes kurumaya bırakılır. Son aşamada altlık konur, yemlik ve suluk sistemlerinde gerekli düzenlemeler yapılır. Bu aşamada kümes fumigasyonu yapılabilir. Bu işlemler tamamlandıktan sonra ilave koruyucu önlemlere devam edilmelidir. Giriş ve çıkışlara. Kümes tamamen yıkanmadan badana ve boya işlemleri yapılmamalıdır. Kümes, kümes içindeki ve dışarıdaki ekipmanlar yıkandıktan sonra kümes içine alınmalı ve sonrasında kümes kontrolsüz girişler engellenmelidir.

Kümesteki işlemler tamamlandıktan sonra kümes çevresi dezenfeksiyon havuzları yapılarak çizmeler batırılmalıdır. Ziyaretçiler içeri alınmamalıdır. Alınması gerekli ise, özel elbiseler ve çizmeler ile içeriye alınmalıdır. Kümeslere eller için dezenfektanlar konulmalı, su ve hava sanitasyonu uygulanmalıdır.

Kendimizi Sınavalım Yanıt Anahtarı

1. d Yanıtınız yanlış ise “Bakteriyel Üremenin Kontrolü” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
2. c Yanıtınız yanlış ise “Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
3. a Yanıtınız yanlış ise “Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
4. a Yanıtınız yanlış ise “Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
5. e Yanıtınız yanlış ise “Antibiyotik Duyarlılık Testleri” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
6. e Yanıtınız yanlış ise “Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
7. a Yanıtınız yanlış ise “Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
8. c Yanıtınız yanlış ise “Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
9. d Yanıtınız yanlış ise “Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
10. a Yanıtınız yanlış ise “Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon” konusunu yeniden gözden geçiriniz.

Sıra Sizde Yanıt Anahtarı

Sıra Sizde 1

Biyogüvenliğin sağlanmasında tek başına dezenfeksiyon yeterli olmamaktadır. Bunun sağlanmasında özellikle işletmenin çevreden ayrılması, giriş çıkışların kontrolü, aşılamalar ile hatalıklara karşı spesifik bağışıklığın geliştirilmesi, verilen yemlerin sağlıklı olması, iyi kalitede içme suyunun temini ve uygun bakım-idare uygulamalarını da kapsamaktadır.

Sıra Sizde 2

En uygun sterilizasyon ve dezenfeksiyon yönteminin seçilmesi, direkt olarak hedeflenen işleme bağlı olarak değişir. Örneğin hayvan barınaklarının dezenfeksiyonunda dezenfektan kullanılırken, sütün sterilizasyonunda UHT, besiyerlerinin sterilizasyonunda otaklav, laboratuvar biyogüvenliği için filtrasyon kullanılabilir. Bu seçimde esas uygulanan yöntemin hedeflenen işlemi gerçekleştirebilmesidir.

Sıra Sizde 3

Antibiyotikler sadece duyarlı bakteriler tarafından oluşturulan infeksiyonların tedavisinde kullanılırlar. Dirençli bakteriler ve antibiyotiğin etkili olduğu bakteriler dışında kalan mikroorganizmalara bağlı gelişen infeksiyonlarda kullanılamazlar. Bunun saptanmasında antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması ve ilaçlarla ilgili bilgi birikimine sahip olunması gerekir. Ayrıca bakteri dışında kalan mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonlarda da kullanılmazlar.

Yararlanılan Kaynaklar

- Akan M. Dezenfeksiyon. İzgür M, Akan M. (Ed.) (2002). **Kanatlı Hayvan Hastalıkları**. Medisan Yayınevi.
- Arda M. (2006). Temel Mikrobiyoloji. 3. Baskı. **Midisan Yayınevi**.
- Carter GR, Chengappa MM, Roberts AW. (1995). **Essentials of Veterinary Microbiology**. 5th Ed. Williams and Wilkins.
- Goldman E, Green LH. (2009). **Practical Handbook of Microbiology**. CRC Press.
- Hirsh DC, Zee YC. (1999). **Veterinary Microbiology**. **Blackwell Science**.
- McDonnell GE. (2007). **Antisepsis, disinfection, and sterilization: Types, Action and resistance**. ASM Press, Washington DC.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. (1994). **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe Publishing, London.
- Tenover FC. (2006). **Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria**. Amer J Med, 119:S3-10.
- Teuber M. (2001). **Veterinary use and antibiotic resistance**. Curr Opin Microbiol, 4:493-9.
- Ungemach FR, Müller-Bahrtdt D, Abraham G. (2006). **Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine**. Int J Med Microbiol, S2:33-8.
- Ustaçelebi Ş. (1999). **Temel ve Klinik Mikrobiyoloji**. Güneş Kitavebi.
- Wickens H, Wade P. (2005). **Understanding antibiotic resistance**. Pharm J, 274:501-4

5

Amaçlarımız

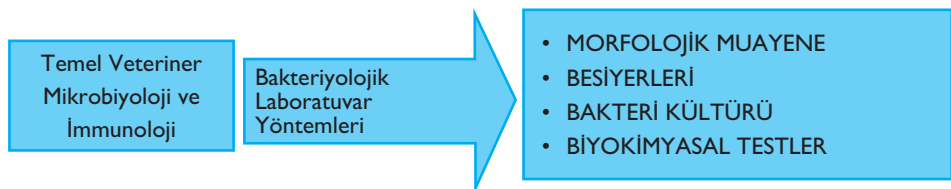
Bu üniteyi tamamladıktan sonra;

- Bakterileri mikroskopik ve makroskopik morfolojik özelliklerine göre tanımlayabilecek,
- Bakterilerin üretilmesinde kullanılan besiyeri çeşitlerini ve bunların hazırlanmasında dikkat edilmesi gereken kuralları açıklayabilecek,
- Bakterilerin besiyerlerinde üretilmesini (bakteri izolasyonu ve kültürü) açıklayabilecek,
- Bakterilerin identifikasyonunda kullanılan önemli biyokimyasal testleri tanımlayabilecek ve bu testlerin değerlendirilmesini açıklayabileceksiniz.

Anahtar Kavramlar

- Morfolojik muayene
- Mikroskopi
- Besiyeri
- İzolasyon
- Bakteri kültürü
- Biyokimyasal testler
- İdentifikasyon

İçindekiler



Bakteriyolojik Laboratuvar Yöntemleri

MORFOLOJİK MUAYENE

Bakterilerin morfolojik muayenesi temel olarak mikroskopik morfolojileri ve makroskopik morfolojilerinin incelenmesine dayanmaktadır.

Mikroskopik Muayene

Lezyonlu bölgelerden hazırlanan boyalı preparatların mikroskopik incelenmesiyle önemli bilgilere basit, hızlı ve ekonomik olarak ulaşılabilir. Mikroskopik inceleme yapılmadan önce mikroskop lamları temiz ve yumuşak bir bez ile silinmeli ve bek alevinden geçirilerek üzerindeki olası yağ tabakası uzaklaştırılmalıdır. Bunun dışında, lamlar sıvı temizleyici ile yıkanıp, durulanıp, kuru temiz bir bez ile kurulularak da incelemeye hazır hale getirilebilir.

Muayenede preparat hazırlanmasında kullanılacak olan küt uçlu bistüri ve pens %70'lik etil alkol içeren bir kap (çoğunlukla rahat çalışmaya imkan verdiği için cam beherler tercih edilmektedir) içerisinde bekletilir. Bistüri ve pens bek alevinde yakılır ve kullanım öncesi soğutulur. Kullanıldıktan sonra ise dezenfektan içeren başka bir kaba alınır. Bir doku lezyonundan preparat hazırlanırken materyal pens ile sıkıca tutulurken bistüri ile materyalin lezyonlu bölgesinin derin katmanlarından kazıntı örneği alınır. Bu doku kazıntıları temiz bir lam üzerine alınıp, başka bir lam bunları ezmek için kullanılarak ince bir preparat hazırlanır. Sıvı ya da visköz örneklerde steril bir svap kullanılarak örnekleme yapılır ve lam üzerine bu materyal ince bir tabaka oluşturacak şekilde yayılarak preparat hazırlanır. Preparatlar hazırlandıktan sonra daha sonraki işlemler öncesinde kurumaya bırakılır. Preparat **fiksasyonunun** amacı vejetatif bakterilerin öldürülmesi, onların boyaya geçirgen hale getirilmesi ve materyalin lama sıkıca sabitlenmesini sağlamaktır. Fikse edilmiş ve boyalı preparatlar bazı bakteriler özellikle de endosporlar inaktive edilmemiş olabileceğinden dikkatle incelenmelidir. İncelendikten sonra boyalı preparatlar otoklavlanmalı veya uzaklaştırılmadan önce güvenilir bir dezenfektan içerisinde 24-48 saat bekletilmelidir. Boyama öncesinde lam preparat hazırlanmış kısmı üstte kalacak şekilde bek alevinden (alevin mavi renkli kısmı üzerinden) 2-3 kez hızlı bir şekilde geçirilerek fikse edilir. Bu aşamada preparatın aşırı ısıtılıp yakılmamasına (lam elin tersini yakmayacak sıcaklıkta olmalıdır) dikkat edilmelidir. Giemsa boyama yönteminde kurutulmuş preparatlar öncelikle absolut metil alkol içerisinde 3 dakika boyunca fikse edilir (kimyasal fiksasyon) daha sonra kurutulularak boyama işlemine geçilir.

Fiksasyon: Bakterilerin lamda tespit edilmesi, lama sabitlenmesi.

Bakterilerin boyutlarının çok küçük olması nedeniyle morfolojilerinin incelenmesinde mikroskoplardan (ışık mikroskobu, faz kontrast mikroskobu, karanlık saha mikroskobu, elektron mikroskobu, floresan mikroskop, stearomikroskop, vb.) faydalanılmaktadır. Sıvı ve katı besiyerlerinde saf olarak üretilen bakterilerden preparatlar hazırlanarak özel boyalarla boyanarak incelenirler. Mikroskopik incelemelerde 100'lük objektif (immersiyon objektifi) kullanılır. Bir mikroskopun toplam büyütme gücünün objektif lens ve okular lens büyütme güçlerinin çarpımıyla hesaplandığı unutulmamalıdır. Bakterilerin büyüklükleri (küçük, büyük, vb.), morfolojik şekilleri (yuvarlak, oval, kokoid, çomak, kokobasil, virgül, spiral, pleomorfik, vb.), kenarları (düz, köşeli, eğri, paralel, vb.), dizilişleri (ikili ve dördü kumeler, salkımlar, zincir oluşumu, filamentler, vb.) spor oluşturup oluşturmamaları (oluşturuyorsa lokalizasyonları, merkezde, uçlarda, subterminal, vb.), granül bulunup bulunmaması varsa bipolar olup olmadığı, boyanma özelliği (Gram pozitif ya da Gram negatif, asido rezistans pozitif ya da negatif, vb.) araştırılır. Bunun dışında, 12-24 saatlik taze sıvı kültürlerden hazırlanan preparatlarda hareket muayenesi yapılarak bakterinin hareketli olup olmadığı belirlenir. Mikroorganizmaları iyi görebilmek ve ayrıntılarını incelemek için birçok genel ve özel boyama yöntemleri ortaya konulmuştur. Bu yöntemler içinde en uygun olanı belirlenerek boyama işlemi yapılır. Mikrobiyolojide kullanılan boyama yöntemleri 2 gruba ayrılır.

Basit Boyama Yöntemleri

Preparatlardaki mikroorganizmalar hakkında kısa süre içinde bilgi edinmek için tek boya solüsyonu kullanılır. Basit boyamada, boya preparata bir defa uygulanır ve bakteriler boyaların karakterine göre boyanırlar. Bu amaçla, karbol fuksin, kristal viyole ve metilen mavisi gibi genellikle bazik boya solüsyonları seçilir.

Karbol fuksin ile boyama: Bu boyama yöntemi *Campylobacter* türleri, *Serpulina hyodysenteriae* ve *Fusobacterium necrophorum* gibi bakterilerin görüntülenmesinde kullanılır. Kurutulmuş ve fikse edilmiş preparatlar üzerine, karbol fuksin solüsyonu konur ve 5-10 saniye lam üzerinde bırakıldıktan sonra boya dökülür ve hafif akan su ile yıkanır. Kurutma kağıdı ile veya havada kurutulduktan sonra üzerine sedir yağı konarak immersiyon objektifi ile bakılır. Mikroorganizmalar kırmızı renkte görülürler.

Kristal viyole ile boyama: Hazırlanan preparat üzerine boya solüsyonundan konarak 20-30 saniye kadar beklenir. Sürenin sonunda boya dökülür, preparat su ile yıkanır, kurutulur ve immersiyon objektifi ile muayene edilir. Mikroorganizmalar bu boyama yönteminde mor renkte görülürler.

Metilen mavisi ile boyama: Bu amaçla Löffler metilen mavisi solüsyonu kullanılır. Preparat üzerine boya solüsyonu konarak 5-8 dakika bekletilir. Preparat üzerine boya solüsyonu konarak 5-8 dakika bekletilir. Boya dökülür, preparat su ile yıkanır, kurutulur ve immersiyon objektifi ile muayene edilir. Mikroorganizmalar bu boyama yönteminde mavi renkte görülürler.

Negatif boyama: Bu boyama yönteminde mikroorganizmalar yerine saha boyanır. Karanlık olan sahada mikroplar renksiz veya parlak olarak görülürler. Boya olarak nigrosin veya çin mürekkebi kullanılır. Lam üzerine bir damla boya ve sonra bir damla kültür koyarak yayılır ve ince bir froti hazırlanır. Kurulduktan sonra muayene edilir. Bu boyama yöntemi kapsül ve spiroketleri incelemek için kullanılır.

Bileşik Boyama Yöntemleri

Birden fazla boyanın uygulanması ile yapılan boyama yöntemleridir. Bunlar arasında *diferensiyel boyamalar* mikroorganizmaları birbirinden ayırmada kullanılır (Örn. Gram boyama, Ziehl-Neelsen boyama). *Yapısal boyamalar* ise, bakterilerin iç ve dış yapıları hakkında bilgi edinmek için kullanılan bileşik boyama yöntemleridir (Örn. Spor boyama, kapsül boyama, flagella boyama, vb.).

Gram boyama: Gram boyama yöntemi laboratuvarlarda en yaygın olarak kullanılan bakteriyolojik teşhis yöntemidir. Bu yöntemde preparat hazırlanır, kurutulur ve tespit edilir. Preparatlar kristal viyole solüsyonu ile 2-3 dakika süresince boyanır. Boya dökülür ve preparat üzerine lugol (iodine) solüsyonu eklenerek 1-2 dakika beklenir. Lugol solüsyonu dökülür. Absolut alkolde alkol renksiz akıncaya dek dekolorasyon (boyanın uzaklaştırılması) işlemi gerçekleştirilir. Su ile yıkılarak alkol uzaklaştırılır. Kontrast boya ile (Örn. Safranin, eosin, sulu fuksin) 30 saniye boyanır. Su ile yıkanarak boya giderilir. Preparatlar kurutma kağıdı veya havada kurutulur. İmmersiyon (sedir) yağı konarak immersiyon objektifi ile incelenir. Bu yöntemle mavi renkli ya da mor görülen mikroorganizmalar Gram pozitif ve kırmızı veya pembe renkli mikroorganizmalar ise Gram negatif olarak değerlendirilir. Bakterilerin Gram pozitif ya da Gram negatif boyanmaları Gram boyama prensipleri ile açıklanabilir. Buna göre, Gram pozitif mikroorganizmalar, negatiflerden daha düşük pH limitlerine sahiptirler. Bu nedenle de bazik boyalara karşı affiniteleri fazladır. Gram pozitiflerden elde edilen lipoidal maddelerin özelliği Gram negatiflerinkinden farklıdır. İlkinde doymamış yağ asitleri daha fazladır ve aynı zamanda oksidan maddelere olan ilgileri de yüksektir. Kullanılan mordanların oksidan olması bazik boyalara karşı affiniteyi artırır. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı peptidoglikan yapısında olup miktarca çok fazladır. Bu yapısal özellik Gram negatiflerde ise çok azdır. Bu tabakanın giderilmesi, Gram pozitif mikropları Gram negatif hale sokar. Gram pozitiflerde aynı zamanda magnezyum ribonukleat da fazla miktarda bulunur. Bu madde negatiflerde yoktur. Alkolle dekolorasyonun gereğinden uzun süre yapılması Gram negatifliğe eğilimi artırır. Gram pozitiflerde hücre duvarında teikoik asit vardır.

Bilinen bir Gram pozitif ve Gram negatif bakteriye yapılan Gram boyama uygulaması sırasında lugol (iodine) aşaması unutulursa ne olur? Bu preparatların immersiyon objektifiyle incelenmesi sırasında ne görülür? Bu görünümün nedeni ne olabilir?



Ziehl-Neelsen Boyama: Tüberküloz etkenlerinin (mikobakteriler) hücre duvarında fazla miktarda balmumu tabakasının bulunmasından dolayı bu bakterilerin diğer boyama yöntemleri ile boyanması mümkün olmamaktadır. Bu nedenle boya içerisine fenol konur ve alttan hafifçe ısıtılarak balmumu tabakası yumuşatılarak bakterinin boyayı alması sağlanır. Boya içeriye alındıktan sonra asit alkolde bakteri dekolore olmaz ve boyayı bırakmaz. Bu yöntemde, preparat hazırlanır, kurutulur ve tespit edilir. Lamlar boyama ızgarası üzerine düzenli olarak yerleştirilir. Lam üzerine ve bütün lamı kaplayacak şekilde karbol fuksin solüsyonu eklenir. Izgaranın altından 4-5 dakika ve aralıklı olarak ısıtılır. Bu işlem gerçekleştirilirken preparatın yanmamasına, kabarcıkların çıkmamasına dikkat edilir. Preparatların üzerindeki boyadan hafifçe buhar çıkması normaldir. Boya dökülür ve preparat asit-alkolde (%95 alkol + %3 HCl asit) dekolore edildikten sonra preparatlar su ile yıkanır. Preparat üzerine metilen mavisi solüsyonu konur ve 10-15 saniye boyanır.

Boya dökülür ve preparatlar suyla yıkandıktan sonra kurutulularak immersiyon yağı eklenerek mikroskopta muayene edilir. Bu boyama yönteminde, mikobakteriler veya asidorezistans mikroorganizmalar pembe kırmızı renkte, diğer bakteriler ise mavi renkte görülürler.

Kapsül boyama: Bakterilerde kapsülleri göstermek için negatif boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Bunun için, çok temiz ve yağsız bir lam üzerine bir öze dolusu nigrosin veya çin mürekkebi konur ve katı besiyerinden alınan koloni ile süspansiyon yapılır. Ayrıca, eğer sıvı kültürden boyama yapılacaksa bir öze dolusu sıvı kültür alınarak boya solüsyonu ile karıştırılır ve üzerine lamel kapatılır. Karanlık saha mikroskopunda bakteriler ve etrafındaki kapsül açık renkte görülür. Bu yöntemle, *Diplococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* gibi kapsül oluşturan bakterilerin muayenesi yapılabilir.

Flagella boyama: Flagellalar küçük ve ince yapıları nedeniyle en iyi elektron mikroskopta incelenebilirler. Ancak, özel olarak boyanmak suretiyle ışık mikroskoplarında da muayene edilebilirler. Bunun için flagella üzerine boya biriktirilerek yaklaşık 10 misli kadar kalınlaştırılarak görüntülenmesi sağlanır. Flagella boyama için en uygun yöntem modifiye Leifson veya Kodaka tekniğidir. Modifiye Leifson yönteminde temiz, yağsız ve pürüzsüz 4-5 lamın altına kalemle halka şeklinde birer daire çizilir. Bu dairenin içine formolle inaktive edilmiş ve santrifujle yıkanarak konsantre edilmiş bakteri solüsyonundan bir öze dolusu konur. Bu süspansiyonların üzerine özel olarak hazırlanmış tannik asitli bazik fuksinden 1'er ml konur ve 6, 8, 10, 12 ve 15 dakika süreyle boyama yapılır. Boya solüsyonu çok hafif akan su ile yıkanarak giderilir. Metilen mavisi ile 30 dakika boyanır. Preparatlar yıkanır, kurutulur ve immersiyonla incelenir.

Spor boyama: Bazı bakteri türleri endospor adı verilen özel yapılar oluştururlar. Endospor duvarları normal boyaların penetrasyonuna karşı oldukça dirençlidirler. Basit boyama uygulandığında sporlar bakteri hücresi içerisinde temiz, cam benzeri, kolayca fark edilebilen alanlar şeklinde görülürler. Dolayısıyla aslında sporları görmek için özel bir endospor boyası uygulamaya gerek bulunmamaktadır. Ancak, diferansiyel Schaeffer-Fulton spor boyama yöntemi sporları daha kolay fark edilir kılar. Spor boyamada, ısı ile fikse edilmiş preparatların üzerine malaşit yeşili eklenir ve buhar çıkana değin preparatlar alttan hafifçe ısıtılırlar. Yaklaşık 5 dakikalık ısıtma sonucunda endospor duvarları boya için geçirgen hal alır. Preparat 30 saniye boyunca suda yıkanarak yeşil boyanın kendisini tutan endospor hariç hücrenin diğer kısımlarından uzaklaştırılması sağlanır. Daha sonra kontrast boya olarak safranin lamlara uygulanarak hücrelerin spor oluşturmayan, vejetatif kısımlarının boyanması sağlanır. Endospor oluşturmayan kültürlerin hücreleri kırmızı renkli, endospor içeren hücreler ise yeşil renkli endospor içeren kırmızı vejetatif hücreler halinde görülür. Fikse edilen preparatlar geniş bir kap veya lavabo üzerine yerleştirilen boyama ızgarası üzerine düzenli bir şekilde dizilir. Boyama solüsyonları preparat yüzeylerinin tamamını kaplayacak şekilde uygulanır ve uygun süreler boyunca preparatlar üzerinde bırakılır. Her bir boya solüsyonu uygulaması arasında preparat hafifçe akan musluk altında yıkanır, suyun fazlası dökülerek izleyen solüsyon uygulanır. En sonunda boyalı preparat yıkanır ve havada kurutulur. Bu amaçla kurutma kağıtları da kullanılmaktadır.

Makroskobik Muayene

Bakterilerin makroskobik muayenesinde katı ve sıvı besiyerlerindeki saf kültürlerinin üreme özellikleri dikkate alınmaktadır.

Bakterilerin çoğu (embriyolu tavuk yumurtaları, hücre kültürleri ve deney hayvanlarında üretilen riketsiya ve klamidyalar hariç) katı ve sıvı besiyerlerinde aerobik, anaerobik ve mikroaerofilik koşullarda üretilmektedir. Uygun sıcaklıklar (çoğunlukla 37°C) ve süreler boyunca uygun bileşimdeki veya zenginleştirilmiş besiyerlerinde inkube edilen bakteriler gözle görülebilecek büyüklükte koloniler oluştururlar. Bakterilerin katı ortamlarda oluşturduğu kolonilerin morfolojik ve yapısal özellikleri ve büyüklükleri ayrıntılı olarak incelenir. Stereomikroskop ve gözle yapılan muayeneler sonucunda oluşan kolonilerin smooth (S), rough (R), mukoid (M) ve L formları, renkleri, kokuları, hemoliz durumları ve diğer morfolojik özellikleri ayrıntılı olarak gözlenir ve belirlenir.

Sıvı besiyerlerinde bakteriler, belirli inkubasyon sürelerini takiben ya homojen bulanıklık oluşturmakta, bazıları üstte pelikül oluştururken bazıları ise dipte tortu, saç benzeri ya da granüllü bir üreme göstermektedir. Üreme şekli besiyerinin bileşimine, inkubasyon sıcaklığı ve süresine ve o bakteri türünün genetik özelliklerine bağlı değişkenlik gösterebilmektedir.

Bakteri türleri kendilerine özel renk, koku, büyüklük ve yapıda koloniler meydana getirirler. Bu özellikler hücrenin genetik kontrolü altında şekillenirler. Büyüklüğüne göre değişmek üzere bir kolonide milyonlarca veya milyarlarca bakteri hücresi bulunabilir. Bazı bakteriler (Örn. *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, vb.) uygun koşullar altında 24 saat içerisinde oldukça büyük ve gözle görülebilir koloniler oluştururken bir kısım bakteriler de (Örn. Brusella türleri, korinebakteriler, vb.) ancak 2-3 günlük bir inkubasyonu takiben görülebilecek düzeye ulaşan koloniler oluştururlar. Koloninin büyüklüğü uygun koşullar (besiyerinin bileşimi, oksijen, ısı, vb.) altında türlere özel bir karakter taşır. Streptokok, korinebakteri, pastörella, brusella, vb. bakterilerin kolonileri küçük olup 0.5-1.0 mm çapındadır. Buna karşın, *E. coli*, *Bacillus anthracis*, *B. subtilis* gibi bakterilerin kolonileri ise daha büyüktür. Kolonilerin şekli de türlere özel bir durum gösterir. Hastalık olgularından yeni izole edilen suşlara ait koloniler küçük, yuvarlak ve üzerleri düzgün (smooth karakterde S-tipi koloni) iken, eskimiş veya birçok pasajı yapılmış suşların bazı kolonileri kenarları çentikli, üzerleri pürüzlü ve mat bir görünümündedir (rough karakterde, R-tipi koloni). Mikoplazma ve L-formlarında, ortası düğmeli kolonilere rastlanır. Kolonilerin, bakteri cinslerine ve çevre koşullarına göre, pigment, koku, hemoliz karakteri ve diğer özelliklerinde de bazı değişiklikler meydana gelebilir. Örneğin, *Bacillaceae* familyasına ait aerobik (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, vb.) ve anaerobik cinslerde (klostridiumlar) kolonilerin kenarları filamentlidir. *Proteus vulgaris* kanlı agar üzerinde dalgalar halinde yayılan bir üreme tarzı gösterir. *Pseudomonas aeruginosa* ortama yaydığı pigment nedeniyle besiyerinin (nutrient agar) rengini yeşile dönüştürür. M-tipi (mukoid) koloni tipi kapsüllü veya mukoid salgı oluşturan bakterilerde (Örn. *Diplococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, vb.) görülür. Bu kolonilere öze değdirilince iplik gibi bir uzama görülür. Tipik hücre duvarı oluşturamayan bakteriler katı ortamlarda üstü ve yanları düzensiz, ortası düğmeli ve granüllü koloniler meydana getirirler. Bu koloni tarzı oluşumuna penisilin, kimyasal maddeler, yüksek ozmotik basıncın etkisi bulunmaktadır.

Farklı bakterilerin koloni morfolojilerinin ve mikroskopik morfolojilerinin resmedildiği <http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/forsidekolonier.asp> adresinde on-line mikrobiyoloji atlasına ulaşabilirsiniz.



İNTERNET



Bakterilerin direkt bakısında kullanılan boyama yöntemlerinde boya solüsyonlarının hazırlanması için Temel Mikrobiyoloji adlı kitaba bakabilirsiniz. (Arda, M., Ankara: Medisan Yayınları, 2006).

BESİYERLERİ

Besiyerleri bakterilerin üretilmesinde kullanılan, bakterilerin ihtiyaç gösterdikleri besin maddelerini, kimyasal maddeleri, indikatör maddeleri ve katkı maddelerini içeren katı ve sıvı formdaki ortamlardır. Bakterilerin üretilmesi ve identifikasyonlarında kullanılan besiyerleri farklı gruplar içerisinde sınıflandırılabilir. İçerdiği her bir bileşimin tam olarak miktarının bilindiği besiyerleri *kimyasal formülü tanımlanmış besiyerleridir*. Bunlar çoğunlukla deneysel amaçlarla kullanılmaktadır. Sitrat buyyon, bakteri teşhisi amacıyla kullanılan kimyasal formülü tanımlanmış besiyerine örnektir. (Tablo 5.1) Nazlı üreme özelliğinde olmayan bakterilerin üretilmesinde kullanılan Nutrient Agar gibi besiyerleri *temel besiyeri* olarak adlandırılır. Bakterilerin, özellikle de nazlı üreme özelliği gösteren streptokoklar gibi bakterilerin üretilmesinde kullanılan kanlı agar gibi kan, serum veya yumurta sarısı ile zenginleştirilmiş besiyerleri *zenginleştirilmiş besiyeridir*. Salmonellaların selektif olarak üretilmesinde kullanılan selenit buyyon gibi belirli bir bakteri için selektif özellikte olan sıvı besiyerleri *zenginleştirme buyyonlarına* örnektir. Belirli bir bakterinin ya da bir grup bakterinin üremesi için selektif hale getirilmiş besiyerleri *selektif besiyerleri* olarak adlandırılır. Bunlar, istenmeyen bakteri türlerinin üremesinin baskılanması için inhibitör maddeler içerirler. Brilliant green agar ve MacConkey agar gibi çoğu selektif besiyeri aynı zamanda indikatör besiyeridir. *Differensiyal (indikatör) besiyerleri* ise, bakteri identifikasyonu açısından çok kullanışlı besiyerleridir. Bunun nedeni, besiyerinin içerisindeki indikatör maddelerle bakteri üremesine bağlı olarak meydana gelen biyokimyasal reaksiyonlarla bakterilerin ön identifikasyonu gerçekleştirilebilmesidir. İndikatör besiyeri çoğu zaman fermente edilebilir bir karbonhidrat ile besiyerinde renk değişikliğini sağlayan bir pH indikatörü içermektedir. Örn. MacConkey agar fermente edilebilir karbonhidrat içeriği olarak laktozu, pH indikatörü olarak da nötral kırmızıyı (neutral red) içerir. *Escherichia coli* gibi bakteriler besiyerindeki (MacConkey agar) laktozu fermente ederek koloni ve bunları çevreleyen besiyerinin rengini pembeye çeviren asidik metabolitler oluştururlar. Laktozu fermente edemeyen Salmonellalar ise besiyerindeki peptonu kullanarak alkali metabolik ürünler oluştururlar. Bu nedenle, salmonella kolonileri ve bunları çevreleyen besiyeri solgun sarı renkte görülür. İndikatör besiyerlerine başka örnekler olarak hidrojen sülfid üretimini ortaya koyan XLD agar ve eskulin hidrolizini ortaya koyan Edwards besiyeri verilebilir. Kanlı agar bir zenginleştirilmiş besiyeri olarak tanımlanmasına rağmen belirli bir bakterinin hemoliz çeşidini göstermesi nedeniyle aynı zamanda bir indikatör besiyeridir.

Besiyeri	Kullanım alanı	Şeker ve diğer substratlar	pH indikatörü	İnhibitörler
Nutrient agar	Temel besiyeri. Nazlı üreme özelliğinde olmayan bakterilerin üretilmesi	-	-	-
Kanlı agar	Nazlı üreme özelliğinde olanlar da dahil birçok bakterinin üretilmesi	Eritrositler (Hemolizin gösterilmesi)	-	-
MacConkey agar	Enterobakteriler ve diğer bazı Gram negatif bakterilerin üretilmesi	Laktoz	Nötral kırmızı	Safra tuzları
Brilliant green agar	Salmonella ve bazı bakterilerin izolasyonu	Laktoz, sukroz	Fenol kırmızısı	Brilliant green boyası
XLD agar	Salmonella ve bazı bakterilerin izolasyonu	Ksiloz, laktoz, sukroz, lizin, H ₂ S saptanması	Fenol kırmızısı	Safra tuzları
TSI agar	Salmonella identifikasyonu	Laktoz, sukroz, dekstroz, H ₂ S saptanması	Fenol kırmızısı	-
Selenit buyyon	Salmonella izolasyonunda kullanılan zenginleştirme brothu	-	-	-
EMB agar	<i>Escherichia coli</i> identifikasyonu	Laktoz, sakaroz	Eozin ve metilen mavisi	-
Edwards besiyeri	Streptokoklar için selektif besiyeri Eskülin hidrolizi ve hemolizi ortaya koyar	Eskülin Eritrositler	-	Kristal viyole Tallus sülfat
Çikolata agar	Hemofilus türleri için zenginleştirilmiş besiyeri	Lize eritrositler X ve V faktörleri	-	-

XLD agar: xylose-lysine-desoxycholate agar, TSI agar: Triple sugar iron agar, EMB agar: Eosin-Methylene blue agar (*E. coli* kolonileri besiyerinde yeşil metalik parlama verir).

Tablo 5.1
Bakteriyolojik teşhis laboratuvarlarında kullanılan başlıca besiyerleri.

Yukarıda bahsedilen besiyerleri ticari olarak dehidre tozlar olarak ya da tek kullanımlık plastik petrilere önceden dökülmüş ve kullanıma hazır şekillerde de temin edilebilirler. Ayrıca, besiyeri içerisindeki bileşenler ve bunların besiyeri içerisindeki miktarları tartılarak laboratuvar da hazırlanabilirler.

Besiyerlerinin Bileşimine Giren Başlıca Maddeler

Agar: Besiyerlerinin katı hale getirilmesi için en çok kullanılan jelleştiricidir. Çoğu kez diğer agarlı besiyerleri ile karıştırılmaması için “agar agar” olarak anılır. Agar deniz yosunlarından elde edilir. Agarın katılaştırma (jelleştirme) özelliğini bileşimindeki D-galakton sağlar. Bileşiminde ayrıca inorganik tuzlar, çok az miktar-

da protein benzeri maddeler ve eser miktarda yağ vardır. Mikrobiyolojide kullanılan agarlar özel olarak saflaştırılarak antimikrobiyel maddeler ve pigmentlerden arındırılır. Yaklaşık olarak 85-90°C'de erir, 40-45°C'de ise katılaşır. Besiyerlerinin pH'sının düşük olması ve uzun zaman yüksek ısıya maruz bırakılması, agarın katılaşmasına engel olur. Besiyerine amaca göre %0,05-2 gibi geniş bir sınırdan ilave edilebilir. Düşük agar konsantrasyonları (%0,05-0,3) genellikle hareketliliğin belirlenmesi, mikroaerofilik karakterdeki bakterilerin geliştirilmesi gibi özel amaçlarla kullanılır. Standart kullanım konsantrasyonu %1-1,5'tir.

Beyin ekstraktı: Beyin ekstraktı (brain extract) ve kalp ekstraktı (heart extract) streptokoklar, pnömokoklar, meningokoklar, gonokoklar vb. gibi nazlı üreyen (fastidious) patojen bakterilerin üretilmesi için Brain Heart Buyyon ve Brain Heart Infusion gibi isimlerle anılan besiyerlerinin bileşimine katılır. Ayrıca, çeşitli toksin testleri için patojenlerin bu besiyerinde geliştirilmesi önerilmektedir.

Et ekstraktı: Et ekstraktı (et özütü, meat extract), genellikle yağı ve tendonları ayrılmış, ekstraksiyon öncesi hafifçe hidrolize edilmiş etten elde edilir. Karbohidrat içermez. Bu nedenle karbohidratlardan asit oluşturma testlerinde kullanılabilir. Çeşitli besiyerlerinde et peptonlarının yerini alabilir.

Karbonhidratlar: Bazı besiyerlerinin bileşimine bakteriler için enerji ve karbon kaynağı olarak katılan karbohidratların bir başka kullanım amacı karbohidratlardan asit oluşturmaya dayalı identifikasyon testleridir. Besiyeri bileşiminde karbon kaynağı olarak en çok kullanılan karbohidratlar glikoz, laktoz ve sakkarozdur. Bunlardan glikoz pek çok bakteri tarafından kullanılabilirdiği için, daha çok genel besiyeri bileşimlerinde yer alır. Koliform grubu bakterilerin geliştirileceği besiyerlerinin hemen hepsinde karbon kaynağı olarak laktoz kullanılır. Koliformların analizi için hazırlanmış sıvı besiyerlerinde laktozdan gaz oluşumu bu grup için belirleyicidir. Gaz çıkışı basit olarak Durham tüpü ile belirlenir. Nişasta kullanımı (hidrolizi) bazı bakteriler için tipik olduğundan çeşitli özel besiyerlerinin bileşimine katılır. Genel olarak karbohidratların çözelti halinde filtrasyon ile sterilize edilmesi önerilir.

Maya ekstraktı: Maya ekstraktı (maya özütü, yeast extract), proteolitik olarak otolize edilmiş (parçalanmış) bira mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*) sulu ekstraksiyonu ile elde edilir. Özellikle, yüksek B kompleks vitamini konsantrasyonu sayesinde çoğu mikroorganizmanın iyi bir şekilde gelişmesini sağlar. Bileşimindeki aminoasitler, peptitler, vitaminler, karbohidratlar ve mineraller nedeniyle pek çok mikrobiyolojik çalışmada besiyeri katkısı olarak kullanılır.

Pepton: Pepton terimi, proteinlerin hidrolizi ile elde edilen ürünlere verilen genel isimdir. Yaşayan tüm hücrelerde olduğu gibi mikroorganizmalar da azot, karbon, tuzlar ve diğer besin maddelerine gereksinim duyarlar. İstisnalar dışında, mikroorganizma gruplarının oldukça büyük bir bölümü, proteinleri azot kaynağı olarak kolaylıkla kullanamaz. Bu nedenle azotlu bileşikleri, çok daha kolay kullanabildikleri protein hidrolizatlarından sağlar. Peptonlar sadece azot değil, karbon kaynağı olarak da mikroorganizmalar tarafından kullanılır. Bunun yanında, peptonların bileşiminde bulunan bazı aminoasitler ve vitaminler de bazı mikroorganizmalar için gelişme faktörü olarak oldukça önemli işlev görür. Peptonlar mikrobiyolojide tek başlarına besiyeri olarak kullanılabilen ender maddeler arasındadır. Pek çok bakteri, bileşimi sadece %1 pepton olan besiyerinde kolaylıkla geliştirilebilir. Aksine bir belirtme yoksa, mikrobiyolojide "pepton" denildiğinde, pankreatin enzimi ile hidrolize edilmiş et peptonu (Peptone from meat, pancreatic) anlaşılır.

Serum: Sıvı veya katı ortamlara %5-10 oranında ilave edilir. Bileşiminde organik ve inorganik maddelerle üretme faktörleri de vardır. Güç üreyen mikroorganizmaların gelişimini kolaylaştırır.

Sodyum klorür: Çoğu besiyerinin bileşimine izotonik bir ortam oluşturmak için katılır. Tuza dayanıklı (halotolerant) ve tuz seven (halofil) bakterilerin selektif izolasyonu için yüksek konsantrasyonlarda özel besiyerlerinin bileşimine katılır.

Su: Su besiyerlerinin esasını teşkil eder. Besiyeri hazırlamada kullanılan suyun damıtma veya deiyonizasyon ile taze hazırlanmış olması, başta bakır olmak üzere toksik metalleri içermemesi gerekir. Damıtık (distile) su için en ideali, cam sistemlerden elde edilen suyun kullanılmasıdır. Taze hazırlanmış saf suyun pH'sı 6,5-7,5 arasında olmalıdır.

Bütün bakteriler besiyerlerinde üretilebilir mi? Besiyerlerinde üretilemeyen bakteriler nasıl identifiye edilir?



Besiyerlerinin Hazırlanması

Besiyerleri hazırlanırken her zaman için öncelikli olarak üretici kullanım talimatları dikkate alınmalıdır. Ancak, bunlara ilaveten genel olarak şu kurallara ayrıca dikkat edilmelidir:

Besiyerlerinin hazırlanmasında deterjan ve diğer kimyasallardan arındırılmış temiz cam malzeme kullanılmalıdır. Besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılacak cam malzemelerin içlerine daha önceden sterilize edilmiş besiyerleri dağıtılmayacaksa bunların ayrıca sterilize edilmesine gerek bulunmamaktadır. Besiyerleri hazırlanırken uygun miktarlarda dehidre besiyeri temiz bir hassas terazi üzerinde tartılır, cam erlene eklenir ve buna uygun hacimde distile su ilave edilir. Her zaman için camda distile edilmiş su kullanılmalıdır, çünkü bu şekilde distile edilmiş su bakteriler için inhibitör olan klor ve ağır metal iyonlarını içermemektedir. Hazırlanacak olan besiyeri final hacminin iki katı hacimdeki cam erlen içerisinde hazırlanmalıdır. Örneğin, 500 ml'lik bir besiyeri hazırlanacaksa bu besiyerinin 500 ml'lik erlen yerine 1000 ml'lik erlende hazırlanması gerekmektedir. Bu, besiyerinin hazırlanışı sırasında uygun bir biçimde karıştırılmasına olanak sağlar ve ısıtılması veya kaynatılması esnasında oluşacak kabarcıkların taşmasına engel olur. Agar içermeyen (sıvı) besiyerleri hafifçe karıştırılmak suretiyle kolaylıkla çözdürülebilirken, agar içeren dehidre besiyerleri en iyi kaynaya kadar cam bir çubukla karıştırılarak veya manyetik karıştırıcı bir ısıtıcı üzerinde çözdürülmektedir. Otoklavla sterilizasyon öncesi besiyerlerinin çözdürülmesi amacıyla Koch cihazında da faydalanılmaktadır. Dehidre besiyerleri çözdürüldükten sonra çoğunlukla otoklavda 121°C'de 15 dakika süresince sterilize edilir. Edwards besiyeri gibi bazı besiyerleri bu yüksek sıcaklıkları tolere edemeyen bileşenler içerdiklerinden bunlar 115°C'de 20 dakika boyunca tutularak veya üreticinin önerdiği farklı talimatlar dikkate alınarak sterilize edilirler. Brilliant green agar birçok bakteri için inhibitör olan bir besiyeridir ve otoklave edilmez, sadece kaynatılıp soğutulularak hazırlanır.

Otoklavlandıktan sonra agar içeren besiyerleri cam petrilere dökülmeden önce 50°C'ye önceden ayarlanmış su banyolarında soğutulmalıdır. Bunu sağlamanın başka bir pratik yolu ise otoklavdan çıkan erlenler düzenli aralıklarla kontrol edilerek yanağı yakmayacak sıcaklığa eriştiğinde önceden düzenlenmiş cam petrilere besiyeri dökülür. Agar yaklaşık olarak 42°C'de katılaşmaktadır. Bu nedenle agar soğutulurken eğer su banyosu kullanılmayacaksa fazla bekletilmemelidir, yoksa agar erlen içerisinde katılaşır ve tekrar hazırlanması gerekir. Standart 90 mm çapın-

daki cam petrilere petrinin üçte birini dolduracak şekilde 15 ml besiyeri dökülmesi yeterlidir. Bu hacmin altında dökülen besiyerleri çok ince olup öze ile ekim yapılırken besiyerinin yırtılmasına, hacmin üstünde dökülen besiyerleri ise besiyeri israfına ve çalışmalar ve rutin uygulamalar için planlanandan daha az petri hazırlanmasına neden olur. Dolayısıyla, 500 ml'lik bir besiyerinden yaklaşık 30-35 besiyeri içeren petri hazırlanması gerekmektedir. Serum veya kırmızı kan hücreleri gibi bazı supplementler yüksek sıcaklıkları tolere edemediklerinden bunların besiyeri 50°C'ye soğutulduktan sonra steril solüsyonlar veya süspansiyonlar olarak ilave edilmesi gerekmektedir. Dökülen besiyerleri katılaştıktan sonra bunlar tamamen kuruyana kadar oda sıcaklığında ya da birkaç saat boyunca 37°C'lik etüvde tutulmalıdır. Eğer agarlar tamamen kurumadan buzdolabına kaldırılırsa yüzeylerinde aşırı nem oluşumu gözlenir. Kullanım açısından agar yüzeyleri belirgin derecede nem içermemelidir, ayrıca agarın gereğinden fazla etüvde tutulup aşırı kurutulması da izleyen uygulamalar açısından sakıncalıdır. Cam petrilere hazırlanan besiyerleri agar yüzeyleri üste gelecek şekilde 4°C'de buzdolabında ideal olarak buzdolabı poşetlerinde saklanmalıdır. Başka önemli bir nokta ise yeni dökülen besiyerlerinden birkaçının etüvde 24 saat 37°C'de tutularak kontaminasyon kontrollerinin yapılmasıdır.

Teşhis Laboratuvarlarında Kullanılan Başlıca Besiyerleri

Nutrient Buyyon ve Nutrient Agar

Bu besiyerleri birçok mikroorganizmanın üretilmesi için uygun kompleks besiyerlerindedir. Nutrient buyyon besiyeri içeriğinde 5g pepton, 3g et ekstraktı ve 8g NaCl içerir. Bunlar tartılarak distile su ile 1000ml'ye tamamlanır. Isıtılarak çözündürülür ve besiyerinin pH'sı 7.2'ye ayarlanır. Tüplere dağıtıldıktan sonra 15 dakika 121°C'de otoklave edilerek kullanılmaya kadar 4°C'de saklanır. Nutrient agar yukarıdaki bileşenlere %1.5-3 oranında agar katılarak hazırlanır.

Kanlı Agar

Kanlı agar bir bakteriyolojik teşhis laboratuvarının en önemli besiyeridir. Bunun nedeni besiyerinin zenginleştirilmiş özelliği nedeniyle nazlı üreme özelliğine sahip bazı bakteriler dahil olmak üzere birçok mikroorganizmanın üremesine olanak sağlaması, ayrıca bu besiyerinin hem etken izolasyonu, hem etken identifikasyonu ve hem de bakterilerin pasajlanması amacıyla kullanılabilmesidir. Besiyerinin dehidre toz bazı tartılıp uygun hacimdeki distile su içerisinde çözündürülür, otoklavlanarak sterilize edilir ve 50°C'ye soğutulur. Bu aşamadan sonra %5-10'luk hacimde (kan hacmi/besiyeri hacmi) steril kan soğutulan besiyerine ilave edilerek erlen düzenli bilek hareketleriyle özenli bir şekilde karıştırılır ve cam petrilere dökülür. Eğer dökülen agar yüzeylerinde baloncuklar oluşur ise bunlar besiyerini döken kişiyi takip eden bir yardımcının besiyeri yüzeyine tuttuğu bek aleviyi giderilir. Eğer aseptik koşullarda alınan steril kan önceden alınmış ve buzdolabında bekletilmiş ise besiyerine eklenmeden önce bu kan 37°C'ye ısıtılarak eritrositler üzerinde sıcak besiyerine eklenmeye bağlı şekillenebilecek ısı şoku oluşumu önlenmiş olur. Bakteriyolojik incelemeler için kanlı agar hazırlanmasında sığır veya koyun kanı en uygun materyaldir. Kan, önemli insan ve hayvan patojenlerine karşı herhangi bir antikora sahip olmayan ve antibakteriyel tedavi uygulanmamış genç hayvanlardan örneklenmelidir. Kan alma işlemi aseptik teknikler uygulanarak gerçekleştirilmelidir. Kan alınacak hayvanda vena jugularis'in bulundu-

ğu bölge traşlandıktan sonra bölge %70'lik alkol ile silinir ve damara girilmeden önce alkolün uçması beklenir. Kan direkt olarak içerisinde alınacak kanın %10'u oranında (50 ml alınacaksa 5 ml sitrat solüsyonu) steril sodyum sitrat içeren 50 ml'lik enjektöre alınabileceği gibi içerisinde 3mm çapında cam boncuk bulunan önceden sterilize edilmiş cam erlenlere de bir plastik tüp yardımıyla alınır. Burada önemli olan kan alınırken erlenin düzenli hareketlerle karıştırılmasıdır. Karıştırma işlemi gerekli kan alındıktan sonraki 5 dakika boyunca devam eder. Bu işlem kanın pıhtılaşmasına engel olur (defibrine kan). Bu defibrine kan buzdolabında saklamak amacıyla steril tüplere dağıtılabılır. Cam boncuklar fibrin pıhtılarından arındırılıp tekrar kullanılabilir.

MacConkey Agar

Besiyeri üreten firmalar farklı formülasyonlara sahip MacConkey agarlar üretmektedir. Bunlar farklı içerikte safra tuzları içermekte ve kristal viyole (Gram pozitif bakteri inhibisyonu) bazı besiyerlerinde yer almakta ya da almamaktadır. Gram pozitif bakterilerin çoğunu inhibe eden, enterobakterilerin tamamının üremesini destekleyen, ancak diğer Gram negatif bakteriler için selektif olarak inhibisyon sağlayan MacConkey agarların kullanılması önerilmektedir. MacConkey agarda üremenin olup olmaması ve/veya karakteri özellikle de enterobakteri ve diğer Gram negatif bakterilerin identifikasyonunda önemli bir kriterdir. Bu özelliği MacConkey besiyerini diğer besiyerleri arasında öne çıkarır. Besiyeri, 17g pepton, 3g polipepton, 10g laktoz, 1.5g safra tuzları, 5g NaCl, 13.5g agar, 0.03g nötral kırmızı, 0.001g kristal viyoleyi 1000ml distile suda sulandırılarak hazırlanır. Bu karışım ısıtılarak çözündürülür. Besiyerinin pH'sı 7.2'ye ayarlanarak 15 dakika 121°C'de otoklave edilir. Besiyeri cam petrilere bölüştürülür ve katılaştıktan sonra kullanılıncaya kadar 4°C'de saklanır.

Besiyerlerinin Seçimi

Laboratuvarda kullanılacak besiyerleri amaçlanan muayene yöntemine (izolasyon, identifikasyon, antibiyogram, vb.) göre seçilmelidir. Örneğin bakterilerin rutin izolasyonu için en uygun besiyeri kanlı agar ve MacConkey agardır. Kanlı agarla kullanılmasıyla nazlı üreyen bakteriler de dahil birçok patojenik bakterinin üremesi desteklenmiş olur. MacConkey agarda ise birçok Gram negatif mikroorganizma üretilebilir ve identifikasyon hızlandırılmış olur. Amaç antibiyogram yapmak ise uygun olan besiyeri nutrient agar veya Mueller-Hinton agardır.

BAKTERİ KÜLTÜRÜ

Bakteri kültürü, bakterilerin laboratuvar ortamında, izolasyon, identifikasyon, karakterizasyon, tiplendirme, pasajlama, araştırma ve saklama amacıyla canlı (embriyolu tavuk yumurtaları, hücre kültürleri, deney hayvanları) ve cansız [katı besiyerleri (kanlı agar, serumlu agar), sıvı besiyerleri (peptonlu su, nutrient buyyon), yarı-katı besiyerleri (yatık nutrient agarlar)] ortamlarda üretilmesidir.

Besiyerine Ekim

Ekimi yapılacak olan örnek bir doku parçası ise bu öncelikle steril bir cam petri içerisine konur. Daha önceden %70'lik alkol içerisinde tutulan pens ve bistüri bekte flambe edilir ve soğutulur. Doku özellikle de lezyonlu bölgenin kenarından bistüri ile dikkatlice kazınır. Bu kazıntılardan bir miktar ekimi gerçekleştirilecek besiyerinin kenarına bırakılır. Ayrıca, kazıntılardan kalan kısmı ile bir mikroskop lamı üzerinde boyama amacıyla preparat hazırlanabilir.

Eğer ekimi gerçekleştirilecek klinik materyal sıvı ya da yarı-sıvı karakterde ise bu besiyerinin uç kısmına bir steril svap yardımıyla örneklenerek svabı kendi ek-seni etrafında çevirerek (bu işlem besiyeri yüzeyinde homojen bir örnek dağılımı sağlar) yayılır. Svap atılmadan önce mikroskopik inceleme amacıyla temiz bir lam yüzeyine sürülerek preparat hazırlamada kullanılabilir.

Genel bir kural olarak besiyerlerine inokulasyon veya öze ile ekim yapılırken öncelikle inhibitör özellikte olmayan besiyerinden (Örn. Kanlı agar) ekime başlan-ır, daha sonra inhibitör veya selektif özellikte besiyeri (Örn. MacConkey agar) ile ekimlere devam edilir.

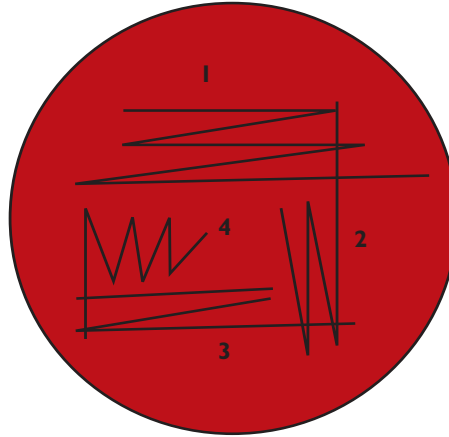
Katı Besiyerlerine (Agarlara) Öze ile Ekim

Katı besiyerlerine öze ile ekimin amacı koloni morfolojisinin gözlenmesi, antibiyo-tik duyarlılık testleri ve biyokimyasal identifikasyon için bakteri kolonilerinin tek tek ve izole bir şekilde elde edilmesidir. Bu amaçla teşhis için laboratuvara gönde-rilen çoğu materyalden agarın tamamı kullanılarak yapılan bu ekime **tek koloni ekimi** adı verilmektedir.

Bir ekim gerçekleştirilmeden önce ilk olarak besiyeri agarın bulunduğu kısım-dan işaretlenmelidir. Bu amaçla kalıcı özellikte cam kalemleri kullanılır ve işaretle-melerin mümkün olduğunca besiyerinin uç kısımlarına yapılması gerekir. İnoku-lasyon (ekim) tarihi, materyalin kayıt kodu, materyali tanımlayan özellikler cam petriye yazılabilir. Tek koloni ekimi için 2 adet öze kullanılır. Böylelikle, bir öze kullanılırken diğeri de soğumaya bırakılabilir. Başlamadan önce özeler bek alevin-de öze ucundaki tel tamamiyle kızarıncaya kadar tutularak ısıtılarak sterilize edilir. Bu ekim yönteminde özeler hem ekimden önce hem de ekim sonunda bek alevin-de sterilize edilir ve sırayla kullanılarak birbirine belirli bir açıyla (60-90°'lik) 4 ekim gerçekleştirilir (Şekil 5.1). Bunlardan 1., 2. ve 3. ekim hatları mümkün oldu-ğunca agarın uç kısımlarına doğru yapılır ki bu bize çizgileri daha aralıklı olacak olan 4. ekim hattı için yeterli alan sağlar. Böylelikle bu son ekim ile izole halde bakteri kolonileri elde edilmiş olur. Ekimler yapılırken dikkat edilmesi gereken başka bir konu da öze uçlarının agar yüzeylerine mümkün olduğunca paralel tu-tulmasıdır. Bu özenin agar içerisine girmesini veya agarı yırtmasını engeller. Düz-gün ekim tekniği ancak belirli bir deneyim süresinden sonra kazanılabilir.

Şekil 5.1

Tek koloni ekimi.



Tek koloni ekimi: Her bir ekims öncesi ve sonrasında özeler bek alevinden sterilize edilir.

İnkubasyon

Uygun besiyerlerine ekimler gerçekleştirildikten sonra inkubasyon süresi ve inkubasyon sıcaklığı yanında besiyerlerinin tutulacağı gazeöz atmosfer de dikkate alınmalıdır. Bunların belirlenmesi hangi bakteriyel patojenlerin araştırıldığına bağlı olmaktadır. Genel olarak aşağıda belirtilen koşullar dikkate alınmalıdır.

İnkubasyon Atmosferi

Patojenik bakterilerin çoğu aerobik atmosferik koşullarda üremektedir. Mikroaerofilik atmosferde (%5-10 CO₂) üreyen mikroorganizmalara örnek olarak *Brusella* türleri, *Francisella tularensis*, *Hemofilus* türleri, *Taylorella equigenitalis* gibi bakteriler verilebilir. Anaerobik atmosferde üreyen bakterilere ise *Klostridium* türleri, *Fusobakterium* türleri, *Bacteroides* türleri ve *Actinomyces bovis* gibi mikroorganizmalar örnek verilebilir.

Obligat (zorunlu) aeroblar, mikroaerofilik bakteriler ve obligat anaerobların üremeleri için gerekli olan oksijen konsantrasyonlarının sağlanmasına büyük özen gösterilmelidir. Zorunlu aerobik bakterilerin çoğu nutrient buyyondan veya katı agar yüzeyinden yeterli oksijen sağlarlar, ancak bazı bakteriler daha fazlasına ihtiyaç gösterirler. Mikroaerofilik ortam, jar adı verilen kapaklı kaplara yerleştirilen nutrient buyyonlarda ve katı besiyerlerinde mum yakılarak ve daha sonra kapak kapatılarak sağlanabilir. Yanan mum jar içindeki oksijeni kullanır ve ortamda karbondioksit sağlar. Karbondioksit alevi söndürdüğünde üremek için az miktarda karbondioksite ihtiyaç gösteren mikroorganizmalar için yeterli değerler sağlanmış olur. Zorunlu anaerobik bakterilerin kültürü için bütün moleküler oksijenin besiyerinden çıkarılması ve uzaklaştırılması gerekmektedir. Thioglycollate, sistein amino asiti veya sodyum sülfid gibi oksijen bağlayıcı ajanların besiyerine ilavesi ile anaerobik bakteriler üzerine oksijenin zararlı engellenmiş olur. Besiyerleri vida kapaklı tüplere veya cam petrilere, içlerinde hava kalmayacak şekilde tamamıyla doldurularak (bu havanın uzaklaştırılmasını sağlar) dökülebilir. Bakteri kültürü, koloni üremesinin incelenebilmesi için cam petrilere de gerçekleştirilecekse, bunlar hem tüpleri hem de petrilere yerleştirebileceğimiz jarlar içerisinde inkube edilebilir. Bu durumda agar petrilere ortamdaki oksijeni uzaklaştıran ve optimal oranlarda karbondioksit oluşturan kimyasal maddeler içeren kapaklı jarlarda inkube edilirler. Bu amaçla GasPak adı verilen özel poşetler jarlar içine yerleştirilir. Anaerobik etkenlerin rutin olarak çalışıldığı laboratuvarlarda besiyerine ekimler anaerobik transfer ünitelerinde yapılır. Bu ünitelere gerekli ekipman ve besiyerleri hava kontrollü (air lock) girişten sokulmakta, kültürleri gerçekleştirecek olan laboratuvar çalışanı özel eldiven girişlerini kullanarak ekimleri yapmaktadır.

İnkubasyon Sıcaklığı

Hayvanlar için patojenik olan mikoplazmalar da dahil çoğu mikroorganizmalar 37°C'de optimal olarak ürerler. *Campylobacter jejuni* ve *Serpulina hyodysenteriae* en iyi 42°C'de, *Leptospira interrogans* serovarları 28-30°C'de, *Listeria monocytogenes* beyinden soğuk zenginleştirme yöntemi ile üretilmesi esnasında, *Yersinia enterocolitica* ve *Yersinia pseudotuberculosis*'in dışkı örneklerinde soğuk zenginleştirme yöntemi ile üretilmesi esnasında 4°C'de optimal ürerler.

İnkubasyon Süresi

Hızlı üreyen bakterilerin çoğu 24-48 saat içerisinde, hızlı üreyen bakteriler selektif besiyerlerinde üretildiklerinde 48-72 saat içerisinde, Brusella türleri, Kampilobakter türleri, *Nocardia asteroides*, bazı Mikoplazma türleri 4-6 günde, *Mycobacterium bovis* 3-8 haftada, *Mycobacterium paratuberculosis* 4-16 haftada üremektedir.

SIRA SİZDE



3

Bakterileri katı besiyerlerinde saf olarak nasıl elde edebiliriz?

BİYOKİMYASAL TESTLER

Biyokimyasal testler bakterilerin cins ve tür düzeyinde identifikasyonlarında ve tiplendirilmelerinde kullanılan ve bakterilerin sahip oldukları biyolojik özellikleri (enzim aktivitesi, karbonhidratlardan ve diğer maddelerden faydalanma, vb.) test edilmesine dayanan testlerdir. Bakterilerin identifikasyonu için biyokimyasal testler dışında da farklı yaklaşımlar vardır. Bunlar bakteriyel enzimleri (Örn. hemolizin, lesitinaz, vb.) ortaya koyan enzimatik testler, çeşitli madde ve ortamlara duyarlılık temeline dayanan tolerans testleri (Örn. atmosferik gereksinimler, O₂ toleransı, vb.). Bundan başka, bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları veya dirençlilikleri identifikasyon amacıyla kullanılabilir.

Karbonhidrat Fermentasyon Testi

Mikroorganizmalar çeşitli karbonhidratları parçalayacak enzimlere sahiptirler. Karbonhidratların parçalanması sonucu organik asitler (asetik, butirik, laktik, propionik asit, vb.), nötral ürünler (aseton, asetoin, alkoller, vb.) ve gazlar (CO₂, H₂, O₂, CH₄) oluşur. Bakteri türleri oluşan bu son ürünlerdeki farklılıklar yardımıyla bunların identifikasyonları yapılmaktadır. Besiyerinde glukozun parçalanması sonucu asit oluşumu ve indikatörün renginin açılması, gaz oluşumu ise besiyeri içerisine yerleştirilen **Durham tüpünün** üst kısmında gaz birikmesi ile anlaşılır. Mikroorganizmaların taze sıvı kültürlerinden karbonhidrat içeren besiyerine 0.1 ml hacminde ekilir ve kültürler 37°C'de 1-7 gün inkubasyona kaldırılır. Her gün asit oluşumu (renk değişimi, yeşilden sarıya) ve gaz oluşumu yönünden muayene edilir. Testte kullanılan besiyeri için 10g pepton, 5g NaCl tartılarak distile suyla 1000ml'ye tamamlanır. Bu bileşenler sıcak distile su içerisinde eritildikten sonra pH 7.2'ye ayarlanır ve içine indikatörlerden (brom timol mavisi) biri konur ve iyice karıştırılır. İçinde Durham tüpü bulunan test tüplerine 4.5-5 ml hacminde paylaşılır. Besiyerleri otoklavda 121°C'de 15-20 dakika sterilize edilir. Bu şekilde hazırlanan tüpler buzdolabına uygun kaplar içerisinde kaldırılır. Kullanılmadan önce içerisine test edilecek karbonhidrat solüsyonu (0.5 ml) katılır.

Durham tüpü: Durham tüpü, karbonhidrat fermentasyon testlerinde, besiyerinde gaz çıkışının belirlenmesi amacıyla standart test tüpünün içerisine ters (baş aşağı) olarak konulan küçük tüp.

DİKKAT



Laboratuvarda gerçekleştirilen testler ne testi olursa olsun (biyokimyasal testler, serolojik testler, moleküler testler, vb.) mutlaka pozitif ve negatif kontroller kullanılmalı ve test sonuçları bunlarla karşılaştırılarak değerlendirilmelidir.

Oksidasyon-Fermentasyon (O/F) Testi

Bazı mikroorganizmalar glukozu aerobik koşullarda (oksidatif karakterde), bazı diğer mikroorganizmalar ise oksijenin bulunmadığı (anaerobik) durumlarda fermente eder (ayrıştırır). Glukozun ayrışmasını ortaya koymada Hugh Leifson besiyeri kullanılır. Test edilecek bakterilerin taze kültürlerinden (sıvı ya da katı) 2 adet Hugh Leifson besiyerine ekim yapılır. Tüplerden birine ekimin hemen ardından sı-

vı parafin konur, diğeri ise sadece pamukla kapatılır. Oksidatif bakteriler sadece pamukla kapatılmış tüpte asit oluşturarak tüpün rengini sarı renge çevirir. Fermentatif bakteriler ise her iki tüpte asit oluştururlar (renk değişimi her iki tüpte de görülür). Her iki tüpte de herhangi bir renk değişimi yoksa (unreaktif) bakteri glukozu kullanmıyor demektir. Testte kullanılan besiyeri için 2g pepton, 5g NaCl, 0.3g K_2HPO_4 , 0.3ml brom timol mavisi (%1'lik solüsyon), 3g agar tartılarak distile suyla 1000ml'ye tamamlanır. Bu bileşenler sıcak distile su içerisinde eritildikten sonra pH 7.2'ye ayarlanır ve içine indikatörlerden (brom timol mavisi) biri konur ve iyice karıştırılır. Test tüplerine 5 ml hacminde paylaşılır. Besiyerleri otoklavda 121°C'de 15-20 dakika sterilize edilir. Bu şekilde hazırlanan tüpler buzdolabına uygun kaplar içerisinde kaldırılır. Kullanılmadan önce içerisinde test edilecek karbonhidrat solüsyonu (0.5 ml) katılır.

Metil Red (MR) Testi

Metil kırmızısı reaksiyonu besiyerindeki glukozun bakteriler tarafından fermentatif metabolizasyonu sonucu oluşan organik asitlerin ortamın pH'sını düşürdüğünü ortaya koyar. Metil red solüsyonu pH 6.0'da sarı, pH 4.4'ün altında ise kırmızı renk verir. Besiyerine bakteri ekildikten sonra kültürler 37°C'de 1-7 gün inkube edilir. Bu sürenin sonunda tüp içerisine 4 damla metil red solüsyonu damlatılır ve tüp iyice karıştırılır. Kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu negatif reaksiyonu gösterir. Testte kullanılan besiyeri için 5g pepton, 5g K_2HPO_4 , 5g D-glukoz tartılarak distile suyla 1000ml'ye tamamlanır. Bu bileşenler sıcak distile su içerisinde eritildikten sonra pH 7.2'ye ayarlanır test tüplerine 5 ml hacminde paylaşılır. Besiyerleri otoklavda 121°C'de 15-20 dakika sterilize edilir. Bu şekilde hazırlanan tüpler buzdolabına uygun kaplar içerisinde kaldırılır. Kullanılmadan önce içerisinde test edilecek steril karbonhidrat (0.5 ml) katılır.

Voges-Proskauer (VP) Testi

Bakterilerin bazıları glukozu ayrıştırdıkları zaman nötral ürünler (asetil metil karbinol, 2,3 butilen glikol) meydana getirir ve bunlar identifikasyonda önemli göreve sahiptir. Ortama alkali ilave edildiğinde asetil metil karbinol okside olur ve diasetil şekillenir. Bu kreatin, arginin veya kreatininle birleşerek kırmızı renk değişimi gerçekleştirir. VP testi ile metil red (MR) testleri ortamlarının aynı olması nedeniyle birlikte uygulanırlar. Genel bir kural olmamakla birlikte MR pozitif olan bakteriler VP negatiftirler (ya da bunun tam tersi). Bunun nedeni, organik asitler fazla oluştuğunda nötral ürünlerin oluşmamasıdır. Besiyerine bakteri ekilir ve 37°C'de 1-7 gün inkube edilir. Üzerine 1 ml %40'lık KOH ve 3 ml %5'lik alfa-naftol eriyiğinden konur ve karıştırılır. Pozitif reaksiyonda 2-5 dakika içinde pembe renk meydana gelir.

Nitrat Redüksiyon Testi

Bu test mikroorganizmaların nitratları redükte edebilme yeteneğini belirlemede kullanılır. Bazı bakteriler nitratları (NO_3) nitritlere (NO_2) ve hatta daha ileri basamaklara, amonyak (NH_3) ve gaz nitrojene (N_2) kadar ayrıştırabilmektedir. *Enterobacteriaceae* familyası genellikle pozitif reaksiyon verir. Üremiş mikroorganizmalardan nitratlı sıvı besiyerlerine ekimler yapıp tüpler (Durham tüpü içeren) 37°C'de 1-5 gün inkubasyona kaldırılır. Tüplerde gaz (N_2) oluşumu denitrifikasyonu gösterir ve pozitif olarak kabul edilir. Ancak böyle tüplere A ayırıcı (alfa naftilamin) ve B ayırıcı (sulfanilik asit) 5'er damla damlatıldıktan sonra hafifçe çalkalanır. Bir iki

dakika içerisinde kırmızı rengin meydana gelmesi nitratların nitritlere kadar indirildiğini (redükte olduğunu) ifade eder (pozitif reaksiyon). Tüplerde gaz yoksa yine ayrıca damlatılır. Bir iki dakika içinde kırmızı renk oluşumu pozitif kabul edilir. Eğer sonuç negatif olarak görülürse, ya nitratlar hiç ayrılmamıştır veya nitratların ayrışması nitrit safhasından da öteye (amonyak veya nitrojene) ulaşmış olabilir. Bu durumda, tüplere toz çinko katılır. Eğer çinko ilavesi sonucu kırmızı renk oluşursa sonuç negatif, kırmızı renk oluşmazsa (daha ileri safhalara redüksiyon) pozitif olarak değerlendirilir.

İndol Testi

Bu test bakterilerin bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanılır. Aynı zamanda bakterilerin cins [(Salmonella (-), Edwardsiella (+), *E. coli* (+), Klebsiella (-), Enterobakter (+)] ve tür düzeyinde [*Pasteurella multocida* (+), *Mannheimia haemolytica* (-), *Proteus mirabilis* (-), *P. vulgaris* (+)] ayırımında işe yarar. Bakteriler sıvı besiyerine veya peptonlu sıvıya ekildikten sonra 37°C'de 1-5 gün inkubasyona bırakılır. Kültürler üzerine Kovacs (veya Ehrlich) ayırıcından 0.5 ml ilave edilir ve iyice karıştırılır. Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyon (indol formasyonunu) ifade eder. Sarımsı halka indolün oluşmadığını gösterir (negatif indol testi).

Hidrojen Sülfid Testi

Bu test bakterilerin sülfür içeren bazı aminoasitleri (sistin, sistein, metionin, vb.) veya bileşikleri (sülfatları) ayrıştırarak hidrojen sülfür (H_2S) oluşturmalarını saptamak için yapılır. Kültürlerde oluşan hidrojen sülfiti ortaya koymak için çeşitli metal veya metal tuzları (kurşun, demir, nikel, vb.) kullanılır. Bunlardan indikatör olarak en yaygın olarak kurşun asetatın faydalanılır. Hidrojen sülfid renksiz bir gaz olup kurşun sülfat ile birleşince kurşun sülfid meydana gelir ki bu madde siyah bir görünümde dir. Besiyerinde oluşan hidrojen sülfürü ortaya koymada TSI agar, Kligler Iron Agar, bizmut sülfid agar (BSA) gibi katı veya yarı-katı besiyerlerinden faydalanılır. Besiyerinden dışarı çıkan kükürtlü hidrojeni belirlemede ise kurşun asetat emdirilmiş kağıt şeritlerden faydalanılır. Eğer sıvı ortamdan H_2S çıkarsa kağıttaki kurşun asetatla temasta kurşun sülfid meydana gelir ve kağıdın uç kısımları kararır (pozitif reaksiyon).

Katalaz Testi

Katalaz bir enzim olup genellikle aerobik mikroorganizmalar tarafından oluşturulur. Bu enzim bakteriler için toksik olan hidrojen peroksiti (H_2O_2) ayrıştırarak O_2 ve H_2O meydana getirir. Sıvı ve katı besiyerlerinde üremiş bakterilere H_2O_2 ilave edildiğinde oksijenin kabarcıklar halinde çıkması H_2O_2 'nin ayrışmasını ve dolayısıyla da katalazın varlığını kanıtlar. Test reaktifi olan %3'lük hidrojen peroksitin koyu renkli şişelerde saklanması gerekmektedir. Eğer test edilen bakteri kanlı agarda üretilmiş ise eritrositlerin varlığında testte yanlış-pozitif bir sonuç alınacağından dikkatli olunmalıdır. Test 2 farklı metot ile uygulanabilir. İlkinde kanlı agardaki bakteri kolonilerinin üst kısmından bir öze ile alınarak temiz bir mikroskop lamına konur ve bunun üzerine %3'lük hidrojen peroksit eklenir. Birkaç saniye içerisinde oksijen gazına bağlı kuvvetli köpürme pozitif reaksiyona işaret etmektedir. İkinci metotta ise katı besiyerinde üremiş bakteri kolonisi üzerine hidrojen peroksit damlatılır. Kuvvetli köpürme pozitif reaksiyona işaret eder.

Oksidaz Testi

Bu test bir bakteri hücresinde sitokrom C oksidaz enziminin bulunup bulunmamasına dayanmaktadır. Anaerob bakteriler oksidaz negatiftirler. Bu testte kullanılan reaktifler renksiz olmalı ve 4°C'de koyu renkli şişeler içerisinde saklanmalıdır. Solüsyonlar eğer koyu mavi renk almışlarsa kullanılmamalıdır. Selektif olmayan, glukoz veya nitrat içermeyen besiyerlerinde üreyen koloniler cam çubuk ya da platin uçlu öze yardımıyla toplanarak test edilmelidir. Konvansiyonel özeler demir içermekte ve yanlış pozitif test sonuçlarına neden olabilmektedir. Testin gerçekleştirilmesinde farklı yöntemler bulunmakta ise de günümüzde en pratik ve en yaygın kullanım ticari oksidaz kağıtları ve çubuklarının kullanımıdır. Oksidaz testlerinde *Pseudomonas aeruginosa* pozitif kontrol olarak kullanılır. Test edilen bakterinin oksidaz test kiti (çubuk veya kağıt) ile teması sonrası saniyeler içerisinde mor renk oluşumu pozitif test sonucuna işaret eder.

Koagulaz Testi

Test patojenik stafilocokların belirlenmesinde kullanılan enzimatik bir testtir. Testte reaktif olarak taze hazırlanmış ya da ticari olarak dondurularak kurutulmuş tavşan plazması kullanılır. Tavşan plazması bazı türler (patojenik) tarafından sentezlenen stafilocokal koagulaz enzimi tarafından fibrine dönüştürülen fibrinojeni içerir. Koagulaz stafilocoklarda iki farklı halde bulunur: Bağlı koagulaz ve serbest koagulaz. Bağlı koagulazın varlığı lam koagulaz testi ile, serbest koagulazın varlığı ise tüp koagulaz testi ile gerçekleştirilir. Lam koagulaz testinde bir öze dolusu stafilocok kültürü bir mikroskop lamı üzerine konan distile suda emülsifiye edilir. Daha sonra bir öze dolusu tavşan plazması lama eklenerek stafilocok süspansiyonu ile öze yardımıyla dairesel hareketlerle karıştırılır. Bir veya 2 dakika içerisinde görülen kümeleşme pozitif reaksiyona işaret eder. Tüp koagulaz testinde ise küçük 7 mm çapındaki test tüplerine 0.5 ml tavşan plazması eklenir. Bir gecelik taze stafilocokal broth kültüründen alınan 2 damla ya da agar kültüründen yoğun olarak alınan ve steril distile su ile süspansiyon edilen bakteri kolonileri tüplere ilave edilir. Tüpler hafifçe çevrilerek plazma ve bakteri süspansiyonunun karışması sağlanarak 37°C'de inkube edilir. Pozitif bir testte plazma 2-4 saat içerisinde koagule olur (pıhtılaşır). Ancak, bir gecelik inkubasyonun ardından plazmayı koagule eden zayıf koagulaz-pozitif suşlar da bulunmaktadır.

Üreaz Testi

Bu test, mikroorganizmaların üreyi hidrolize eden üreaz enzimini saptamak amacıyla yapılır. Karbonik asidin bir diamidi olan ürenin hidrolizasyonu spesifik bir enzim olan üreaz enzimi tarafından katalize edilir. Reaksiyonun sonunda 2 molekül amonyak ve karbondioksit meydana gelir. Testte besiyerinde amonyanın meydana gelmesi ortam pH'sının yükselmesine neden olur. Amonyanın meydana geldiği indikatör boya ve Nessler ayırıcı ile ortaya konur. Testte Christensen'in üreyi içeren besiyerleri (ürelü buyyon veya agar) kullanılır. Besiyerine ekilen bakteri saf kültürlerinin üremesi sonucu besiyerinde kırmızı rengin (üreaz aktivitesine bağlı amonyak yükselmesine sonu indikatörün renginin ortaya çıkması) oluşumu pozitif reaksiyona işaret eder.

***Helicobacter pylori* isimli bakterinin asidik mide koşullarında hayatta kalabilmesinin nedeni nedir? Bu bakterinin tanısında bu özelliğinden nasıl faydalanırız?**

Birden Fazla Biyokimyasal Test İçeren Besiyerleri

Bu çeşit besiyerlerine örnek olarak Kligler's iron agar, triple sugar iron (TSI) agar, lysine iron agar, gibi besiyerleri verilebilir.

Kligler's iron agar: Bu besiyeri hidrojen sülfid üretimini ortaya koyan kimyasallar ile birlikte %0.1 oranında glukoz ve %1 oranında laktoz içermektedir.

TSI agar: Bu besiyeri içeriğinde %0.1 oranında glukoz, %1 oranında laktoz ve %1 oranında sukroz içerir. Bu karbonhidratların dışında, pH indikatörü olarak fenol kırmızısı, hidrojen sülfid üretiminin belirlenmesi için ferröz sülfat veya ferrik amonyum sitrat ve sodyum tiyosülfat içerir. Besiyeri çözdürülüp test tüplerine dağıtılarak otoklavda sterilize edilir. Soğuyan agar katılaşmadan tüplerde eğim oluşacak şekilde tüpler yatık olarak bekletilir. Ekim yapılmamış besiyeri veya ekim yapılmış ve alkali reaksiyon ($\text{pH} \geq 7.3$) gösteren besiyeri kırmızı renkli, asit reaksiyonunun ($\text{pH} \leq 6.8$) görüldüğü besiyerleri ise sarı renklidir. TSI agar esasen salmonella şüpheli kolonilerin identifikasyonunda kullanılmakla birlikte enterobakterilerin diğer üyelerinin ayrımında da faydalı olmaktadır. Bu ayırım lizin dekarboksilaz buyyonunu içeren test tüpünün TSI ile birlikte paralel olarak ekilip değerlendirilmesiyle daha iyi gerçekleştirilir. Selektif/diferensiyel besiyerlerinde (XLD, brilliant green agar veya MacConkey agar) üreyen Salmonella şüpheli bakteri kolonisi iğne (sivri) uçlu öze yardımıyla örneklenerken bir TSI agar tüpüne ortasından tüpün dibine 5mm kalacak şekilde ekilir. Öze dışarı çekilirken agarın tüm yatık yüzeyine (eğimin sonuna kadar) ayrıca ekim yapılır. Özenin ucunda halen lizin buyyon tüpüne inokule edilebilecek miktarda bakteri bulunmaktadır. TSI agarın kapağı hafifçe gevşetilmiş olacak şekilde her iki besiyeri de 37°C 'de 16 saat inkubasyona kaldırılır. Bu inkubasyon koşulları besiyerinde reaksiyonların doğru bir şekilde belirlenmesi açısından önemlidir. Eğer tüpler gereğinden uzun inkube edilirse H_2S üretimine bağlı olarak tüpün dip kısmının değerlendirilmesi güçleşir. TSI agarda, eğimde kırmızı (alkali reaksiyon) dipte sarı renk (asit reaksiyon) sadece glukoz fermentasyonunu, eğimde sarı (asit reaksiyon) ve dipte sarı (asit reaksiyon) glukozun dışında laktoz ve sukrozun da parçalandığını (kullanıldığını), besiyerinin kararması ise hidrojen sülfid oluşumunu gösterir. Birçok Salmonella türü TSI agarda, eğimde kırmızı renk, tüpün dibinde sarı renk ve H_2S oluşumu göstermektedir.

Lysine iron agar: Lizin dekarboksilasyonu ile birlikte hidrojen sülfid oluşumunu test edilmesini sağlayan katı besiyeridir.

Bakteri İdentifikasyonunda Kullanılan Minyatür Test Kitleri

Bu test kitleri günümüzde birçok ticari firma tarafından üretilmektedir ve biyokimyasal testlerin minyatürize edildiği şeritler halindedir. Enterobakterilerin, Gram negatif bakterilerin, anaerobların, non-fermentatif bakterilerin, streptokokların, stafilokokların, diğer Gram pozitif bakterilerin identifikasyonuna yönelik ticari test kitleri bulunmaktadır. Bu şeritler halindeki biyokimyasal testler yukarıda bahsedilen konvansiyel formları ile test sonuçları açısından iyi derecede uyumluluk göstermektedir. Bu test sistemlerinin avantajları inokulasyonun yapıldığından emin olunması, sağlanan besiyeri ve reaktiflerin kullanıma hazır olması ve test sonuçlarının kolay ve hızlı bir biçimde değerlendirilmesine olanak sağlamasıdır. Bununla birlik-

te bir teşhis laboratuvarının bu test sistemlerinin sağlayacağı avantajlar ve sistemlerin maliyetlerini dikkate alarak tercihte bulunması gerekmektedir.

Bir bakterinin izole ve tek bir kolonisi alınarak 5 ml steril distile su içerisinde süspanse edilir. Steril Pastör pipeti yardımıyla bu süspanسیون ile minyatür test sisteminin tüpleri (gözleri) doldurulur. Test sistemi inkubasyon kutusunun içerisine konarak 35-37°C'lerde 18-24 saat boyunca inkube edilir. Oksidaz testi sistemlerden bağımsız konvansiyonel olarak gerçekleştirilir. *Enterobacteriaceae* familyasının üyeleri (enterobakteriler) oksidaz negatif iken diğer çoğu Gram-negatif bakteri ise bu özellik yönünden pozitifdir. Test sonuçları test kiti ile birlikte gelen rapor formuna kodlanır. Her bir üçlü biyokimyasal testteki pozitif reaksiyon için belirli kod sayıları toplanarak her bir bakteri için 7 hasneli bir identifikasyon profili oluşturularak bakterinin cins ve/veya tür düzeyinde identifikasyonu sağlanır.

Özet



Bakterileri mikroskopik ve makroskopik morfolojik özelliklerine göre tanımlamak.

Bakterilerin mikroskopik özellikleri dendiğinde mikroskopik muayene sırasında gözlenebilen Gram boyanma karakterleri (Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler), morfolojik şekilleri (kok, çomak, kokobasil, pleomorfik, spiral, filamentöz, virgül, vb.), büyüklükleri (küçük, büyük), kenarları (düz, köşeli, eğri, paralel, vb.), dizilişleri (ikili ve dördü kümeler, salkımlar, zincir oluşumu, filamentler, vb.) spor oluşturup oluşturmamaları (oluşturuyorlarsa lokalizasyonları, merkezde, uçlarda, subterminal, vb.), granül bulunup bulunmaması varsa bipolar olup olmadığı, boyanma özelliği (Gram pozitif ya da Gram negatif, asido rezistans pozitif ya da negatif, vb.) araştırılır. Ayrıca, 12-24 saatlik taze sıvı kültürlerden hazırlanan preparatlarda hareket muayenesi yapılarak bakterinin hareketli olup olmadığı belirlenir. Makroskopik morfolojileri denildiğinde ise bakterilerin besiyerlerinde üreme şekilleri (S-tipli, R-tipli, mukoid koloni oluşumu) hemoliz oluşturup oluşturmamaları, pigment oluşturup oluşturmamaları gibi gözle görülebilen özelliklerine göre tanımlanırlar.



Bakterilerin üretilmesinde kullanılan besiyeri çeşitlerini ve bunların hazırlanmasında dikkat edilmesi gereken kuralları açıklamak.

Bakterilerin üretilmesinde kullanılan besiyerleri içerdikleri bileşen ve diğer maddelere ve bunların bakterilerin üremesi, ayrımı, belirlenmesi üzerine etkilerine göre temel besiyerleri, selektif besiyerleri, diferensiyel besiyerleri, zenginleştirilmiş besiyerleri, zenginleştirme besiyerleri, kimyasal olarak tanımlanmış besiyerleri olarak sınıflandırılırlar. Besiyerleri hazırlanırken bunların kontamine olmaması için gereken azami özen gösterilmeli, besiyerlerinin hazırlanacağı ortam ve laboratuvar masası önceden uygun yöntemlerle sterilize edilmeli, besiyerleri döküldükten sonra katılaşmaları ve kullanıma hazır hale gelmeleri için uygun koşullar ve sürelerde, uygun ortamlarda bekletilmeleri gerekmektedir.



Bakterilerin besiyerlerinde üretilmesini (bakteri izolasyonu ve kültürü) açıklamak.

Bakterilerin besiyerlerinde üretilmesinde saf kültürlerin elde edilmesi (tek koloni metodu) dışında, bakteri türlerine göre değişen ve her bir bakteri türü için gerekli optimal üreme koşulları olan (inkubasyon süresi, inkubasyon sıcaklığı, inkubasyon atmosferinin sağlanması önem arz etmektedir. Bakteri izolasyonu bakterilerin klinik materyaller, nekropsi materyalleri, çevresel örnekler, vs.'den sıvı ve katı besiyerlerine ve laboratuvara gönderilen materyalin durumuna göre selektif ve differansiyel besiyerlerine ekerek patojenik bakteri kolonilerini elde etmektir. Bu kolonilerin biyokimyasal testlerinin ve identifikasyonlarının gerçekleştirilmesi için çeşitli besiyerlerinde (sıvı, katı, yarı-katı, vb.) üretilmeleri de bakteri kültürü ile sağlanır.



Bakterilerin identifikasyonunda kullanılan önemli biyokimyasal testleri tanımlamak ve bu testlerin değerlendirilmesini açıklamak.

Biyokimyasal testler bakterilerin cins ve tür düzeyinde identifikasyonlarında ve tiplendirilmesinde kullanılan ve bakterilerin sahip oldukları biyolojik özellikleri (enzim aktivitesi, karbonhidratlardan ve aminoasitlerden faydalanma, vb.) test edilmesine dayanan testlerdir. Bu testler içerisinde öncelikli olanları Gram boyama, MacConkey agarda üreme ve hareket muayenesi ile birlikte bakterileri cins, grup ve hatta tür düzeyinde tanımlama yardımcı olan katalaz, oksidaz, oksidasyon-fermentasyon testleridir. Cins ve grup düzeyinde tanımlama yapıldıktan sonra her bir cins ve gruptaki bakteriler için belirleyici olan diğer biyokimyasal testler destekleyici test ve yöntemlerle birlikte uygulanır.

Kendimizi Sınayalım

1. Aşağıdakilerden hangisi Gram boyamada uygulanan reaktifleri doğru sırada göstermektedir?
 - a. Kristal viyole, iodine (lugol), safranin, alkol
 - b. Alkol, kristal viyole, iodine (lugol), safranin
 - c. İodine (lugol), kristal viyole, safranin, alkol
 - d. Kristal viyole, iodine (lugol), alkol, safranin
 - e. Kristal viyole, safranin, alkol, iodine (lugol)
2. Bakterilerde hareketten sorumlu organeller hangi boyama yöntemiyle görüntülenir?
 - a. Negatif boyama
 - b. Gram boyama
 - c. Flagellar boyama
 - d. Metilen mavisi
 - e. Basit boyama
3. Bir bakteriyel sürme preparatın ısı ile fikse edilmesi aşağıdakilerden hangisini sağlar?
 - a. Örneğin daha hızlı kurutulmasını
 - b. Bakterinin lama yapışmasını
 - c. Bakterinin büzüşerek lama yapışmasını
 - d. Bakterinin lama yapışmasını, öldürülmesini ve daha kolay boyanmasını
 - e. Bakterinin kurutulmasını, öldürülmesini ve lama yapışmasını
4. Aşağıdakilerden hangisi mikobakteri ve hücre duvarlarında yüksek oranda lipid bulunan diğer bakterilerin identifikasyonunda kullanılır?
 - a. Gram boyama
 - b. Lipid boyama
 - c. Schaeffer-Fulton boyama
 - d. Spor boyama
 - e. Ziehl-Neelsen boyama
5. Bir mikroskopun toplam büyütme gücü aşağıdakilerden hangisiyle hesaplanır?
 - a. Objektif lens ve okular lens büyütme güçlerinin toplamı ile
 - b. Objektif lens ve okular lens büyütme güçlerinin çarpımı ile
 - c. Objektif lens ve kondensör lens büyütme güçlerinin çarpımı ile
 - d. Objektif lens gücünün karesi ile
 - e. Objektif lens ve kondensör lens büyütme güçlerinin toplamı
6. Aşağıdaki boya ve/veya boyama yöntemlerinden hangisi mikroorganizmaları hücre duvarı içeriğine göre sınıflandırmada kullanılır?
 - a. Kapsül boyama
 - b. Gram boyama
 - c. Spor boyama
 - d. Negatif boyama
 - e. Metilen mavisi
7. MacConkey agar Gram pozitif bakterilerin üremesini inhibe eden kristal viyole boyasını ve laktozu fermente eden bakterilerin belirlenmesi için de laktoz ve bir pH indikatörü içermektedir. MacConkey agar aşağıdakilerden hangisi olarak sınıflandırılabilir?
 - a. Diferensiyel, selektif
 - b. Kompleks, selektif
 - c. Kimyasal formülü tanımlanmış, selektif, diferensiyel
 - d. Diferensiyel
 - e. Regulator, selektif
8. Bakterilerde katalaz enziminin fonksiyonu aşağıdakilerden hangisidir?
 - a. Hidrojenin parçalanması
 - b. Respiratorik reaksiyonların katalize edilmesi
 - c. Tuzların parçalanmasının katalize edilmesi
 - d. Toksik hidrojen peroksidin parçalanması
 - e. Su kaybının önlenmesi
9. Aşağıdaki biyokimyasal testlerin hangisinde reaktif olarak tavşan plazması kullanılır?
 - a. Oksidasyon-fermentasyon (O/F) testi
 - b. Katalaz testi
 - c. Koagülaz testi
 - d. Karbonhidrat fermentasyon testi
 - e. CAMP testi
10. Aşağıdaki bakterilerden hangisi mikroaerofilik atmosferde üremez?
 - a. Francisella tularensis
 - b. Taylorella equigenitalis
 - c. Brusella türleri
 - d. Hemofilus türleri
 - e. Klostridium türleri

Kendimizi Sınavalım Yanıt Anahtarı

1. d Yanıtınız yanlış ise, "Morfolojik Muayene" konusunu yeniden gözden geçiriniz.
2. c Yanıtınız yanlış ise, "Morfolojik Muayene" konusunu yeniden gözden geçiriniz.
3. d Yanıtınız yanlış ise, "Morfolojik Muayene" konusunu yeniden gözden geçiriniz.
4. e Yanıtınız yanlış ise, "Morfolojik Muayene" konusunu yeniden gözden geçiriniz.
5. b Yanıtınız yanlış ise, "Morfolojik Muayene" konusunu yeniden gözden geçiriniz.
6. b Yanıtınız yanlış ise, "Morfolojik Muayene" konusunu yeniden gözden geçiriniz.
7. a Yanıtınız yanlış ise, "Besiyerleri" konusunu yeniden gözden geçiriniz.
8. d Yanıtınız yanlış ise, "Biyokimyasal Testler" konusunu yeniden gözden geçiriniz.
9. c Yanıtınız yanlış ise, "Biyokimyasal Testler" konusunu yeniden gözden geçiriniz.
10. e Yanıtınız yanlış ise, "Bakteri kültürü" konusunu yeniden gözden geçiriniz.

Sıra Sizde Yanıt Anahtarı

Sıra Sizde 1

Bu durumda her iki preparattaki mikroorganizma da sanki Gram negatifmiş gibi kırmızı renkli görülecektir. Lugol (iodine), kristal viyolenin Gram pozitif bakterilere uygun bir biçimde bağlanması için gerekli bir bileşendir. Bu nedenle, her iki etken de mavimsi mor rengini (kristal viyole yıkama ile uzaklaşacağı için) kaybedeceklerdir.

Sıra Sizde 2

Hayır, besiyerlerinde üretilmeyen klamidya, riketsiya, koksiella gibi bakteriler de vardır. Bunların üretilmesinde canlı ortamlardan (embriyolu tavuk yumurtaları, hücre kültürleri ve deney hayvanları) faydalanılır. Bunların identifikasyonlarında antijenlerini belirlemeye yönelik testler haricinde moleküler testlerden faydalanılmaktadır.

Sıra Sizde 3

Bunun için tek koloni ekimi yönteminden faydalanınız. Tek koloni ekimi için 2 adet öze kullanılır. Böylelikle, bir öze kullanılırken diğeri de soğumaya bırakılabilir. Başlamadan önce özeler bek alevinde öze ucundaki tel tamamıyla kızarıncaya kadar tutularak ısıtılarak sterilize edilir. Bu ekim yönteminde özeler hem ekimden önce hem de ekim sonunda bek alevinde sterilize edilir ve sırayla kullanılarak birbirine belirli bir açıyla (60-90°'lik) 4 ekim gerçekleştirilir (Şekil 5.2). Bunlardan 1., 2. ve 3. ekim hatları mümkün olduğunca agarın uç kısımlarına doğru yapılır ki bu bize çizgileri daha aralıklı olacak olan 4. ekim hattı için yeterli alan sağlar. Böylelikle bu son ekim ile izole halde bakteri kolonileri elde edilmiş olur.

Sıra Sizde 4

Helicobacter pylori insanlarda mide ülserlerinin en önemli nedenlerinden birisidir. Bu bakteri midenin asiditeye bağlı oldukça düşük pH değerlerinde bile canlılığını sürdürebilmektedir. Bunun nedeni bakterinin üreyi parçalayarak amonyak oluşumunu sağlayan üreaz aktivitesine sahip olmasıdır. Amonyak mide asidini nötralize ederek bakterinin hayatta kalmasını sağlar. Üreaz testi bu bakterinin identifikasyonunda önemli biyokimyasal testlerden birisidir.

Yararlanılan Kaynaklar

- Arda, M. (1985). **Genel bakteriyoloji**. Ankara: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları.
- Arda, M. (2006). **Temel mikrobiyoloji**. Ankara: Medisan Yayınları.
- Goldman, E., Green, L. (2008). **Practical handbook of microbiology**. Boca Raton: CRC Press.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R. (1999). **Clinical veterinary microbiology**. Edinburgh: Harcourt Publishers Ltd.
- Reddy, C.A., Beveridge, T.J., Breznak, J.A., Marzluf, G.A., Schmidt, T.M., Synder, L.R. (2007). **Methods for general and molecular microbiology**. Washington D.C.: ASM Press.
- Winn, W. Jr., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G. (2006). **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

6

Amaçlarımız

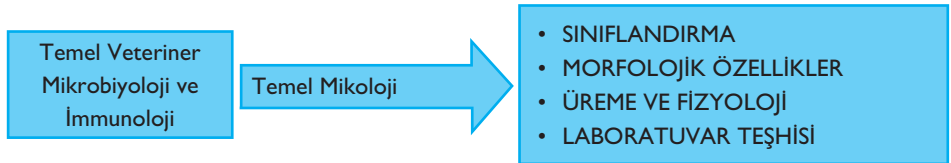
Bu üniteyi tamamladıktan sonra;

- 👁️ Mantarların canlılar alemindeki yerini tanımlayabilecek,
- 👁️ Mantarların morfolojik özelliklerini açıklayabilecek,
- 👁️ Mantarların üreme ve fizyolojik faaliyetlerini açıklayabilecek,
- 👁️ Mantarların laboratuvar teşhisini tanımlayabileceksiniz.

Anahtar Kavramlar

- Mantar
- Maya
- Hifa
- Spor

İçindekiler



Temel Mikoloji

SINIFLANDIRMA

Canlılar alemi, hayvanlar, bitkiler, mantarlar, protistalar ve monera (*Archae ve Eubacteria*) olarak üzere beş bölümde incelenebilir. Bunlardan ilk dördünü oluşturanlar çok hücreli formda (*ökaryot*) olup monera'lar tek hücreli (*prokaryot*) yapıdadır. Bu iki farklı grubu, esas olarak çekirdek membranının varlığı ya da yokluğu belirlemektedir. Sistematik çalışmalarına göre mantarlar bu beş alemden birini meydana getirmektedir. Bazı kaynaklara göre mantar alemi Myxomycota ve Eumycota olarak iki bölüme ayrılmaktadır. *Myxomycota* bölümünde, uygun olmayan şartlarda spor oluşturan ve uygun koşullarda ise saprofit olarak yaşayan mantarlar, *Eumycota* bölümünde ise diğer mantarlar bulunmaktadır. *Eumycota* bölümü; *Mastigomycotina*, *Zygomycotina*, *Ascomycotina*, *Deuteromycotina* ve *Basidiomycotina* olarak beş altbölümden oluşmaktadır. *Mastigomycotina*; *Chytridiomycete*'leri, *Zygomycotina*; *Mucorales* takımını, *Ascomycotina*; *Saccharomyces* gibi gerçek mayaları ve eşeyli üreyen fırsatçı küfleri, *Basidiomycotina*; yüksek mantarları, *Deuteromycota* bölümü ise patojen ve fırsatçı küf ve maya tipi mantarları içerecek şekilde düzenlenmiştir. Daha yeni bir sistemikte ise *Myxomycota* bölümü ve *Mastigomycotina* alt bölümü protistalar arasına alınmış ve mantarlar alemi *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* ve *Deuteromycota* bölümlerine ayrılmıştır. Moleküler çalışmalar mantarların genetik alt ünitelerinin dört monofiletik gruptan oluştuğunu göstermektedir. Bunlar *Acrasiomycota*, *Myxomycota*, *Oomycota* ve *Fungi*'dir. Biyokimyasal ve morfolojik özellikleri dikkate alındığında ilk iki grubun ökaryotlardan farklı olduğu görülmüştür. Bu iki grup **slime molds** olarak adlandırılmakta olup günümüzde protozoa alemi içerisinde yer almaktadır. Benzer filogenetik teknikler *Oomycota*'nın da alglerle aynı grupta olduğunu göstermiştir. Monofiletik mantar alemindeki gruplar *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, ve *Basidiomycota*'yı içermektedir (Tablo 6.1).

Slime molds: Protistalar içerisinde mantarlara benzeyen dış yüzeyleri cıvık, sümüksü bir tabaka ile kaplı cıvık mantar olarak da adlandırılan gruptur.

Tablo 6.1

Mantar sözlüğü tarafından kabul edilen sınıflandırma üç bölüm altında incelenmektedir.

Alem	Filum	Sınıf
Chromista	Hyphochytriomycota Labyrinthulomycota Oomycota	
Fungi	Chytridiomycota Zygomycota Ascomycota Basidiomycota	Trichomycetes Zygomycetes
Protozoa	Acrasiomycota Dictyosteliomycota Myxomycota Plasmodiophoomycota	Myxomycetes Protosteliomycetes

Mantar alemi tür, sınıf ve takımlardan meydana gelmektedir. Mantarlara ait bölüm adlarının sonlarına bazı ekler getirilerek bu bölümler düzenlenmektedir. Örneğin, phylum (divizyon):...-mycota; altdivizyon:...-mycotina; sınıf:...-mycetes; alt-sınıf:...-mycetidae; order:...-ales; familia:...-aceae gibi ekler getirilerek adlandırılmaktadır. Mantarlar, seksüel spor şekillerine göre, günümüzde dört filuma ayrılmıştır. Bunlar, Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota ve Basidiomycota'dır.

Mantar taksonomisinde mayalar, mantarlardan ayrılmış olarak kabul edilmektedir. Ancak pratikte mayalar, genellikle hem sınıflandırma hem de identifikasyon sistemlerinde filamentöz mantarlardan ayrı ele alınır ve yalnızca mayaları içeren ayrı sınıflandırma sistemleri geliştirilmiştir.

MORFOLOJİK ÖZELLİKLER

Mantarlar, ökaryotik hücre yapısında, gövde, yaprak ve çiçeğe sahip olmayan, klorofil içermeyen ve fotosentez yapamayan organizmalardır. Mantarlar genellikle, aerobik ve saprofitik canlılardır. Birçok mantar türü aynı zamanda diğer canlıların parazitidir veya birlikte **simbiyotik yaşam** sürebilirler.

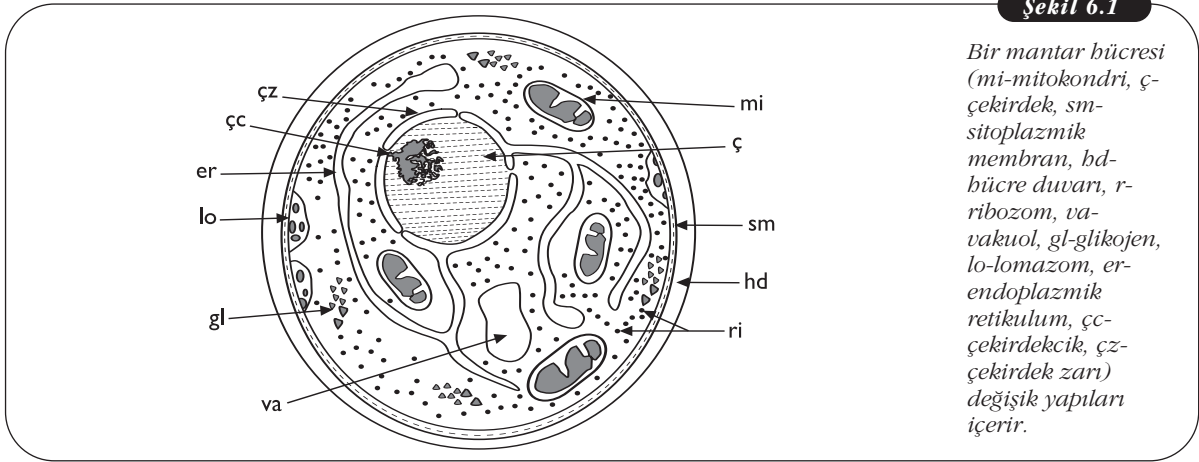
Mantarlar görünüm bakımından küfler ve mayalar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Üremeleri tek hücre şeklinde, küremsi yapılar halinde olursa maya, çok hücreli şekilde, filamentöz iplikçikler şeklinde olursa küf olarak isimlendirilir. Buna karşın mayalar mukoid yapıda mantarlardır. Filamentöz koloni yapısında olanlar (*Ascomycetes*, *Zygomycetes*, *Deuteromycetes*, vb) küf, mukoid yapıda olanlar (*Candida*, *Saccharomyces*, vb) maya olarak adlandırılırlar. Mantarların çoğunluğu filamentöz yapıdadırlar

Mantarların morfolojisi mikroskopik ve makroskopik olarak iki şekilde incelenebilirler.

Mikroskopik Morfoloji

Mantarlar mikroskopik muayenede filamentöz ve maya mantarları olarak iki bölümde incelenmektedir. Her iki mantar grubunun mikroskopik incelemesinde birçok elementin ortak olduğu dikkati çekmektedir. Hifa, kapsül, hücre duvarı, septum, sitoplazmik membran, lomazom, endoplazmik retikulum, vakuol, vezikül, çekirdek-çekirdekçik, mitokondri, golgi aygıtı, flagellum, ribozom, liozom dikkati çeken yapıları oluşturmaktadır (Şekil 6.1).

Simbiyotik yaşam: İki canlılık tek bir organizma gibi birbirleriyle yardımlaşarak bir arada yaşama biçimidir.

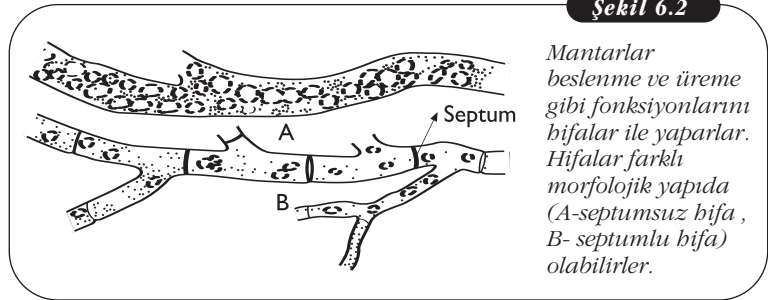


Hifa: Mantar kolonileri hifa adı verilen genellikle ince uzun ve saydam mikroskopik filamentlerden oluşmuşlardır. Bunların her birine hifa adı verilir. Hifaların çapı türlere göre 0.5-10 mikrometre arasında değişmektedir. Hifalar bir araya gelecek miselyum adı verilen saç benzeri yığınlar, meydana getirirler. Hifalar, mantar türlerine bağlı olarak; bölmelere ayrılmış (*septumlu*) veya bölmelere ayrılmamış (*septumsuz*) olabilirler (Şekil 6.2). Bunların dışında raket, nodül, tarak veya spiral gibi çeşitli şekillerde de görülebilirler. Buldukları beslenme ortamının içine uzanıp beslenme işlemini gören miselyum kısmına vejetatif miselyum, beslenme ortamının üzerine çıkarak yüzeyde yükselen kısmına aerial (havasal) miselyum denir. Bazı maya türlerinde, hücrelerin çoğalmaları sırasında birbirlerine yapışık kalması sonucu kitleler veya zincirlerden oluşan iplikli yapılar meydana gelir. Bunlara yalancı hifa (psödohifa) adı verilir.

Kapsül: Bazı mantarlar dış yüzeylerini örten bir slime tabakası veya çok sert bir kapsül meydana getirirler. Kapsül veya slime tabakası hücrelere tutunmayı veya yapışmayı sağlayan amorf polisakkaridlerden oluşmuştur. Fungal kapsül, antijenik ve antifagositik özellikte olabilir. Örneğin, *Cryptococcus neoformans* bu özelliktedir.

Hücre Duvarı: Mantar hücre duvarı genellikle çok katlı yapıdadır ve fibrillerden oluşmaktadır. Hücre duvarının yapısında en fazla polisakkaridler (%80), daha sonra, sırasıyla protein (%5-15) ve lipidler (%3-10) bulunmaktadır. Bunların miktarları, mantar türlerine, besiyerinin bileşimine ve çevresel koşulların durumuna göre az çok değişmektedir. Polisakkaridler arasında glukan, galaktoz, kitin, kitosan, mannan ve sellüloz en fazla bulunanlarıdır. Hücre duvarı mantar hücrelerinin büyüklüğü ve şeklini belirleyebilecek güçlü bir yapıya sahiptir. Hücre duvarının ortadan kaldırıldığı durumlarda **protoplast** meydana gelir. Hücre duvarı hücreleri çevresel koşulların olumsuz etkisinden koruduğu gibi, antijenik bir özelliğe ve bazı enzimleri içermeleri nedeniyle de fizyolojik bir aktiviteye sahiptir.

Protoplast: Hücre duvarı olmayan veya giderilmiş prokaryotik veya ökaryotik hücrelerdir.



Ünit membran: Sitoplazmayı ve hücre içerisindeki organellerin etrafını saran birden fazla görevi olan zarıdır.

Septum: Septum filamentöz mantarlarda rastlanan bir formasyondur. Bu yapılar hücre duvarının iç kısmından orijin alır ve içeri doğru uzanarak karşı cidara kadar devam eder. Yapısı, hücre duvarının yapısı ile aynı kimyasal özelliği gösterir. Septum Oomycetes ve Zygomycetes sınıfı mantarlarda görülmez.

Sitoplazmik Membran: Hücre duvarının altında elektron mikroskop ile görülebilen bir sitoplazmik membran bulunur. Bu organel üç tabakadan oluşmuştur ve **ünit membran** özelliği gösterir. Sitoplazmik membranın permeabilite özelliği vardır. Fosfolipid, protein ve steroller sitoplazmik membranın yapısını oluşturan temel maddelerdir.

Lomazom: Bazı mantar türlerinde hücre duvarı ile sitoplazmik membran arasında yerleşmiş ve lomazom olarak adlandırılan bazı yapılar bulunmaktadır. Buralarda sitoplazmik membran içe doğru çöküntüler meydana getirmektedir. Bu oluşumlar salgısal aktivitede ve sitoplazmanın sentezinde bazı önemli görevlere sahiptir.

Endoplazmik Retikulum: Bu organel bitki ve hayvan hücrelerinde olduğu gibi, iki paralel unit membranla çevrili ve üzerlerinde ribozomların yerleştiği bir yapıdadır. Endoplazmik retikulumun mantar hücrelerinde çekirdek membranının bir devamı olduğu bildirilmektedir. Protein sentezinde ve metabolizma için gerekli substansların taşınmasında büyük etkinliği olan endoplazmik retikulum lipoprotein yapısındadır.

Vakuol: Olgun hücrelerde daha fazla rastlanan vakuollerin etrafları ünite membranla çevrilidir. Bunların içlerinde pigment, kristal ve amorf karakterde maddeler bulunabilir Hücrelerin dejenerasyonları sırasında sayılarında artmalar da meydana gelmektedir.

Vezikül: Veziküller büyümekte olan hifalarda fazlaca görülür. Etrafı bir ünite membranla çevrili olan bu organellerin golgi aygıtından orijin aldıkları bildirilmektedir. Veziküllerin içinde hücre duvarının sentezinde ve aynı zamanda, lizisinde etkinlikleri olan enzimler, inorganik elementler, polisakkaridler, lipidler gibi maddeler bulunur ve bunları büyümekte olan hücre duvarı bölgesine taşırlar.

Çekirdek ve çekirdekcik: Mantar hücrelerinde genellikle 2-3 mikrometre çapında bir çekirdek bulunur. Çekirdek normal ışık mikroskopları ile güçlkle fark edilir. Ancak, Giemsa ile boyanan preparatlarda çekirdek kolayca görülebilir. Çekirdeğin etrafı çift katlı ve delikli bir membran (çekirdek membranı) ile çevrilidir. Normal olarak her hücrede bir tane çekirdek olmasına karşın, çok genç ve çabuk üreyen hifalarda bazen birden fazla çekirdeğe rastlanabilir. Septumsuz hifalarda her hücrede birden fazla çekirdek bulunabilir. Çekirdek içinde bulunan kromozom, deoksiribonukleik asit (DNA) yapısında ve birden fazla sayıdadır. Örneğin, kromozom sayısı *A. nidulans*'da 8 ve *S. cerevisiae*'de 17 olarak saptanmıştır. Kromozomun yapısı ökaryotik ve prokaryotik hücre kromozomlarına benzerlik gösterir. DNA'daki G+C oranı %35-65 arası olup türler arasında bu sınırlar içinde farklar görülmektedir. DNA'nın molekül ağırlığı kromozom sayısına bağlı olarak artmaktadır. Transkripsiyon ve translasyon ökaryotiklerde olduğu gibidir. Somatik bölünme mitoz ve seksüel üreme mayoz şeklindedir. Mantar hücrelerinde bir veya birden fazla çekirdekcik olabilir. Çekirdekcğin yapısında %80 RNA ve protein bulunur.

Mitokondri: Mantar hücrelerinde değişik sayıda, küçük (0.4-0.8x1-2 mikrometre), genellikle disk veya oval bir şekil gösteren mitokondriler bulunur. Yapısında protein ve DNA bulunan mitokondriumların bölünerek ve/veya tomurcuklanma ile çoğaldıkları bildirilmektedir. Bitki ve hayvan hücrelerinde olduğu gibi hücrenin enerji merkezini oluştururlar.

Golgi aygıtı: Mantar hücrelerinde, görevleri bitki ve hayvan hücrelerindeki sistemin aynı olan golgi aygıtı bulunur.

Flagellum: Hareketli sporlarda (zoospor) flagellum organeline rastlanmaktadır. Flagellum sporun uygun ortamlara doğru hareketini sağlar. Spor buraya yerleşip filizlenerek yeni bir mantar oluşturur.

Ribozom: Mantar hücreleri içinde çok sayıda ribozom bulunur. Ribozomlar elektron mikroskopta görülebilir. Ribozomlar, hücre sitoplazmasında serbest olarak veya birkaç tanesi bir arada (poliribozom) görülebildiği gibi, endoplazmik retikulumlarda ve mitokondrilerde de bulunur. RNA ve protein içerirler. Protein sentezinde önemli görevleri olan ribozomlar ökaryotik özellikte olup 80 S (60S+40S) değerindedir.

Lizozom: Mantarlar hücresinde endomembranda yer alan lizozomların içlerinde hidrolitik enzimler vardır.

Makroskopik Morfoloji

Mantar kolonileri mantarların tiplendirilmesinde çok önem taşır. Patojenik mantarlar katı besiyerlerinde beş türde koloni oluştururlar. Bu farklılıklar, mantarların genetik özellikler yanı sıra besiyerinin kimyasal yapısına, kültürlerin eksikliğine veya çevresel koşullarla ilişkili olabilir. Örn. *C. immitis*, 37°C üretildiği zaman maya benzeri koloniler oluştururken 22-25°C'de genellikle miselyal koloniler meydana getirirler. Başlıca koloni tipleri ve kısa özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

1. **Miselyal Koloniler:** Genellikle, oval, yuvarlak bazen de düzensiz bir şekil gösterebilirler (çentikli, loblu, asteroid, poligonal, vb). Bu tür koloniler çeşitli renklere de sahip olabilirler. Örneğin; Dermatofitler (*Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton* cinslerine ait türler)ve sistemik infeksiyona neden olan bazı mantarlar (*C. immitis*, *H. capsulatum*, vb) 22-25°C'de üretilmesinde miselyal bir görünüme sahiptirler.
2. **Maya Benzeri Koloniler:** Koloniler yumuşak, mukoid kıvamda kabarık, nemli bir görünüşte olup oval ve yuvarlak kenarlara sahiptirler. Örneğin; Saccharomyces sınıfına ait türler (*S. cerevisiae*, *S. fragilis*, vb) kolonileri ile sistematik infeksiyon oluşturan dimorfik mantarların 37°C'deki kolonileri genellikle maya benzeri bir özellik gösterirler.
3. **Membranöz Koloniler:** Bazı dermatofitler (*T. schoenleini*, *T. verrucosum*, vb) üremelerinin bazı aşamalarında ince deri veya membranöz bir özellikte koloniler oluşturabilirler.
4. **Granüler Koloniler:** Başlangıçta genellikle, filamentöz olan kolonilerde sporulasyon fazlaca olmuşsa, aerial hifalarda azalmalara buna karşın sporlarda artmalara rastlanabilir. Sporun özelliğine göre, koloniler ince veya kaba bir granülasyon gösterir. Örneğin; Dermatofitlerden *Efloccosum*, *M gypseum* böyle koloni formasyonu gösterir.
5. **Pleomorfik Koloniler:** Laboratuvarlarda, besiyerlerinde uzun süre pasajları yapılan mantarlar bu tip koloniler meydana getirir. Bazen, kolonilerin ortası veya kenarlarında beyaz, steril ve kadife görünümünde hifalar olabilir. Dermatofitlerde, bu tür kolonilere sıkça rastlanır.

Hangi özellikler küfleri maya mantarlarından ayırmaktadır?



SIRA SİZDE

ÜREME VE FİZYOLOJİ

Mantarların üremeleri ve fizyolojileri birçok farklı özellik göstermektedir. Mantarların canlılar alemindeki yerini iyi anlamak için üreme şekillerini ve fizyolojik özelliklerini iyi bilmek gerekir.

Üreme

Mantarlar sporlanma (sporulasyon) yoluyla ürerler. Bu üreme aseksüel (eşeysiz) ve seksüel (eşeyli) şekilde olabilir. Çevresel koşulların uygun olması veya olgun miselyumlarda yeterince gıda depolanması durumunda genellikle aerial hifalarda, çeşitli şekillerde sporlar meydana gelir.

Jerm tüpü: Mantar sporlarının olgun mantar formuna dönüşmesi sırasında oluşan ve dışarı doğru uzanan tüp şeklindeki yapıdır.

Sporlar olgunlaştıktan sonra hifadan ayrılarak serbest hale gelir ve uygun ortam ve koşullarda çimlenerek kendi türüne özgü mantarı oluştururlar.

Sporların içerisinde bir veya birden fazla çekirdek bulunur. Bazı mantarlarda sporun etrafında epispör, perispör adı verilen bir koruyucu tabakalar bulunur. Spor sitoplazmasında çekirdek dışında vakuol, lipid granüller ve bir mantarın oluşumu için gerekli her türlü organik ve inorganik madde yer alır.

Sporun olgun mantara dönüşmesi sırasında sporlar su alarak şişer, bunun sonucunda dışarı doğru uzanan **jerm tüpü** olarak adlandırılan bir yapı belirir. Bu yapı daha sonra gelişir, büyür ve kendine özgü hifaları meydana getirir. Bu hifalar daha sonra reproduktif hifalara dönüşür. (Şekil 6.3)

Bazı mantar sporlarında flagellum bulunur. Suda yaşayan mantarlarda görülen flagellumlar, sporların hareketini ve uygun ortama yönelmelerini sağlar. Bu sporlar zoospor olarak adlandırılır.

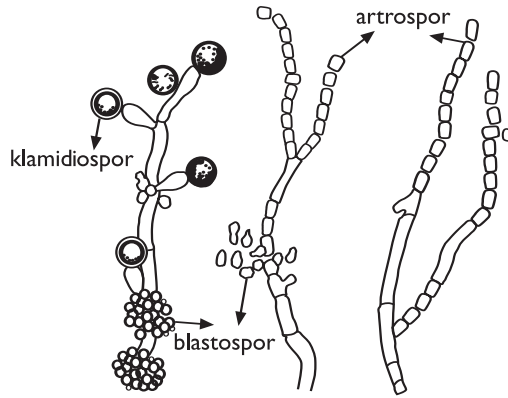
Mantarların aseksüel ve seksüel şekilde çoğalmak için oluşturdukları sporlar farklılıklar göstermektedir. Bu özellikler aşağıda açıklanmıştır.

Aseksüel Sporlar

Eşeysiz üreme sırasında mantarlarda başlıca 5 tür spor oluşumuna rastlanmaktadır. Bunlar: *Artrospor*, *Blastospor*, *Klamidiospor*, *Konidiospor* ve *Sporangiospor*'dur. (Şekil 6.4)

Şekil 6.4

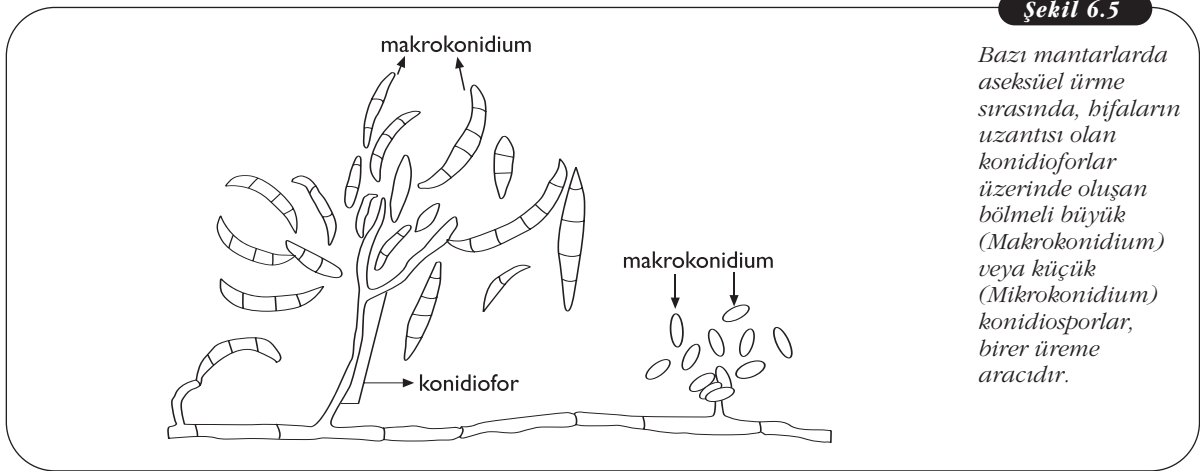
Mantarlar aseksüel üreme sırasında değişik yapıda sporlar (*Klamidiospor*, *Blastospor* ve *Artrospor*) meydana getirirler.



- a. **Artrosporlar:** Artrosporlarda, hifalarda fazla bir şekil değişikliği görülmez. Yalnızca, reproduktif hifaların, enlemesine septumlarla bölünerek fragmentasyonu söz konusudur. Sporların şekilleri, genellikle oval veya silindriktir.

Artrosporlar türlere özgü bir büyüklük gösterirler. Hifalardan ayrıldıktan sonra serbest kalır ve uygun ortamlarda çimlenerek her biri tekrar aynı tür mantarı oluştururlar. Birçok mantar türlerinde (*Dermatofitler*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *C. immitis*, vb) artrospor oluşumuna rastlanır.

- b. **Blastosporlar:** Bu tür çoğalmada hifaların çeşitli yerlerinde genellikle, birden fazla tomurcuk meydana gelir. Bu küçük tomurcuklar çoğalmayı sağlayan blastosporlardır., Blastosporlara flamaentöz *Ascomycetes* mantarlarında, mayalarda ve maya benzeri koloni oluşturan mantarlarda rastlanır. Örneğin; *Saccharomyces cerevisiae* gibi.
- c. **Klamidiosporlar:** *Mucoraceae* familyasına ait türlerde görülen bu sporulasyon şeklinde, hifalarda bulunan hücrelerin bazıları büyür, gelişir, hücre duvarları kalınlaşır ve protoplazmaları yoğunlaşarak klamidiosporları oluştururlar. Bu sporlar hifaların orta, yan veya uç kısımlarında gelişebilir.
- d. **Konidiosporlar:** Filamentöz *Ascomycetes* ve birçok *Deuteromycetes* mantarlarında bu tür sporlara rastlanmaktadır. Konidiosporlar reproduktif hifaların (konidiofor) yanlarında veya uçlarında meydana gelirler. Bu hifalar aerial hifaların modifikasyonu ve diferensiyasyonu sonucu teşekkül ederler. Bu sporulasyon daha çok *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Hormodendrum* cinslerinde görülür. Özellikle, Dermatofitlerde (*Microsporum*, *Trycophyton* cinsleri) aynı hifa üzerindeki iki türde konidium oluşmaktadır. Bunlardan tek hücreli olanlar hifa üzerinde çeşitli yerlerde bulunurlar ve küçük oval, yuvarlak veya armut şeklinde olabilirler Mikrokonidium olarak adlandırılan bu sporlar bazı mantar türlerinde çok sayıda olmasına karşın diğerlerinde az veya çok nadir bulunabilir. Bunun yanında, çok hücreli büyük sporlar mekik, puro veya limon biçiminde olan makrokonidium'ları meydana getirir. Bu sporlar enine septumlarla birden fazla hücreye bölünmüştür. Örn. *M. nanum*'da 2-3 ve *M. canis*'de 7-10 hücre bulunur.(Şekil 6.5)



Şekil 6.5

Bazı mantarlarda aseksüel üreme sırasında, hifaların uzantısı olan konidioforlar üzerinde oluşan bölmeli büyük (Makrokonidium) veya küçük (Mikrokonidium) konidiosporlar, birer üreme aracıdır.

- e. **Sporangiosporlar:** Daha çok *Phycomycetes* mantarlarında görülen bu üreme şeklinde Sporlar (*sporangiospor*), bunları taşıyan özel hifaların (*sporangiofor*) uçlarında oluşan büyük ve yuvarlak keseler (**sporangium**) içinde yer alırlar.. Bu sporlar sporangiumların patlaması sonucu dışarı saçılarak uygun ortam ve çevresel koşullar altında filizlenir ve kendi türlerine özgü mantarları meydana getirirler. Örneğin; *Rhizopus nigricans*'da bu tür üremeye rastlanır.

Sporangium: Hifaların uçlarında bulunana ve içinde sporları taşıyan büyük yuvarlak keselerdir.

Seksüel Sporlar

Eşeyli üremede, ayrı cins veya karakterde olan iki gametin çekirdekleri birbiri ile birleşip kaynaşarak haploid hale gelir ve bu haploid kromozomlar da birleşerek seksüel sporları meydana getirir.

Seksüel üreme şekli mantar türlerinde farklılıklar göstermektedir. Mantarlar bu üreme şeklinde meydana gelen spor yapılarına göre sınıflandırılmakta ve dört grup altında incelenmektedir. Bunlar; *Askosporlar*, *Basidiosporlar*, *Oosporlar* ve *Zigosporlardır*.

- a. **Askosporlar:** Ascomycetes mantarlarında rastlanan bu sporlanma şeklinde aynı ve farklı hifalarda, komşu iki hücrenin (*askogonium* ve *anteridium*) uzaması ve birleşmesi ile askosporlar meydana gelir. Meydana gelen bu sporlar askus olarak adlandırılan geniş ve uzun hücre keseleri içinde oluşurlar. Sporların olgunlaşması ile çevrelerinde bulunan kese yarılr ve seksüel sporlar dışarı çıkarlar. Örneğin; Aspergilluslarda görülen üreme bu şekildedir.
- b. **Basidiosporlar:** Basidiomycetes mantarlarında bu tür sporlara rastlanır Askosporlara bazı yönlerden benzerlik gösteren bir sporlanma şeklidir. Özellikle basidiumların gelişmesi ve basidiosporların oluşması aşamaları benzerlik gösterir. Bu sporlanma şeklinde, öncelikle, birbirine komşu olan iki hücre uzar, birbiri ile birleşir ve tek çekirdekli bir hücre meydana getirir. Bu çekirdeğin mayoz bölünmesi sonucu dört haploid çekirdek oluşur. Basidiumların uç kısımlarında her çekirdek içinde bir sterigmata (*basidium*) meydana gelir ve nukleusların her biri kendine ait olan sterigmata içine girerek basidiosporların oluşumunu sağlarlar. Bundan sonraki aşama diğerlerinde olduğu gibidir. Basidiosporlar buldukları yerlerden ayrılarak başka yerlere giderler ve uygun ortam bulduklarında filizlenerek yeni bir mantarı meydana getirirler. Basidiosporlar askosporlardan farklı olarak eksternal gelişim gösterirler.
- c. **Oosporlar:** Phycomycetes mantarlarında Oomycetes sınıfına ait türler oosporlar ile seksüel çoğalma gösterirler. Bu mantarlarda erkek gamet (*anteridium*), dişi gametten (*oogonium*) ayrı özellikler gösterir; daha küçüktür ve farklı görünüme sahiptir. Oosporlar, bu gametlerin birleşmesi sonucu meydana gelirler. Oosporlar yuvarlak şekilli, spor duvarı kalın, dış etkilere dayanıklı ve gıda yönünden zengin seksüel sporlardır.
- d. **Zigosporlar:** Phycomycetes mantarlarından Zygomycetes sınıfına ait türlerde görülen zigosporlar, sporun oluşumuna kadar olan dönemde diğer seksüel sporların oluşumundan farklılıklar gösterirler. Bu tür sporların oluşumunda farklı cinsiyet karakterindeki gametangiumlar somatik hifaların branşlarından orijinlerini alırlar ve aynı mantar üzerinde bulunurlar (*homotallik*). Bunlarda, erkek veya dişi hücreler farklı özellik veya yapı göstermezler. Birbirine benzeyen iki cins gametin birbirine doğru uzaması ve birleşmesi ile zigospor oluşturulur. Birleşme sırasında, hücreler arası bölmeler kaybolur ve çekirdekler kaynaşarak birleşir. Sporun etrafı kalın koruyucu bir tabaka ile çevrilir. Zigospor uygun koşullar altında filizlenir, yeni hifa ve mantar meydana gelir.

Fizyoloji

Mantarlar çevre koşullarına dayanıklı, güçlü hücre duvarlarına sahip organizmalardır. Hücre duvarlarında bulunan kitin ve selüloz karakterinde maddeler onların çok değişik olan çevre koşullarına uyum sağlamalarına yardımcı olur. Örneğin, mantarlar bakterilerin dayanamadıkları yüksek konsantrasyonlardaki (%50) şeker solusyonlarına dirençlidirler. Bu nedenle, reçel ve jöleler mantarlar tarafından kolayca kontamine edilebilirler. Ancak, yüksek ozmotik basınca karşı bakteriler kadar dayanamazlar.

Birçok mantar türü düşük pH derecelerinde üreyebilir. Mantarların yaşayabildikleri minimal ve maksimal pH limitleri 2-11 arasında değişebilir. Böylelikle, asit karakterdeki meyveler veya meyve sularında (özellikle domates, portakal, limon, greylift, mandalina, vb) buzdolabı ısısında bile mantarları üreyebilir.

Mantarların üremelerinde en önemli faktörlerin başında nem gelmektedir. Nitekim, yüksek orandaki nem genellikle üreme üzerine olumlu etkide bulunur. Nem miktarı azaldıkça mantarların çoğalmaları da sınırlanmaya başlar. Patojenik Dermatofitlerin üremesi için nemli deri iyi bir ortam oluşturur.

Üreme ısısı limitleri oldukça geniş bir aralıktadır (0°C ile 60°C) ve mantar türleri arasında farklılıklar gösterir. Hifalar en yüksek ısı sınırlarından sonra yaşayamamalarına karşılık mantar sporları yüksek ısıya ve değişik çevre koşullarına oldukça dirençlidirler. Bunun yanında termofilik mantarların 60°C üzerinde gelişebildiği saptanmıştır. Patojenik mantarlar için optimal ısı üzerinde veya içinde üredikleri canlıların vücut ısısı olarak kabul edilmektedir. Ancak, Dermatofitler gibi deride lokalize olan mantarlar dış ortamla da temasta bulduklarından en uygun üreme ısısı çevre ısısıyla bir yakınlık gösterir ve bu ısı 20°C ile 25°C arasında değişir.

Mantarlar genellikle oksijenin bulunduğu aerobik ortamlarda gelişirler ve ürerler. Oksijen seviyesinin düşmesi veya mikroaerofilik koşullar üreme ve gelişmeyi olumsuz etkiler.

Işık gereksinim duyulan önemli bir faktör değildir. Mantarlar ışığın olmadığı ortamlarda üreme ve gelişme gösterebilirler.

Mantarlar fotosentez yapamayan ve bu nedenle gıdalarını dışarıdan sağlamaya zorunlu organizmalardır. Bazı mantarlar basit yapıdaki ortamlarda gelişebildikleri halde diğerleri üremeleri ve gelişmeleri için inorganik maddelere ve özel üretim faktörlerine (tiyamin, biotin, vitamin B6 vb) ihtiyaç duyarlar. Patojenik mantarları üretmek ve izole etmek için laboratuvarında bileşimlerinde çeşitli inorganik ve organik maddeler bulunan besiyerleri kullanılmaktadır. Bu besiyerleri içerisinde *Sabouraud Dextroz Agar*, en fazla kullanılır.

Mantarlar proteaz, karbonhidraz, nukleaz ve lipaz gibi enzimler sentezleyerek çevredeki gıda maddelerini ayrıştırır ve bunlardan faydalanırlar.

Mantarlar tarafından sentezlenen maddeler uzun yıllardır gıda ve tıbbi endüstrinin önemli bir parçasını oluşturur. Organik asitler, alkol, enzimler, pigmentler, polisakkaritler, steroller, antifungal maddeler (griseofulvin, mikostatin, vb) antibiyotikler (penisilin, streptomisin vb) ve diğer birçok önemli maddeler (vitaminler, proteinler, lipidler, toksik maddeler vb) bunlara örnek olarak verilebilir. Maya hücrelerinin sentezlediği vitaminler (tiyamin, riboflavin, nikotinik asit, vb) de insan ve hayvanlarda kullanılan medikal önemleri olan maddeler arasındadır.

Mantarlar faydalı maddeler dışında mikotoksin adı verilen, insan ve hayvan sağlığı için zararlı metabolitler de üretebilirler. Bu metabolitlerin pek çoğu toksik ve karsinogeniktir. Örneğin: *Aspergillus flavus*'ün sentezlediği *aflatoksin* karaciğer kanserine neden olur.

Mantarlar insan ve hayvanlarda gerek deri üzerinde, deri altında veya tüm vücuda dağılmış sistemik infeksiyonlar oluşturabilirler. Bu nedenle tıbbi önemleri çok fazladır. Bazı patojen mantarlar hayvanlardan insanlara bulaşması ile de a zoonotik özellik gösterirler.

SIRA SİZDE



Bakterilerin üreyemediği reçel, meyve suyu, turşu gibi gıda maddeleri üzerinde küfleri veya mayaları neden görmekteyiz?

LABORATUVAR TEŞHİSİ

Mantarların laboratuvar teşhisi etkenin muayene materyalinde tespit edilmesi, kültürü yapılarak üretilmesi, identifikasyonu, serolojik ve alerjik testler yardımıyla gerçekleştirilir. Son yıllarda, moleküler teknikler de teşhis için kullanılmaktadır. Muayenesi yapılacak materyalden mantar izolasyon şansının artırılmasında, materyal toplama tekniği, materyalin alındığı yer ve materyalin muhafazası son derece önemlidir.

Materyallerin Toplanması

Muayene örneği olarak, genellikle, tedavi amacıyla herhangi bir ilaç uygulanmamış olan materyaller tercih edilir. Alınan materyaller üzerinde örnekle ilgili gerekli bilgilerin yazılı olduğu tercihen, ağzı vidalı kapaklı şişelerde veya petri kutularında toplanır. Materyal alma işleminde steril makas, pens, bistüri, petri kutusu gibi malzemeler kullanılır. Kullanılacak malzeme iyi sterilize edilmiş ve kuru olmalıdır. Çünkü, nemli malzeme, saprofitik mantar sporlarının üremesine neden olarak kontaminasyon meydana getirebilir. Örnek materyaller alındıktan sonra mümkün olduğu kadar kısa süre içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Materyallerin soğuk zincir içerisinde gönderilmesi ve hemen kullanılmayacaksa buzdolabında muhafazası tercih edilmelidir.

Dermatofitlerin (*Mikrosporum*, *Trikofiton* ve *Epidermofiton*, vb) teşhisi genellikle için genellikle deri kazıntısı, kıl, tüy, tırnak gibi örneklerden yararlanılır.

Deriden örnek almadan önce, lezyonlu bölge yabancı maddeleri, kontaminant mantar sporlarını ve diğer ajanları gidermek için alkole batırılmış pamukla veya yumuşak steril bir bez ile silinir. Alkol kuruduktan sonra lezyonların kenarlarındaki aktif bölgelerden steril makas, pens, küret, bistüri, ile deri kazıntısı alınarak steril petri kutularına veya şişelere, toplanır. Lezyon sayısı birden fazla ise her biri için örnek alma işlemi tekrarlanır. Yeterince materyal alınarak laboratuvara gönderilir. Kıl, tüy, yün gibi materyallerin incelenmesinde, bu örneklerin kökleri, direkt mikroskop ve kültür için en iyi yerlerdir. Kılların üzerinde ve lezyonların ortasında, genellikle az sayıda mantar elementi bulunur. Kılı bölgelerden en iyi örnek steril pens yardımıyla koparma veya çekme ile alınır. Eğer bu, kılların frajilitesinden dolayı mümkün değilse bistüri deri döküntülerinin kazanmasında ve kıl köklerindeki küçük parçaları almada kullanılır. Sert kıllı fırçalarda başarılı bir şekilde kullanılabilir. Tırnak örneklerinin muayenesi için, tırnaklar iyice temizledikten ve alkole sildikten sonra makasla kesilerek, bistüri veya küretle kazanarak toplanır. Dermatofitler dışında subkutan veya sistemik infeksiyon yapan mantarların teşhisi için için ise vücut sıvıları veya biyopsi materyallerinden yararlanılır.

Materyallerin Muayenesi

Mantar muayenesi amacıyla yukarıda bildirildiği gibi toplanarak laboratuvara getirilen materyaller aşağıda bildirilen yöntemlerle muayene edilirler.

Wood lambası

Bazı dermatofitlerin tanısında Wood lambası olarak bilinen portatif ultraviyole ışık kaynağı kullanılmaktadır. Kıllar karanlık odada Wood lambası (330-365 nm dalga boyunda) ile incelendiğinde bazı dermatofitlerde parıldama görülür. *M. canis* ve *M. audouinii* tarafından sentezlenen metabolitlerden dolayı sarımsı yeşil parıldama görülür. Ancak, bu metot hiçbirzaman kesin teşhis aracı değildir.

Direkt Mikroskopi

Direkt mikroskopi, özellikle dermatofitleri teşhis için şüpheli muayene materyalinden KOH solusyonu ile hazırlanan preparatların mikroskopik incelenmesidir. Muayene materyali bir lam üzerinde birkaç damla % 15'lik KOH solusyonu ile karıştırılır. Lam üzerindeki bu karışım bir lamel ile kapatılarak hafifçe ısıtılır. KOH solusyonunun kristalleşmesini önlemek için, preparat kaynatılmadan ısıtılmalıdır. Preparatın net bir şekilde mikroskop altında incelenecek şekilde olgunlaşmasını sağlamak amacıyla 10-15 dakika bekletilir. Bu işlem muayene materyalinin içerdiği protein artıklarını sindirerek, mantar elemanlarının meydana çıkmasına yardımcı olur. Mantar hifa ve sporlar işlemde etkilenmezler. Direkt mikroskopik muayene ile, özellikle kıl ve deri örneklerinde % 40-60 oranında doğru teşhis sağlanabilmektedir. Deri kazıntılarının kontrolünde mantar hifaları uzun, dallanan, bölmeli ve ışık kırıcı kıvrımlı iplikçikler halinde görülürler. Miselyum adı verilen bu iplikçikler epidermal tabakada, hücreleri boydan boya tutmuş olarak izlenirler. İyi hazırlanmış bir preparatta çeşitli organelleri, yağ damlalarını, çekirdekleri ve miselyumları ayırtetmek mümkündür.

Kültür

Mantar elementlerinin görüldüğü ve görülmediği her iki durumda da muayene materyalleri mutlaka kültür işlemine alınmalıdır. Kültür, uygun besiyerlerine, ucu kıvrık olan özel bir iğne yardımı ile oyuk açılarak, örneklerin yerleştirilmesi şeklinde yapılır. Kültür işleminde, materyaller besiyerlerine yüzeyi geniş olacak şekilde ve bol miktarda ekilmelidir. Uzun bir inkübasyon dönemine gereksinimi olan mantar kültürlerinde, besiyerinin kuruması, ortamdan gelen kontaminasyonların ve üreyen kültürlerin etrafa dağılmalarının önlenmesi amacıyla; ekim işleminin tüpler içinde yatık olarak hazırlanan besiyerlerine yapılması yararlıdır. Dermatofitlerin ilk izolasyonu için kullanılan en genel besiyeri, aktidion (sikloheksimid) ve antibiyotik içeren Sabouraud besiyeridir. Üreyebilecek küf tipi saprofit mantarları engellemek amacı ile, 0.4 µg/ml aktidion ilavesinin yeterli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca antibakteriyel ajan olarak kloramfenikol (0.005 µg/ml) ve/veya gentamisin (0.04 µg/ml) kullanılmalıdır. Dermatofitlerin ilk izolasyonu sırasında, bazen etkenlerin fırsatçı küf tipi mantarlar eşliğinde ürettiği gözlenir. Bu tip güçlüklerin elimine edilmesi için yapılan çalışmalar, seçici ilk izolasyon besiyerlerinin gelişmesi ile sonuçlanmıştır. Dermatofitlerin üremesi, genelde, yavaş bir şekildedir ve bir haftadan üç haftaya kadar sürebilir. Besiyerleri 25-27°C de inkube edilmelidir. Farklı olarak, *T. schoenleinii* ve *T. verrucosum* türlerinin 37°C'de daha iyi üredikleri belirtilmiştir. Üreme yeterli şekilde olduğunda üreyen kolonilerden alınan mantar miselyumları, lam kültürü yapmak amacı ile uygun besiyerlerine aktarılır. Uygulanan lam kültürünün mantarların, türlere özel mikroskopik morfolojilerinin özgün yapılarını incelemeye olanak sağladığı bildirilmiştir. Trichophyton türlerinin identifikasyonu kazein içeren temel besiyerine ilave olarak inositol, nikotinik asit, tiya-

min ve tiyamin-inositol ilave edilebilir. Bu şekilde hazırlanan besiyerleri, Trichophyton agar adı ile tanımlanmaktadır.

Mantarların identifikasyonu koloni ve mikroskopik morfolojilerine göre yapılır. Makroskopik (koloni morfolojisi) ve mikroskopik özellikleri belirlenen koloniler, mantar atlaslarından yararlanılarak tanımlanır. Besiyerinde şekillenen koloniler, üreme durumu, hızı, şekli, yapısı, ön ve arka yüzeyindeki pigmentasyon özellikleri dikkate alınarak makroskopik olarak kayıt edilir. Mikroskopik muayenede ise, kültürden hazırlanan preparatlar **laktofenol pamuk mavisi** ile boyanarak mikroskopta incelenirler. Mikroskopik muayenede mantar kolonileri hifa, mikrokonidiyum, makrokonidiyum, klamidospore, artrospore ve blastospore morfolojileri yönünden incelenirler. Bunlara ek olarak fizyolojik/biyokimyasal testler (In vitro saç perforasyon testi, sorbitolün asimilasyonu, üreaz oluşumu veya ürenin hidrolizi, vb) yapılabilir.

Laktofenol pamuk mavisi:
Mantar hifa ve sporlarını boyamada kullanılan Laktik asit fenol ve gliserinden içeren mavi renkte bir boyadır.

Moleküler Teknikler

Dermatofitlerin rutin identifikasyonunda kullanılan laboratuvar metodlarının yavaş olması ve bazı örneklerde kesin sonuç alınmaması, yeni metodların geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Nükleik asitleri temel alan bu teknikler, patojenik organizmalardaki genotipik farklılıkları ortaya çıkarmada oldukça yararlıdır. Bu teknikler çok spesifiktir ve fenotipik özellikleri temel alan tekniklerden daha kesin sonuçlar verir. Polymerase chain reaction (PCR) ve mitokondrial DNA'nın restriction fragment length polymorphism (RFLP) analizi bu tekniklere örnek verilebilir.

Hayvan Denemeleri

Dermatofitlerde deneme hayvanlarının derisine infekte materyallerden veya üretilmiş şüpheli kolonilerden inokulasyonlar yapılır. Lezyonların oluşum süresi ve karakteri inokule edilen mantarın türüne bağlıdır. Deneme hayvanı olarak kobay, rat, tavşan, fare veya bazende büyük hayvanlar işe yarar. En az iki deneme hayvanı kullanılır.

Çünkü mantar infeksiyonlarına karşı hayvanların duyarlılıkları, genellikle değişiktir. Denemelerde beyaz veya özellikle albino hayvanların kullanılmaları, sonuçları değerlendirme bakımından yararlar sağlayabilir. Deneme hayvanları her bakımdan sağlam ve derilerinde herhangi bir lezyon bulunmamalıdır.

Serolojik ve Allerjik Testler

Hayvanlardaki dermatofitlerin tanısında serolojik ve allerjik testler genellikle kullanılmamaktadır. Dermatofitler zayıf immunolojik veya immunostimulan etkiye sahiptirler. Ancak allerjik özelliğe sahip olduklarından deri testleri kullanılabilir.

SIRA SİZDE

4

Deri, kıl, tırnak gibi materyallerden mantarların direk mikroskopi ile teşhisi işleminde potasyum hidroksit kullanılmasının amacı nedir ?

Özet



Mantarların sınıflandırmasını tanımlamak.

Canlılar alemi; hayvanlar, bitkiler, mantarlar, protistalar ve monera (Archae ve Eubacteria) olarak üzere 5 bölümde incelenebilir. Bunlardan ilk dördünü oluşturanlar çok hücreli formda (ökaryot) olup monera'lar tek hücreli (prokaryot) yapıdadır. Bu iki farklı grubu, esas olarak çekirdek membranının varlığı ya da yokluğu belirlemektedir. Sistematik çalışmalarına göre mantarlar bu beş alemden birini meydana getirmektedir. Mantarların sınıflandırılması diğer canlılarda olduğu gibi yeni tiplendirme tekniklerinin bulunması ile değişmekte ve genişlemektedir.



Mantarların morfolojik özelliklerini açıklamak.

Mantarlar, ökaryotik hücre yapısında, gövde, yaprak ve çiçeğe sahip olmayan, klorofil içermeyen ve fotosentez yapamayan organizmalardır. Mantarlar görünüm bakımından; küfler ve mayalar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Filamentöz koloni yapısında olanlar küf, mukoid yapıda olanlar maya olarak adlandırılırlar. Mikroskopik hücre yapısı yönünden ortak özelliklere sahip olan mantarların, makroskopik olarak birbirlerinden ayrılmalarına neden olan birçok farklı özelliğe sahip oldukları görülmektedir.



Mantarların üremesi ve fizyolojisini açıklamak.

Mantarların üremeleri ve fizyolojileri birçok farklı özellik göstermektedir. Mantarların canlılar alemindeki yerini iyi anlamak için üreme şekillerini ve fizyolojik özelliklerini iyi bilmek gerekir. Aseksüel ve seksüel olarak üreyebilen mantarlar mitoz ve mayoz bölünme ile çoğalabilirler, üreme sporlanma yoluyla olur, Işık istemeden çok geniş bir sıcaklık ve pH aralığında aralığında varlığını sürdürebilen, kalın ve güçlü hücre duvarları sayesinde çok konsantr ve düşük ortamlarda bile yaşayan bu canlıların bazılarında hareket organeli flagellum da bulunur.



Mantarların laboratuvar teşhisini tanımlamak.

Mantarların laboratuvar teşhisi etkenin muayene materyalinde tespit edilmesi, kültürü yapılarak üretilmesi, izolasyon ve identifikasyonu, serolojik ve alerjik testler yardımıyla gerçekleştirilir. Son yıllarda, moleküler teknikler de teşhis için kullanılmaktadır. Muayenesi yapılacak materyalden mantar izolasyon şansının artırılmasında, materyal toplama tekniği, materyalin alındığı yer ve materyalin muhafazası son derece önemlidir.

Kendimizi Sınavalım

1. Mantarların üreme aracı aşağıdakilerden hangisidir?
 - a. hifa
 - b. tallus
 - c. spor
 - d. hücre duvarı
 - e. flagellum
2. Bazı mantarlara hareket sağlayan organel aşağıdakilerden hangisidir?
 - a. makrokonidium
 - b. mikrokonidium
 - c. sitoplazmik membran
 - d. flagellum
 - e. golgi aygıtı
3. Mantar hücrelerine enerjiyi sağlayan organel aşağıdakilerden hangisidir?
 - a. mitokondri
 - b. golgi aygıtı
 - c. çekirdek
 - d. vezikül
 - e. lizozom
4. Makrokonidium hangi mantar elementinden köken almaktadır?
 - a. tallus
 - b. hifa
 - c. hücre duvarı
 - d. miselyum
 - e. spor
5. Mantarlar hangi gruba girerler?
 - a. prokaryot
 - b. ökaryot
 - c. karyot
 - d. prekaryot
 - e. zookaryot
6. Mantar hücrelerindeki ribozomların değeri aşağıdakilerden hangisidir?
 - a. 40S
 - b. 60S
 - c. 70S
 - d. 80S
 - e. 90S
7. Mantarlar çekirdek materyali yönünden aşağıdakilerden hangisine **benzemez**?
 - a. bakteri
 - b. protozoa
 - c. alg
 - d. bitki
 - e. hayvan
8. Aşağıdakilerden hangisi mantar hücresine şeklini verir?
 - a. spor
 - b. hifa
 - c. endoplazmik retikulum
 - d. sitoplazmik membran
 - e. hücre duvarı
9. Mantarlarda hangi yapı beslenme ile ilgilidir?
 - a. vejetatif miselyum
 - b. aerial miselyum
 - c. artrospor
 - d. jerm tüpü
 - e. lomazom
10. Deride lokalize olan mantarlar için en uygun üreme sıcaklığı aşağıdakilerden hangisidir?
 - a. 4°C
 - b. 22°C
 - c. 37°C
 - d. 42°C
 - e. 60°C

Okuma Parçası

Ökaryotik ve Prokaryotik Hücreler

Mantarlar ökaryotik organizmalardır. Bu nedenle hayvan ve bitkilerin hücre yapısına büyük ölçüde benzerlik gösterirler. Ancak, prokaryotik özellikte olan bakterilerle birçok yönden farklılıklara sahiptirler. Bu farklılıkların en belirgin olanları sırasıyla, çekirdek membranını mantarlarda varken, bakterilerde olmaması, mantarlarda DNA'nın proteinle birleşik olarak bulunurken bakterilerde çıplak olması, mantarlarda birden fazla kromozom görülürken bakterilerde bir kromozom olması, çekirdeğin mantarlarda varken bakterilerde olmaması, mantarların seksüel de üreme gösterirken bakterilerin amitoz üremesi, ribozom değerlerinin mantarlarda 80S (60S+40S), bakterilerde 70S (50S+30S) değerinde bulunması, mantarlarda mitokondrinin olup bakterilerde olmamasıdır. Ayrıca, her ikisinde bulunan aynı organellerinin kimyasal yapısı bile farklılıklar gösterebilir. Örneğin; mantarlarda hücre duvarı kitin ve selüloz gibi şekil verip güçlendiren maddeler içerirken, bakterilerde hücre duvarında bu maddelere rastlanmaz.

Kendimizi Sınayalım Yanıt Anahtarı

1. c Yanıtınız yanlış ise, "Üreme" konusunu yeniden okuyunuz.
2. d Yanıtınız yanlış ise, "Üreme" konusunu yeniden okuyunuz.
3. a Yanıtınız yanlış ise, "Morfolojik Özellikler" konusunu yeniden okuyunuz.
4. e Yanıtınız yanlış ise, "Üreme" konusunu yeniden okuyunuz.
5. b Yanıtınız yanlış ise, "Mantarların Sınıflandırılması" konusunu yeniden okuyunuz.
6. d Yanıtınız yanlış ise, "Üreme" konusunu yeniden okuyunuz.
7. a Yanıtınız yanlış ise, "Morfolojik Özellikler" konusunu yeniden okuyunuz.
8. e Yanıtınız yanlış ise, "Morfolojik Özellikler" konusunu yeniden okuyunuz.
9. a Yanıtınız yanlış ise, "Morfolojik Özellikler" konusunu yeniden okuyunuz.
10. b Yanıtınız yanlış ise, "Mantarların Laboratuvar Teşhisi" konusunu yeniden okuyunuz.

Sıra Sizde Yanıt Anahtarı

Sıra Sizde 1

Mantarlar morfolojik yapıları incelendiğinde; küfler ve mayalar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Üremeleri çok hücreli filamentöz iplikçikler şeklinde olursa küf, tek hücre şeklinde, küremsi yapılar halinde olursa maya, olarak isimlendirilir. Mukoid yapıda organizmalar olan mayalar, küflerde bulunan hifalara benzer yalancı hifalar meydana getirebilirler.

Sıra Sizde 2

Mantarlar sporlanma (sporulasyon) yoluyla ürerler. Bu üreme aseksüel (eşeysiz) ve seksüel (eşeyli) şekilde olabilir. Çevresel koşulların uygun olması veya olgun miselyumlarda yeterince gıda depolanması durumunda genellikle aerial hifalarda, çeşitli şekillerde sporlar meydana gelir. Sporlar olgunlaştıktan sonra hifadan ayrılarak serbest hale gelir hava akımı ile havaya karışan sporlar uzaklara taşınabilir. Uygun ortam ve koşullarda çimlenerek orijinal mantardan uzak mesafelerde de kendi türüne özgü mantarı oluştururlar.

Sıra Sizde 3

Mantarlar çevre koşullarına dayanıklı, güçlü hücre duvarlarına sahip organizmalardır. Üreme ısı aralıkları 0°C ile 60°C arasında değişir. Hücre duvarlarında bulunan kitin ve selüloz karakterinde maddeler onların bakterilerin dayanamadıkları yüksek konsantrasyonlardaki şekerli maddelerde üremelerini sağlar. Bu nedenle, reçel ve jöleler mantarlar tarafından kolayca kontamine edilebilirler. Birçok mantar türü düşük pH derecelerinde üreyebilir. Mantarların yaşayabildikleri minimal ve maksimal pH limitleri 2-11 arasında değişebilir. Böylelikle, buzdolabında bile asit karakterdeki meyve, meyve suyu ve turşularda üreyebilirler.

Sıra Sizde 4

Mantarların direk mikroskopisinde potasyum hidroksit uygulaması muayene materyalinin içerdiği protein artıklarını sindirerek, mantar elemanlarının meydana çıkmasına yardımcı olur. Mantar hifa ve sporları bu işlemle etkilenmezler. Mantar hifaları uzun, dallanan, bölmeli ve kıvrımlı iplikçikler halinde görülürler. İyi hazırlanmış bir preparatta çeşitli organelleri, yağ damlacıklarını, çekirdekleri ve miselyumları ayırtmak mümkündür.

Yararlanılan Kaynaklar

- Arda, M. (2000). **Temel Mikrobiyoloji**, Ankara: Medisan Yayınevi
- Arda, M. (1980). **Mikoloji (Genel ve Özel)** Ankara: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları.
- Carter, G.R., Darla, J.W (2004). **Essential Bacteriology and Mycology**, (sixth Ed.), Ames, Iowa: Iowa State Press.
- Guarro, J., Gene, J., Stchigel, A.M. (1999). **Development in fungal taxonomy**. *Clinical Microbiol Rev*, 12: 454-500
- Howard, D.H. (2002). **Pathogenic Fungi in Humans and Animals**, (second Ed.), NewYork: Marcel Dekker Inc.
- Larone, D.H. (2005). **Medically Important Fungi, A Guide to Identification**, (second Ed.), Washington: American Society for Microbiology.
- Michael, J.C., Sarah C.W., Graham, W. G.(2001). **The Fungi**, (second Ed.), California: Academic Press.
- Tel,O.Y. (2005). **Kedi ve Köpeklerden Dermatofitlerin İzolasyonu**, Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

7

Amaçlarımız

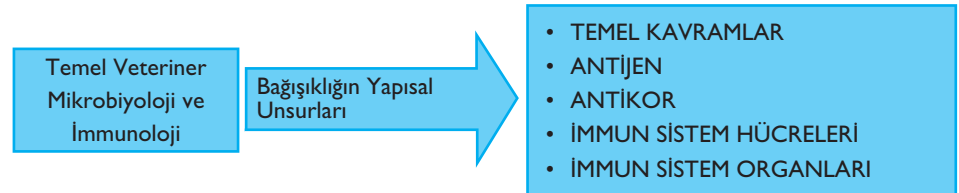
Bu üniteyi tamamladıktan sonra;

- 👁️ Bağışıklık kavramını ve temel unsurlarını tanımlayabilecek,
- 👁️ Hangi maddelerin antijen olduğunu açıklayabilecek,
- 👁️ Antikorun yapısını, sınıflarını ve işlevlerini tanımlayabilecek,
- 👁️ İmmun sistem hücrelerinin temel özelliklerini ve işlevlerini açıklayabilecek,
- 👁️ İmmun sistem organlarının temel özelliklerini ve işlevlerini açıklayabileceksiniz.

Anahtar Kavramlar

- Bağışıklık
- İnfeksiyon
- Savunma
- Antijenite
- Antikor
- Myeloid seri hücreleri
- Lenfoid seri hücreleri
- Primer lenfoid organlar
- Sekonder lenfoid organlar

İçindekiler



Bağıışıklığın Yapısal Unsurları

TEMEL KAVRAMLAR

Tüm hayvanlar, mikroorganizmalarla dolu bir çevrede yaşamaktadır. Vücudun mikroorganizmalara karşı savunulması, sağlıklı bir yaşam ve nesillerin devamı için kaçınılmaz bir zorunluluktur. Mikroorganizmaların vücuda yerleşmesine *infeksiyon*, bu nedenle oluşan hastalığa *infeksiyöz hastalık* denir. Hastalıktan, özellikle infeksiyöz hastalıklardan korunma *immunité* veya *bağıışıklık* terimi ile ifade edilir. Vücudun yabancı etkenlere karşı gösterdiği tepkilerin tümüne kolektif olarak immun yanıt (bağıışıklık yanıtı) denir. İmmun yanıtta görev alan tüm hücre, organ ve moleküllerin oluşturduğu kompleks yapı immun sistem olarak nitelenir. **Patojenlerin** herbirinin kendisine has özellikleri ve farklı hastalık oluşturma yolları vardır. Buna karşı, hayvanlarda da savunmaya yönelik çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Bunlar genelden özele doğru sıralandığında aşağıdaki kavramlar karşımıza çıkmaktadır.

Patojen: Hastalık oluşturabilen mikroorganizmaları belirtmek için kullanılan bir terim.

Doğal Direnç

Genetik temele bağılı özellikler, bazı hayvan türlerinde veya cinslerinde bazı infeksiyöz hastalıkların hiç oluşmamasını sağlar. Buna *doğal direnç* denir. Bu durumun vücudun savunma faktörleri veya bağıışıklık ile ilgisi yoktur. Doğal direnç kesindir; yani belirli bir infeksiyona doğal dirençli bir tür, hiçbir şekilde o hastalığa yakalanmaz. Örneğin, tür düzeyinde atlarda veya cins düzeyinde tek tırnaklılarda sığır vebası hastalığı hiç görülmez. Bu nedenle, doğal dirence *absolut direnç* veya kesin direnç de denir. Bir türün bazı ırkları, hatta bazı bireyleri belirli infeksiyonlara, diğer ırk ve bireylere göre daha dirençli olabilirler. Ancak, ırk veya birey düzeyindeki direnç kesin değil, görecelidir. Bu duruma *relatif direnç* denir. Örneğin, Kuzey Afrika koyunları *Brucella* infeksiyonuna, diğer koyun ırklarına göre daha dirençlidir.

Doğal Savunma Engelleri

Vücudun bazı yapısal unsurları veya fizyolojik olayları, mikroorganizmaların mukozal yüzeylerde yerleşmesine, vücuda girmesine veya vücutta yayılmasına engel olabilir. Aslında immun sisteme dahil olmayan fakat doğal bir engel işlevi gören bu unsurlar *doğal savunma engelleri* olarak nitelenir. Bunların, asıl görevleri savunma değildir. Ancak, normal fizyolojik işlevlerini yürütürken, dolaylı olarak vücudun savunmasına da katkıda bulunurlar. Bu doğal savunma engellerinin çoğu, deri ve

mukoz membranlar gibi vücut yüzeylerinde çalışırlar. Örneğin, deri mikroorganizmalar için fiziksel bir engel oluşturur. Asıl işlevleri sindirim olan mide asidi, safra tuzları veya barsak peristaltığı, bir çok patojenin sindirim mukozasına yerleşmesini ve vücuda girmesini engeller.

Nonspesifik Bağışıklık

Doğal savunma engellerini aşabilen patojenler vücuda girdiklerinde, çeşitli savunma hücreleri ve moleküllerle karşılaşılır. İmmun sistemin birer parçası olarak kabul edilen bu unsurlar, mikroorganizmalar arasında ayırım yapmaz, yani patojenin tipine özel bir yanıt oluşturmazlar. Vücut savunmasındaki bu aşamaya *doğal bağışıklık (innate immunity)* veya *nonspesifik bağışıklık* denir. Bu işlevi yürüten hücre ve moleküller genellikle vücut içinde, kanda ve dokularda bulunur. Örneğin, fagositik hücrelerden makrofajlar, dokulara giren patojenleri yutarak uzaklaştırır; komplement sistemi bakterileri parçalar.

Nonspesifik: Birşeye özel veya özgü olmayan.

Spesifik Bağışıklık

İmmun yanıt ile ortaya çıkan ve bağışıklık teriminin anlamını tam olarak karşılayan savunma şekli spesifik bağışıklıktır. Bu bağışıklık şekli, doğal veya nonspesifik savunmanın aksine, vücutta hazır olarak bulunmayıp, belirli uyarım ve reaksiyonlardan sonra kazanıldığı için *kazanılmış bağışıklık* veya *edinsel bağışıklık* olarak da tanımlanır. Kazanılmış bağışıklığın en önemli unsuru lenfositlerdir ve lenfositleri spesifik olarak uyaran maddelere *antijen* denir. Spesifik immün yanıt, bir antijenin kendine spesifik lenfositleri uyarması ile başlar. Bu lenfositlerin çalışması sonucunda da o antijene karşı bağışıklık kazanılır. Kazanılmış bağışıklık, antijen tipine, çalışan immün sistem öğelerine ve sonuçlarına göre iki şekilde ortaya çıkar. *Humoral bağışıklık*, antijenlerin B lenfositlerini uyarması ve antikor üretimi ile sonuçlanan *humoral immün yanıt* sonrasında kazanılır. Bu bağışıklık şeklindeki savunma aracı antikorlardır. *Hücrel bağışıklık*, antijenlerin T lenfositlerini uyarması ile ortaya çıkan *hücrel immün yanıt* sonrasında kazanılır. Bu bağışıklık şeklinde savunma aracı sitotoksik T lenfositleridir.

SIRA SİZDE



Bağışıklığın yaşam için önemini göstermek için hangi olayları incelemek gerekir ve nasıl bir sonuca varılır?

Spesifik İmmün Yanıtın Temel Özellikleri

Antijenlere karşı oluşan humoral ve hücrel immün yanıtın tipik özellikleri vardır. Bu özellikler, lenfositler ile ilişkilidir, spesifik immün yanıtı nonspesifik savunmadan ayırır ve vücudun diğer tüm sistemleri arasında eşsiz kılar.

Spesifite: İmmün yanıt antijene spesifiktir. Diğer bir deyişle, birçok farklı antijenik yapının her birine karşı vücutta özel bir lenfosit soyu vardır ve bağışıklık bu lenfosit soylarının çalışması ile kazanılır.

Bellek: Bir antijenle bir kez karşılaşan immün sistem, daha sonraki girişlerinde aynı antijeni tanıma yeteneği sahiptir. Böylece, bir antijenin vücuda ikinci kez veya daha sonraki girişlerinde, genellikle daha hızlı, daha spesifik ve daha güçlü bir immün yanıt oluşur. Spesifik bağışıklığın bu özelliğine *immünojenik bellek* denir.

Self tolerans: İmmün sistem yabancı antijenlerin tümüne karşı immün yanıt oluşturabilirken, vücudun kendine has yapılarına (self antijen) karşı immün yanıt oluşturmaz. Diğer bir deyişle immün sistem yabancı antijenler ile self antijenleri ayırt edebilir. Bu duruma *self tolerans* denir.

Self: Kendine ait olan, yabancı olmayan.

Bağışıklık Kazanma Yolları

Aşağıdaki tanımlarda geçen aktif sözcüğü, immun sistemin bizzat çalışması ile bağışıklığın kazanıldığını, pasif sözcüğü immun sistemin aktif olarak çalışmadan bağışıklığın kazanıldığını, doğal sözcüğü bu olayın doğal koşullarda gerçekleştiğini, yapay sözcüğü ise antijenin insan eliyle verildiğini göstermektedir. Buna göre bağışıklık 4 yolla kazanılabilir. *Doğal aktif bağışıklık*, patojen veya antijenle doğal olarak karşılaşan immun sistemin verdiği yanıt ile, diğer bir deyişle infeksiyonlar sırasında kazanılan bağışıklıktır. *Yapay aktif bağışıklık*, aşılama (immunizasyon) yoluyla kazanılan bağışıklıktır. *Doğal pasif bağışıklık*, fetusa veya yavruya anneden geçen bağışıklıktır. *Yapay pasif bağışıklık*, antiserum (hiperimmun serum) uygulaması yoluyla kazanılan bağışıklıktır.

ANTİJEN

İmmun yanıtı uyaran ve oluşan bağışıklık öğeleri ile spesifik reaksiyon veren maddelere *antijen veya immunojen* denir. Bunlar, spesifik bir yanıt oluşturmak üzere lenfositleri uyaraabilen maddelerdir. Bir maddenin antijen olarak nitelenebilmesi için bazı özellikleri taşıması gerekir. Bu özellikler aynı zamanda o maddenin **anti-jenitesini** belirler. Antijenite göreceli bir kavramdır ve bazı maddeler daha çok, bazıları daha az antijenik olabilir.

Antijenite: Bir maddenin bağışıklığı uyarma kapasitesi veya gücünün niteliksel ifadesidir.

Antijenitenin Koşulları

Bir maddenin antijen olarak nitelenebilmesi için en önemli koşul “vücuda yabancılık” tır. Normal koşullarda, immun sistem kendi vücuduna ait olan (self) ile, kendinden olmayanı (nonself) ayırt edebilir ve kendi hücre veya moleküllerine karşı bir immun yanıt oluşturmaz (self tolerans). Bir maddenin antijenik olabilmesi, diğer bir deyişle immun yanıt oluşturabilmesi için, o hayvanın yapısında bulunmaması ve immun sistemi tarafından yabancı olarak algılanması gerekir. Bu açıdan bakıldığında virüslardan memelilere, bakterilerden bitkilere kadar tüm canlılara ait hücrelerin ve bunlara ait moleküllerin diğer hayvanlar için antijenik olduğu söylenebilir.

Bir maddenin vücuda yabancı olması, onun antijen olarak tanınması için yeterli değildir. Örneğin; petrol ürünleri vücuda yabancıdır, ama immun yanıt uyarmazlar. Bunun nedeni moleküler yapının uygun olmamasıdır. Bir molekülün yapısı, çözünürlüğü ve dayanıklılığı gibi özellikleri, o molekülün immun sistem ile karşılaştığında nasıl algılanacağını belirler. Antijenite ile ilgili yapısal özelliklerden biri “molekül ağırlığı”dır. Genel olarak, 10.000 Dalton (10 kDa) büyük moleküllerin antijenik özellik taşıdığı ve molekül ağırlık ile antijenik güç arasında doğru orantı olduğu kabul edilmektedir. Ancak, molekül ağırlığı da tek başına antijenite için yeterli bir koşul değildir; büyük olmasına rağmen antijenik olmayan maddeler vardır. Bu bakımdan, molekül ağırlığı yanında molekülün “kompleks yapı”da olması da gereklidir. Kompleks yapı ile kastedilen, kimyasal içeriğinin (primer yapı) çeşitlilik göstermesi ve fiziksel yapısının (sekonder ve tersiyer yapı) uygun olmasıdır. Çoğu doğal proteinlerin iyi antijen olmalarının asıl nedeni, kompleks bir yapıya sahip olmalarıdır. Proteinlerin kimyasal yapılarında 18-20 amino asit bulunur ve bunların çoğu molekül içinde çok farklı sıralarda dizilebilirler (primer yapı). Farklı aminoasit dizileri, ikinci boyutta farklı açılarda birleşebilirler (sekonder yapı). Farklı açılarda birleşen diziler zincir içi bağlar kurarak, üçüncü boyutta çok farklı fiziki şekillere sahip moleküller oluşturabilirler (tersiyer yapı).

Vücuda giren bir maddenin immun sistem ile ilişki kurabilmesi için, genellikle belirli bir düzeye indirgenmesi gerekir. Buna karşın, vücuda giren bir maddenin immun sistemin ilişki kurabileceği bir düzeyin altına da indirgenmemesi gereklidir. Eğer madde en küçük yapı taşlarına kadar parçalanırsa antijenik özelliğini kaybeder. Görüldüğü gibi, bir maddenin iyi bir antijen olabilmesi için, çözünürlüğü ile dayanıklılığının dengede olması gereklidir.

Bir maddenin antijenitesini belirleyen zorunlu koşullar dışında, antijen veya konak ile ilgili bazı faktörler de immun yanıt üzerinde etkili olabilmektedir. Örneğin; bazı antijenler vücuda parenteral yolla verildiklerinde immun yanıt oluştururken, ağız yoluyla girdiklerinde antijenik etki göstermezler. Çok düşük dozdaki antijenler etkili bir immun yanıt oluşturmazlar. Çok yüksek dozdaki antijenler de immun sistemi baskılayarak immunolojik yanıtızsızlığa yol açabilirler. Ayrıca, bazı hayvan türleri arasında bir maddenin antijenik olarak algılanması bakımından farklılıklar olabilir. Örneğin, köpekte bağışıklığı uyaran güçlü bir antijen sığır için antijenik olmayabilir veya zayıf antijenik olabilir.

Antijenik Determinant

Kimyasal yapılarına göre başlıca temel antijen grupları, proteinler, karbonhidratlar, lipidler ve nükleik asitlerdir. Bu kimyasal gruplar tek başlarına bulunabildikleri gibi, diğer gruplarla bir araya gelerek glikoprotein, lipoprotein, nükleoprotein ve glikolipid moleküllerini oluşturabilirler. İnfeksiyon oluşturan mikroorganizmalar, bu kimyasal grupların tümünü barındıran kompleks yapılardır. Bu yüzden, böyle bir yabancı yapıya karşı oluşacak immun yanıtta, kompleksdeki antijenlerden her birine karşı ayrı ayrı immun yanıt oluşması söz konusu olacaktır. Bir bakterideki büyük bir protein molekülünü örnek olarak incelersek; immun sistemin molekülün tamamı ile değil, çok daha küçük bölgeleri ile ilişki kurduğunu görebiliriz. Diğer bir deyişle, immun yanıt molekülün tümüne karşı değil, bu özel bölgelere karşı oluşmaktadır. İşte, antijenik bir molekülde, immun sistem tarafından tanınıp spesifik immun yanıt oluşturulan özel bölgelere, *antijenik determinant* veya *epitop* denir. Antijenik determinantlar yaklaşık 4-8 amino asitten ibaret bölgelerdir ve molekülün yaklaşık her 5.000 Da ağırlığı için bir adet bulunurlar. Kompleks bir molekülde birbirinden farklı birçok epitop bulunabilir. İmmun sistem farklı epitopların her birini ayrı ayrı algılar ve her birine spesifik yanıt oluşturur. O halde, bir bakterinin immun sistem ile teması halinde, bakteri tek bir antijen olarak değil, çok sayıda antijenik determinant olarak algılanacaktır.

SIRA SİZDE



Büyük ve kompleks moleküllerin iyi antijen olması ile antijenik determinant arasında nasıl bir ilişki vardır?

Bazen farklı moleküller ortak epitoplara sahip olabilirler veya farklı iki organizmada aynı antijen molekülü bulunabilir. Bu durumda, bir antijene karşı oluşan antikor, zayıf da olsa diğer antijene bağlanabilir. Bu olaya antijenik *çapraz reaksiyon* (*kros reaksiyon*) denir. Örneğin; birçok barsak bakterisinde bulunan glikoprotein, bazı memeli eritrositleri üzerinde de bulunabilir. Bunun sonucunda, bakteri glikoproteinine karşı oluşan antikor, eritrosit glikoproteinine de reaksiyona girer. Böyle antijenlere, *heterofil antijen* de denir. Antijenik çapraz reaksiyon, infeksiyonların tanısında kullanılan serolojik testlerin yorumlanmasını güçleştirebilir.

ANTİKOR

Humoral bağışıklıkta B lenfositlerinin antijene yanıtı sonucu oluşan ve bu antijen ile spesifik olarak birleşebilen bağışıklık elemanlarına “antikor” denir. Antikor yapısındaki moleküller, B lenfositleri üzerinde “B hücre reseptörü” (BCR) olarak, kanda ve diğer vücut sıvılarında “serbest antikorlar” olarak bulunurlar. Her iki form da sadece belli bir antijen ile spesifik olarak reaksiyona girme özelliğindedir. B hücre reseptörleri antijenlerin B hücreleri tarafından tanınmasını ve hücrelerin aktive olmasını sağlarken, aktive olan hücrelerden salınan antikorlar antijenleri bağlar ve diğer efektör mekanizmalarla bunların tahribini sağlar.

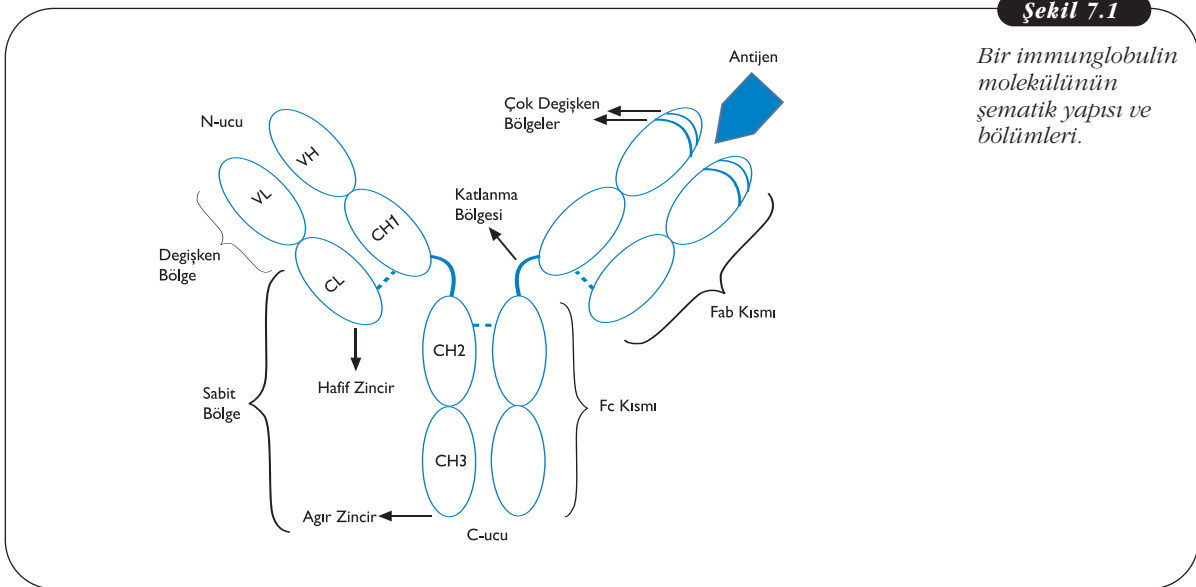
Bağışıklığın yapısal unsurları ile ilgili çok sayıda resim ve animasyona, arama motorlarında “antigen”, “antibody” ve “immune system” sözcükleri ile yapacağınız tarama ile ulaşabilirsiniz.



İNTERNET

İmmunglobulin Molekülü

Antikorlar temel kimyasal yapı olarak globulinler içinde yer aldıklarından ve işlevsel açıdan immunité ile ilişkili olduklarından, moleküler yapıları *immunglobulin* şeklinde ifade edilir. İmmunglobulin molekülünün temel birimi 4 polipeptid zincirinden oluşmuştur. Bu temel birim içinde, aynı yapıya sahip simetrik iki ağır zincir (H) ve aynı yapıya sahip simetrik iki hafif zincir (L) bulunur. Ağır zincirlerin herbiri 450-500, hafif zincirlerin herbiri yaklaşık 220 amino asitten oluşmuştur. Bu zincirler disülfid bağları ile birbirine bağlanarak, moleküle “Y” harfi şeklinde bir görünüm kazandırır. Herbir zincirin bir ucu karboksil grubu ile sonlanırken (C-ucu), diğer ucu amino grubu ile sonlanır (N-ucu). Herbir immunglobulin zinciri, ilmek şeklinde organize olmuştur, ayrıca sabit ve değişken bölgeler içerir (Şekil 7.1).



Polipeptid zincirindeki amino asitler, üç boyutlu uzayda bir çubuk gibi düz bir şekilde değil, belli bölgelerde katlanarak bir yumak şeklinde dizilmiştir. Moleküle tersiyer yapı kazandıran bu bölgelere *ilmek bölgeleri* denir. Hafif zincirdeki ilmek bölgeleri iki tanedir; N-uçtaki değişken hafif bölge (VL bölgesi) ve C-uçtaki sabit

hafif bölge (CL bölgesi). Ağır zincirde ise, N-uçtan başlayan bir değişken ağır bölge (VH bölgesi) ve bunu C-uca doğru izleyen sabit ağır bölge ilmekleri (CH1, CH2, CH3 bölgeleri) vardır.

Ağır zincirde CH1 ve CH2 ilmekleri arasında bulunan bölüme *katlanma bölgesi* denir. Katlanma bölgesi molekülün N-uçlarının (Y harfinin kolları) kanat gibi hareketli olmasını sağlar. İmmunglobulin molekülü papain enzimi ile muamele edildiğinde üç parçaya ayrılır; Y harfinin birer kolu gibi düşünebileceğimiz iki *Fab kısmı* (antijen bağlayan fragman) ve Y harfinin sapı gibi düşünebileceğimiz bir *Fc kısmı* (kristalize olan fragman). Bu kısımlar immunglobulinin fonksiyonları ile yakından ilişkilidir. Adından da anlaşılacağı gibi Fab kısmı antijenle bağlanmayı sağlayan bölgeleri içerir, yani molekülün immunolojik fonksiyonu ile ilgilidir. Fc kısmı ise immunglobulinin hücrelere veya Fc reseptörlerine bağlanmasını sağlar, yani molekülün biyolojik fonksiyonu ile ilgilidir.

İmmunglobulin molekülündeki hafif zincirin C-ucundaki ilmek bölgesinin (CL) ve C-ucundan başlayan CH3, CH2 ve CH1 ilmek bölgelerinin yapısı her bir immunglobulin sınıfı için sabittir veya çok az farklılık gösterir. Bu nedenle bunlara *sabit bölge* denir. Ağır zincir sabit bölgesinin amino asit yapısı o immunglobulin molekülünün hangi sınıfa ait olduğunu gösterir. Bu bölge aynı zamanda Fc kısmını da içine alır ve molekülün hücre veya reseptörlere bağlanmasını sağlar.

İmmunglobulin molekülündeki tüm zincirlerin N-ucundaki ilmek bölgelerine *değişken bölge* denir. Bu ilmeklere değişken bölge denmesinin nedeni, buradaki amino asit dizilişlerinin ve tersiyer yapının, farklı antijenlere spesifik antikordarda çok farklılık göstermesidir. Çünkü değişken bölgeler, immunglobulin molekülünün antijenle temas kurduğu kısımlardır. Bu yüzden her bir farklı antijene karşı, farklı bir değişken bölge ve dolayısıyla farklı bir antikor olacaktır. Bu bölgenin değişken yapısı, sabit bölgenin sabit yapısını etkilemez. Daha bir deyişle, tek bir antijene spesifik değişken bölge, farklı immunglobulin sınıflarında ortak olarak bulunur. Örneğin; belli bir bakteri antijenine karşı oluşan IgG, IgM, IgA ve IgE sınıfı immunglobulinlerin tümünde değişken bölge aynı yapıdadır.

Değişken bölgenin belirli kısımlarında, antijen bağlanma bölgesinin şeklini veren ve antijenle asıl teması kuran *çok değişken bölgeler* vardır. Değişken bölge, antijene bir bütün olarak değil, sadece bu çok değişken bölgelerden bağlanır. Değişken bölge içindeki bu çok değişken bölgelere *paratop* veya *CDR* (karşıtlığı belirleyen bölgeler) adı verilir. Bu çok değişken kısımlar antijene bağlanacak bölgenin şeklini, dolayısıyla bir immunglobulin molekülünün hangi epitopa dolayısıyla antijene bağlanacağını belirler. Bir anahtar-kilit ilişkisi gibi, bir antijen molekülündeki epitopların oluşturduğu girintili-çıkıntılı eşsiz bir yapıya karşı, değişken bölgede de CDR'lerin oluşturduğu girintili çıkıntılı spesifik bir kalıp olacaktır. Bu yüzden de, ne kadar çok antijen varsa o kadar çok değişken bölge var demektir.

SIRA SİZDE

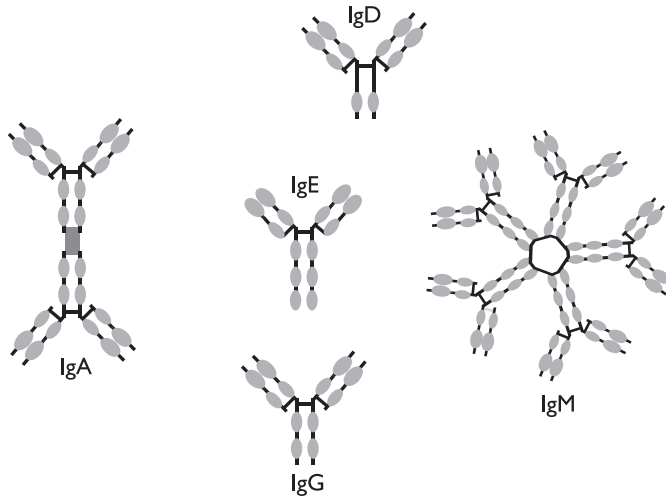


Antijenin epitopu ile antikorun paratopu arasında çok spesifik bir reaksiyon olduğuna göre, bunun ne tip bağlarla gerçekleştiğini düşünürsünüz?

İmmunglobulin Sınıfları

Ağır zincir sabit bölgesindeki (CH) amino asit yapısına göre 5 temel ağır zincir tipi vardır: gama, mü, alfa, delta ve epsilon. Ağır zincirin tipi, immunglobulinin sınıfını belirler. Böylece, gama, mü, alfa, delta ve epsilon tipi zincir taşıyan immunglobulinlere sırasıyla IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE adı verilir. Her bir sınıfın alt sınıfları ise rakamla gösterilir (IgG4, IgA2, IgE1 gibi) (Şekil 7.2).

Şekil 7.2



Temel immunglobulin sınıflarının şematik yapıları. IgG, IgE ve IgD monomer, IgA dimer, IgM pentamer formunda gösterilmiştir.

İmmunglobulin G (IgG): IgG kanda en yüksek konsantrasyonda (%70-80) bulunan immunglobulin sınıfıdır. İki ağır ve iki hafif zincirden oluşmuş tipik **monomer** yapısındadır. IgG sekonder lenfoid organlardaki B lenfositleri ve plazma hücreleri tarafından üretilir ve salgılanır. En küçük immunglobulin sınıfı olduğu için diğer Ig sınıflarına göre damar çeperinden ve plasentadan daha kolay geçer. Bu nedenle doku sıvılarındaki ve bazı mukozal yüzeylerdeki bağışıklık olaylarına da katılır. IgG en yoğun olarak sekonder immun yanıt sırasında üretilir. IgG'nin en önemli işlevi, nötralizasyon yoluyla patojenleri ve toksinleri etkisiz hale getirmesidir. Bu işlevini, başta kan olmak üzere, doku sıvılarında, vücut salgılarında ve bazı mukozal yüzeylerde gerçekleştirebilir. IgG'nin tüm hayvan türlerinde bulunur ve 3-6 alt sınıfı vardır. Bir immun yanıt sırasında, tüm IgG alt sınıflarının üretilme potansiyeli olmasına rağmen, genellikle belli bir antijene karşı belli bir IgG alt sınıfı daha çok oluşur. At IgG3'ü IgG[T], tavuk IgG'si IgY olarak da gösterilebilmektedir.

Monomer: Tek birimden oluşmuş temel yapı.

İmmunglobulin M (IgM): IgM kanda ikinci yüksek konsantrasyonda (%5-15) bulunan immunglobulin sınıfıdır. İki ağır ve iki hafif zincirden oluşmuş monomer yapıdaki IgM, sadece B hücreleri üzerinde "B hücre reseptörü" (BCR) olarak bulunur ve ortama salınmaz. IgM kanda, 5 IgM monomerinin dairesel tarzda birleşmesinden oluşan **pentamer** şeklinde bulunur. IgM sekonder lenfoid organlardaki B lenfositleri ve plazma hücreleri tarafından üretilir ve salgılanır. En büyük immunglobulin sınıfı olduğu için damar çeperinden ve plasentadan geçemez. Bu nedenle başlıca çalışma alanı kandır. IgM'nin fonksiyonları IgG'ye benzer. IgM nispeten az miktarda üretilmesine rağmen, 5 antijen bağlama ucuna sahip olduğu için nötralizasyonu IgG'ye göre daha etkili şekilde gerçekleştirir. IgM primer immun yanıt sırasında ilk oluşturulan immunglobulin sınıfıdır ve en yüksek konsantrasyonuna primer immun yanıt sırasında ulaşır. Sekonder immun yanıtta IgM'nin yerini IgG alır. Ancak, proteinler dışındaki bazı antijenlere (T-bağımsız antijen) karşı sadece IgM sınıfı antikorlar üretilir. IgM tüm hayvan türlerinde bulunur ancak hiçbirinde alt sınıflara ayrılmaz.

Pentamer: Beş birimden (5 monomerden) oluşmuş yapı.

İmmunglobulin A (IgA): IgA kanda düşük konsantrasyonda bulunan ve çoğunluğu mukozal yüzeylere salınan bir immunglobulin sınıfıdır. İki ağır ve iki hafif zincirden oluşmuş monomer yapısı sadece kanda çok düşük düzeyde, iki IgA monomerinden oluşan dimerik formu mukozal yüzeylerde yüksek düzeyde bulunur. IgA, mukozadaki bölgesel lenfoid dokularda ve derideki plazma hücreleri tarafından üretilir; dimer şeklini bu hücrelerde alır. Dimerik IgA mukozadaki epitel hücrelerine geçer, moleküle burada salgısal parça bağlanır ve mukozal boşluklara bırakılırlar. Salgısal parça içeren ve mukozal yüzeylerde bulunan bu forma salgısal IgA (sIgA) denir. Salgısal parça, molekülün mukozalardaki enzimler tarafından parçalanmasını önler. sIgA mukozal yüzeylerdeki mikroorganizmaları ve toksinleri nötralize ederek bunların hücrelere tutunmalarını engeller. Böylece, birçok patojen mukoz membranlardan vücuda giremez. sIgA, sindirim kanalı, solunum yolları, genital kanallar, meme ve göz mukozalarının tümünde fonksiyon görür. Hayvanlar türlerinin tümünde IgA bulunur, ama sadece koyunlarda iki alt sınıfı vardır.

İmmunglobulin E (IgE): IgE kanda en düşük konsantrasyonda (%0.005-2) bulunan immunglobulin sınıfıdır. İki ağır ve iki hafif zincirden oluşmuş tipik monomer yapısındadır. IgE yüzeysel lenfoid dokudaki plazma hücreleri tarafından üretilir ve salınır. Diğer immunglobulin sınıflarının yürüttüğü antimikrobiyal görevleri etkili bir şekilde gerçekleştiremez. Ancak, parazitlere karşı ve allerjik reaksiyonlarda görev alan en önemli immunglobulin sınıfıdır. Paraziter veya allerjik hastalıklarda konsantrasyonu belirgin şekilde artar. IgE'nin önemli bir özelliği, özel reseptörler bulduran mast hücrelerine ve bazofillere bağlanabilmesidir. Kanatlılar dışında tüm evcil hayvanlarda IgE bulunur, ancak sadece köpek IgE'sinin iki alt sınıfı vardır.

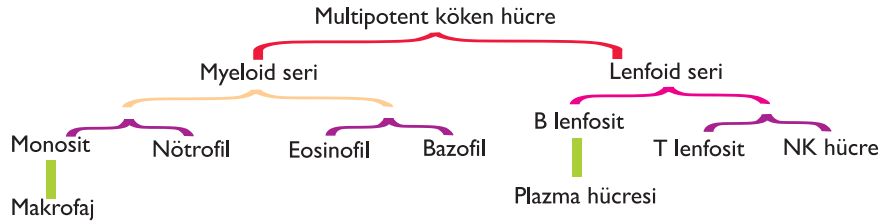
İmmunglobulin D (IgD): IgD, sadece B lenfositleri üzerinde bulunan bir immunglobulin sınıfıdır ve vücutta serbest olarak bulunmaz. IgD'nin başlıca fonksiyonu, B hücreleri üzerinde antijen reseptörü (BCR) olarak çalışmaktır. IgD kanatlı ve kedi dışındaki tüm evcil hayvanlarda bulunmuştur ve alt sınıfları yoktur.

İMMUN SİSTEM HÜCRELERİ

Vücut savunması ile direk veya dolaylı ilişkili hücrelerin tümü, immunolojik açıdan "immün sistem hücreleri" olarak nitelenebilir. Tüm immün sistem hücreleri multipotent köken (stem) hücrelerinden gelişir. Bu hücreler iki farklı yol izleyerek değişime uğrar ve mevcut tüm immün sistem hücrelerini oluştururlar. Myeloid seriden gelişen hücreler fagositik hücreleri ve diğer hücre tiplerini, lenfoid seriden gelişen hücreler lenfositleri oluşturur.

Şekil 7.3

Kemik iliği köken hücrelerinin immün sistem hücrelerine dağılımı.



Myeloid Seri Hücreleri

Bu seriye **polimorfnükleer hücre** grubundan nötrofiller, eozinofiller ve bazofiller, **mononükleer hücre** grubundan makrofajlar ve mast hücreleri girer. Polimorfnükleer hücrelerin ortak özellikleri, segmentli ve düzensiz bir çekirdeğe sahip olmaları ve sitoplazmalarında granül taşımalarıdır. Bu yüzden *granülosit* olarak adlandırılırlar.

Nötrofiller: Polimorfnükleer nötrofil lökositler veya kısaca nötrofiller, myeloid serinin en yoğun hücre tipidir. Kanda bulduklarında 10-12 µm çapında küresel hücrelerdir, ancak doku aralarında ve özellikle damardan dışarı çıkarken amip-si bir şekil alabilirler. Genellikle 3 lobtan oluşmuş, segmentli bir çekirdeğe sahiptirler. Nötrofillerin sitoplazması asidik veya bazik boyalarla boyanmayan ince granüllerle doludur. Bu granüller mikroorganizmaları parçalamaya yarayan enzimler yönünden zengindir. Nötrofiller kemik iliğinde oluşturulduktan sonra kana geçer ve kanda 12 saat dolaşarak dokulara göç ederler. Toplam yaşam süreleri birkaç gündür. Çeşitli hayvan türlerinde değişik oranlarda bulunurlar; karnivorlarda kan lökositlerinin %60-75'i, atlarda %50'si, ruminantlarda %20-30'u nötrofildir. Nötrofillerin en önemli görevi yabancı maddeleri, fagositoz denen olay vasıtasıyla yutmak ve parçalamaktır. Nötrofiller fagositoz olayını hızlı ve etkili bir şekilde gerçekleştirirler. Vücuda giren yabancı maddelere, özellikle mikroorganizmalara ilk ve en çabuk müdahale eden hücreler nötrofillerdir. Bu yüzden, vücudun ilk savunma hattı olarak kabul edilirler. Nötrofiller ayrıca, salgıladıkları çeşitli maddeler vasıtasıyla yangı olayının gelişiminde de rol oynarlar.

Eozinofiller: Sitoplazmik granülleri, asidik bir boya olan eosin ile boyandığından bu adı almışlardır. Nötrofillerden biraz daha büyük olan eozinofiller 12-14 µm çapındadır ve 2 loblu bir çekirdeğe sahiptir. Eozinofiller kemik iliğinde oluşturulduktan sonra, tam olgunlaşmamış halde direkt olarak dalağa taşınır ve burada olgunlaşırlar. Dalaktan ayrıldıktan sonra kanda çok kısa süre dolaşır ve özellikle deri ve mukozal bölgelere yerleşirler. Kandaki yarı ömürleri 30 dakika, dokulardaki yarı ömürleri 12 gündür. Kan lökositleri içindeki oranları hayvan türüne ve bazı hastalık durumlarına göre değişir. Normal köpeklerde %2 olan bu oran, sığırlarda %10'a kadar çıkabilir. Eozinofillerin sahip oldukları enzimler parazitlere karşı daha etkilidir. Bu yüzden eozinofiller parazitlere karşı savunmada özel rol oynarlar. Eozinofiller ayrıca, salgıladıkları çeşitli maddeler vasıtasıyla yangı olayının gelişiminde de rol oynarlar.

Bazofiller: Polimorfnükleer granülositler içinde en az bulunan hücre tipi bazofillerdir. Sitoplazmik granülleri, hemotoksilen adlı bazofilik boya ile boyandığından bu adı almışlardır. Kan lökositleri içindeki oranları yaklaşık %0.5'tir. Nötrofillerden biraz daha büyük olan bazofiller 10-14 µm çapındadır. Normalde damar dışında bulunmazlar, ancak damarlardan dokulara sızabilir ve yangı olayına katılabilirler. Bazofillerin fagositik yetenekleri yoktur.

Mononükleer Fagositik Sistem Hücreleri

Mononükleer fagositik sistem, ortak olarak *makrofaj* adı verilen hücreleri kapsar. Bu sistemin tüm hücreleri, myeloid seriden köken alır. Kemik iliğinden ayrılarak kana geçen hücreler *monosit* adını alır ve dolaşımında yaklaşık 3 gün kalırlar (kandaki lökositlerin %5'i monositir). Bu sürenin sonunda kandan dokulara göç eden hücreler olgun makrofaj halini alırlar. Sıvı içindeki makrofajlar 15 µm çaplı bir küre şeklindedirler. Tek parçalı fasulye şeklinde bir çekirdeğe sahiptirler. Makrofajlar benzer hücre organellerine, ortak fonksiyonlara ve tek bir kökene sahip olmaları-

na karşın, vücutta değişik dokulara dağıldıklarında farklı şekiller ve isimler alırlar. Makrofajlar buldukları ortama veya fonksiyonlarına göre gruplandırılabilirler.

Doku yerleşik makrofajlar, bağ dokuda “histiosit”, beyinde “mikroglia” ve böbrekte “mezangial hücre” olarak bulunurlar. Bu hücreler buldukları organın asıl hücrelerinin şeklini almışlardır. *Sinus yerleşik makrofajlar*, süngerimsi yapıya sahip dalak, lenf nodülü, kemik iliği ve karaciğer gibi organların sinusları boyunca yerleşmişlerdir. Dalak ve lenf nodülü makrofajları özel bir isim almazken, karaciğerde bulunanlara “Kupffer hücreleri”, kemik iliğinde bulunanlara “osteoklast” adı verilir. *Serbest makrofajlar* herhangi bir doku içine yerleşmemiş, vücut boşluklarında veya serozal yüzeylerde bağımsız olarak bulunan hücrelerdir. Akciğer alveollerinde bulunanlara “alveolar makrofaj”, periton boşluğunda bulunanlara “peritoneal makrofaj” adı verilir. Serozal boşluklarda bulunan hücrelerin tümü için “serozal makrofaj” genellemesi de yapılabilir. *Antijen sunan hücreler*, makrofajların antijen sunma işinde uzmanlaşmış formlarıdır. Antijen sunma işi için özelleşmiş mononükleer seri hücrelerine “dendritik hücre” denir. Bu hücrelerin deride bulunanlarına “Langerhans hücreleri”, lenfoid dokuda bulunanlarına “foliküler dendritik hücre” ve “interdijital dendritik hücre” gibi özel adlar verilir. “Epiteloid hücre” ve “dev hücreleri” dokularda bulunan makrofajlar özel koşullarda yanyana dizilerek oluşturdukları formlardır.

Makrofajlar nispeten uzun ömürlü (ortalama 100 gün) hücrelerdir. Normal koşullarda bir günde, vücuttaki makrofajların %1’i yenilenir. Makrofajlar, herbiri immun sistemin çalışabilmesi için çok gerekli olan çeşitli fonksiyonlara sahiptirler. Vücuda giren mikroorganizmaları fagosite ederek parçalarlar. Her türlü yabancı partikül yanında, vücudun ölü, hasarlı hücrelerini ve hücre artıklarını yutarak vücuttan uzaklaştırmaya çalışırlar. Makrofajlar, nötrofillerden daha geç fagositoza başlamalarına karşın, ömürleri boyunca sürekli fagositoz yapabilirler. Fagositoz olayının bir devamı olarak, vücuda ilk kez giren yabancı maddeleri hücre içinde işleyerek (antijen işleme), immun sisteme sunarlar (antijen sunma). Makrofajlar, immun yanıtın çeşitli aşamalarında görev alan 100’den fazla protein sentezlerler. Makrofajlar, yara iyileşmesi için de gerekli hücrelerdir.

SIRA SİZDE

4

Tüm immun sistem hücreleri aynı kökenden gelmelerine rağmen çok çeşitli ve farklı fonksiyonları yürütebilirler. Bunu nasıl açıklarsınız?

Lenfoid Seri Hücreleri

Lenfoid stem hücrelerinin geçirdiği çeşitli aşamalardan sonra lenfoid seriye ait lenfositler ve doğal öldürücü (NK) hücreler oluşturulur. Lenfositler antijenleri tanıyan ve bağışıklığı sağlayan gerçek immun sistem hücreleridir. Bağışıklık kavramına anlam kazandıran ve eşsiz yapan üç temel özelliği (spesifite, bellek ve tolerans) lenfositler sağlar. Başta lenfoid organlar olmak üzere vücudun çeşitli organlarında yerleşmişlerdir. Lenfositlerin temel morfolojik özellikleri birbirine benzer. Tüm lenfositler 7-15 µm çapında küresel hücrelerdir. Her türlü boya ile boyanabilen yuvarlak şekilli ve hücrenin çoğunu kaplayan bir çekirdeğe sahiptirler. İmmun yanıtın birçok değişik formunu gerçekleştiren lenfositlerin çeşitli tipleri ve alt tipleri vardır. Bu lenfosit tipleri, yüzey moleküllerine göre detaylı olarak ayırt edilebilir. Bir lenfositin yüzeyindeki moleküllerin formülü, o hücrenin hangi lenfosit tipi olduğunu dolayısıyla hangi işi yaptığını gösterir. İki temel lenfosit tipi, B hücreleri ve T hücreleridir.

B Lenfositleri

B lenfositleri humoral immun yanıtın, diğer bir deyişle antikor oluşumundan sorumlu hücrelerdir. Kemik iliği lenfoid seriden köken alıp kanatlılarda bursa Fabricius, ruminantlarda iliosekal Peyer plakları ve diğer memelilerde kemik iliğinde olgun B lenfositlerine dönüşürler. Antijenik bir uyarım sonucunda aktive olan spesifik B lenfosit soyunun bir kısmı *plazma hücresi* haline dönüşür. Plazma hücreleri 8-9 µm çapında yumurtaya benzer şekillidir. Plazma hücreleri olgunlaştıktan sonra başta lenf nodülleri, dalak ve kemik iliği olmak üzere tüm vücuda dağılırak 3-30 gün boyunca antikor üretebilirler. Antijenik uyarımdan sonra bazı B lenfositleri plazma hücresine dönüşmez, ama uzun süre yaşama yeteneği kazanırlar. Bu hücelere *bellek B hücresi* denir.

T Lenfositleri

T lenfositleri hücrel immun yanıtın sorumlu olan ve bazı tipleri humoral immun yanıtına da katılan hücrelerdir. Kemik iliği lenfoid seriden köken alıp tüm memelilerde ve kanatlılarda timusta olgun T lenfositlerine dönüşürler. Timusu terkeden T lenfositlerinin büyük çoğunluğu lenf nodülleri, Peyer plakları ve dalakta bulunurlar. Kandaki lenfositlerin çoğu (%80'e kadar varabilir) T hücresidir. T hücreleri tüm yaşamları boyunca lenfoid organlar arasında dolaşırlar. T lenfositleri timustaki gelişimleri sırasında kazandıkları farklı yüzey moleküllerine göre farklı görevler üstlenen çeşitli tiplere ayrılırlar. Ayrıca her T lenfosit tipinin bazı hücreleri, antijenik uyarım sonunda bellek T hücrelerine dönüşür.

Yardımcı T lenfositleri: Yabancı bir antijene karşı immun yanıtı gerçekten başlatan ilk hücrelerdir. Çünkü, antijen sunan hücreler tarafından iletilen tüm antijenik bilgiler bu hücreler tarafından alınıp, diğer efektör hücelere iletilir. B lenfositleri ve diğer T lenfositleri, yardımcı T lenfositleri tarafından uyarılmadıkça protein antijenlere karşı etkili bir yanıt veremezler. Bu hücreler CD4 yüzey molekülünü taşır ve CD4 hücreler olarak da adlandırılır. Yardımcı T lenfositleri, salgıladıkları sitokinlere göre üç alt tipe (Th1, Th2, Th0) ayrılırlar.

Sitotoksik T lenfositleri: Hücrel immun yanıt olarak nitelenen olayları yürüten asıl hücreler sitotoksik T lenfositleridir. Hücre içinde yaşayabilen ve endojen antijen olarak nitelenen patojenlere karşı bağışıklığı sağlarlar. Sahip oldukları granüller içindeki enzimler, infekte hücreleri etkisiz hale getirilirler. Sitotoksik T hücreleri ayrıca, nakledilen yabancı hücelere ve kanser hücelere karşı da aynı etkiyi gösterir. Bu hücreler CD8 yüzey molekülünü taşır ve CD8 hücreler olarak da adlandırılır. Sitotoksik T hücrelerinin bir grubu baskılayıcı T lenfositleri olarak ayrılır ve vücudun kendi antijenlerine karşı yanıt vermesini engellerler.

Doğal Öldürücü Hücreler (NK Hücreler)

B ve T hücreleri dışında lenfoid seriden gelen üçüncü hücre tipi, sitotoksik özellikteki doğal öldürücü hücrelerdir (NK hücreler). Kanda bulunan lenfoid seri hücrelerinin %15'ini kapsarlar. NK hücreleri, T lenfositler ile aynı kökenden gelmelerine rağmen timusa uğramazlar ve burada değişim geçirmezler. Bu nedenle, antijen reseptörü taşımazlar; dolayısıyla antijene spesifite, bellek ve tolerans gibi temel lenfosit özelliklerine sahip değildirler. Başta tümör hücreleri olmak üzere, virüsle infekte hücreleri ve yabancı doku hücrelerini öldürürler. NK hücreleri kanda ve sekonder lenfoid organlarda bulunurlar.

İMMUN SİSTEM ORGANLARI

İmmun sistem faaliyetlerinin büyük çoğunluğu vücudun belirli organlarında yürütülür. Bağışıklık ile ilgili olayların yoğunlaştığı lenfoid organların tümü *immün sistem organları* olarak nitelenebilir. İmmun sistem organları, yapılarına ve bununla ilgili fonksiyonlarına göre iki ana grupta incelenir.

K İ T A P



İmmunolojin temel kavramları ve yapısal unsurları ile ilgili daha geniş bilgiyi resimli ansiklopedi formatında hazırlanmış olan Atlas of Immunology (1998) kitabında bulabilirsiniz.

Primer Lenfoid Organlar

Lenfositlerin gelişiminden, değişiminden ve immunité ile ilgili temel özelliklerin yüklenmesinden sorumlu organlara, *primer lenfoid organlar* veya *merkezi lenfoid organlar* denir. Primer lenfoid organların ortak özellikleri şunlardır. Yenidoğanlarda en büyük relatif hacime sahiptirler, puberteden sonra hızla küçülürler. Vücuda antijenik uyarım olmasa dahi normal gelişmelerini ve doku organizasyonlarını tamamlarlar. Yenidoğan dönemde vücuttan çıkartılmaları halinde, yürüttükleri fonksiyonlarda önemli kayıplar olur.

Timus: Timus, tüm memelilerde ve kanatlılarda T lenfositlerinin gelişimini ve değişimini sağlayan lober yapıda bir organdır. Timusun büyüklüğü, hayvanın yaşına göre önemli değişiklikler gösterir; relatif hacmi yeni doğanlarda, absolut hacmi pubertede en yüksek düzeydedir. Puberteden sonra organ küçülmeye başlar. Timusun en önemli görevi, organa niteliksiz olarak giren öncü T lenfositlerine yabancı antijenleri ayırt edebilme yeteneğini kazandırmak ve vücudun kendi yapısına karşı reaksiyon verebilecek lenfositleri ortadan kaldırmaktır.

Bursa Fabricius (Fabricius kesesi): Bursa Fabricius, sadece kanatlı hayvanlarda bulunan ve B lenfositlerinin gelişiminden sorumlu olan lober yapıda bir organdır. Tütün kesesi şeklindeki organ kloakanın dorsalinde yerleşmiştir ve bir kanalla kloakaya açılır. Bursa Fabricius yumurtadan çıkan civcivde en büyük relatif hacme sahiptir. Bir-iki haftalık civcivlerde en yüksek absolut hacmine ulaşır ve bundan sonra hızla küçülür. Erişkin kanatlıların çoğunda gözle görülemez. Bursa Fabricius'daki hücrelerin %90'dan fazlası B lenfositidir. Timustaki T lenfosit olgunlaşmasına benzer şekilde, kemik iliğinden köken alan öncü B hücreleri bursa Fabriciusda çoğalır, değişime uğrar ve olgun B lenfositleri haline geçer. Yabancı antijenlere yanıt verecek B lenfositlerinin çoğalması desteklenirken, vücudun kendi antijenlerine karşı yanıt oluşturacak B lenfositleri öldürülür.

Kemik iliği: Kemik iliği bütün memelilerde multipotent köken hücrelerinin kaynağıdır. Kemik iliği, aynı zamanda B lenfositlerinin değişimini sağlaması nedeniyle ruminantlar dışındaki çoğu memelide primer lenfoid organ olarak da nitelenir. Diğer bir deyişle, kemik iliği kanatlılardaki bursa Fabricius'un ruminant dışındaki memelilerdeki karşılığıdır ve çalışma prensibi aynıdır.

İleo-Sekal Peyer Plakları: Ruminantlarda, B lenfositlerinin değişimini ve olgunlaşmasını sağlayan primer lenfoid organdır. Diğer bir deyişle, kanatlılardaki bursa Fabricius'un karşılığıdır ve çalışma prensibi aynıdır. İleo-sekal Peyer plakları, maksimum boyutlarına doğumdan önceki fetal dönemde ulaşır, doğumdan sonra küçülerek 15. ayda görünmez hale gelirler. İleo-sekal Peyer plakları, sadece B lenfositleri içeren lenfoid foliküllerden ibarettir. Altı haftalık bir kuzuda ilio-sekal Peyer plakları vücuttaki en büyük lenfoid dokudur.

Sekonder Lenfoid Organlar

Antijene karşı immun yanıtın geliştirilmesinden sorumlu olan ve bunun için uygun ortam sağlayan organlara *sekonder lenfoid organlar* veya *periferal lenfoid organlar* denir. Sekonder lenfoid organların ortak özellikleri şunlardır. Organların gelişimi, normal vücut gelişimi ile paralel yürür, en büyük hacimlerine erişkin dönemde ulaşırlar. Vücuda antijenik uyarım olmadığında normal gelişmelerini ve doku organizasyonlarını tamamlayamazlar. Neonatal dönemde vücuttan çıkartılmaları halinde, yürüttükleri fonksiyonlarda önemli kayıplar olmaz.

Lenf nodülleri: Lenf nodülleri, yuvarlak veya fasulye şeklinde yapılardır. Lenf kanallarının, lenf ile taşınan antijenleri yakalayacak stratejik noktalarına yerleşmişlerdir (örneğin; barsak çevresinde mezenteriyal lenf düğümleri, trahea çevresinde mediastinal lenf düğümleri). En önemli görevleri, lenf dolaşımı ile taşınan antijenlere karşı ve vücudun diğer yerlerinde antijenle karşılaşmış immun sistem hücrelerinin getirdiği antijenik bilgilere göre immun yanıt oluşturmaktır. Retiküler bir ağ yapısı içinde, B ve T lenfositlerini, makrofajları ve dendritik hücreleri barındırır. B lenfositleri normalde primer folikül, antijen ile uyarıldıklarında sekonder folikül şeklinde kümelenmiş olarak bulunurlar. Tavuk ve hindiler dışındaki evcil hayvanların tümünde lenf nodülleri vardır.

Dalak: Dalak çok fonksiyonlu bir organdır ve bu fonksiyonlar organın farklı histolojik yapılarında gerçekleştirilir. Kırmızı pulpa kan hücrelerinin depolanması ve düzenlenmesi ile ilgili bölümleri kapsar. Organın immun yanıt ile ilgili işleri ise beyaz pulpada yürütülür. Kırmızı pulpa ve beyaz pulpa iç içe geçmiş durumdadırlar, dalağın farklı bölgelerinde bulunmazlar. Beyaz pulpanın immunolojik organizasyonu lenf nodülünde olduğu gibidir. Sekonder lenfoid organ olarak dalağın başlıca görevi, kandaki antijenleri yakalamak ve bunlara karşı immun yanıt oluşturmaktır.

Kemik iliği primer lenfoid organ olması yanında, vücutta en büyük hacime sahip sekonder lenfoid organdır. Damar içine verilen antijenlerin önemli bir kısmı, karaciğer ve dalaktan başka kemik iliğinde yakalanır. Kemik iliğinde immun yanıtı oluşturacak her türlü immun sistem hücresi mevcuttur.

Mukozal lenfoid dokular, özellikle sindirim, solunum ve ürogenital kanallarının mukoz membranları boyunca yerleşmiş yapılardır. Sindirim kanalındaki sekonder lenfoid dokular; tonsilleri, ince barsak (jejunal) Peyer plaklarını, lenfoid folikülleri ve bazı türlerde apendiks foliküllerini kapsar. Peyer plakları, ince barsak mukozasının tüm kalınlığını işgal eden folikül yığınlarından oluşmuştur. Bu yapının üzerindeki epitelde, barsaktan antijen alımını yapan M hücreleri bulunur. Foliküller, diğer lenfoid organlardaki gibi organize olmuşlardır. Epitel altında ve foliküller arasında ise B ve T lenfositleri, makrofajlar ve dendritik hücreler bulunur. Peyer plaklarından başka barsakta ve diğer mukoz membranlarda dağınık durumda gözle görülemeyen foliküler yapılar bulunur. Diğer lenfoid organlarda bulunan primer ve sekonder lenfoid foliküllerden ibaret bu yapıların tümüne ortak olarak *mukoza-ilişkili lenfoid doku* (MALT) denir. Bunlar dalak ve lenf nodüllerin yaptıkları tüm işleri yapabilirler. *Hemolenf nodülleri* ruminantların ve diğer memelilerin kan damarları ile ilişkili ve lenf nodüllerine benzer yapılardır. Hemolenf nodülündeki lenfosit dağılımı, lenf nodüllerindeki çok benzemektedir.

Özet



Bağışıklık kavramını ve temel unsurlarını tanımlamak.

Hayvanlar vücutlarına giren patojenlere karşı immün yanıt oluştururlar ve bağışıklık kazanırlar. Bu işlevi yürüten kompleks organizasyona immün sistem denir. Vücudun patojenlere karşı savunulmasında nonspesifik ve spesifik savunma mekanizmaları görev alır. Spesifik bağışıklık antijenle temas sonucunda kazanılan asıl bağışıklık şeklidir. Kazanılmış bağışıklığın önemli unsurları spesifite, bellek ve toleranstır. Spesifik bağışıklık humoral ve hücreyel olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Bağışıklık doğal yollarla veya yapay olarak ve aktif veya pasif olarak kazanılabilir.



Hangi maddelerin antijen olduğunu açıklamak.

Antijenler, immün yanıtı uyaran maddelerdir. Bir maddenin antijen olarak nitelenebilmesi için öncelikle vücuda yabancı olması gerekir. Aynı zamanda belirli bir molekül ağırlıkta ve kompleks yapıda olması gereklidir. Bu özellikteki maddelerin çözünürlüğü ve dayanıklılığı da dengeli olmalıdır. Bu özellikleri taşıyan maddeler immün yanıtı uyabilirler. Antijenite göreceli bir kavramdır; bazı antijenler immün yanıtı diğerlerine göre daha etkili şekilde uyabilirler. Bu özellik daha çok antijenin sahip olduğu antijenik determinant sayısı ve çeşirliliği ile ilişkilidir.



Antikorun yapısını, sınıflarını ve işlevlerini tanımlamak.

Antikorlar antijenlere karşı oluşturulan ve antijenle spesifik reaksiyona girebilen immunglobulin yapısında moleküllerdir. İlmek bölgelerine sahip polipeptid zincirlerinden oluşmuşlardır. Ağır ve hafif zincirlere, herbir zincirde sabit ve değişken bölgelere sahiptirler. Antikor antijeni çok değişken bölgesi ile tanır ve bağlanır. Ağır zincir yapılarına göre 5 immunglobulin sınıfı vardır; IgG, IgM, IgA, IgE ve IgD. Hayvanlarda bu sınıfların bazılarının alt sınıfları da bulunur. Bu sınıflar immün yanıt sırasında farklı işlevler üstlenebilirler.



İmmün sistem hücrelerinin temel özelliklerini ve işlevlerini açıklamak.

İmmün sistem hücreleri kemik iliğinden köken alır ve farklı hücre tiplerine dönüşürler. Myeloid seri hücreleri içinde nötrofiller, eosinofiller, bazofiller ve makrofajlar yer alır. Nötrofiller ve makrofajlar fagositoz yaparlar ve nonspesifik bağışıklıkta önemli rol oynarlar. Makrofajlar dokulara göç ederek, farklı şekiller ve isimler alırlar. Lenfoid seri içinde lenfositler ve NK hücreleri bulunur. Lenfositler antijeni spesifik olarak tanır ve spesifik immün yanıt oluştururlar. B lenfositleri antikor üretiminden ve humoral bağışıklıktan sorumludur. Yardımcı T lenfositleri humoral ve hücreyel bağışıklığa katkıda bulunur. Sitotoksik T lenfositleri NK hücreleri ile birlikte hücreyel bağışıklıktan sorumludurlar.



İmmün sistem organlarının temel özelliklerini ve işlevlerini açıklamak.

Bağışıklıkla ilgili olayların geçtiği tüm organlar immün sistem organları olarak nitelenir. Primer lenfoid organlar, lenfositlerin değişime uğradığı antijen tanıma yeteneği kazandığı yerlerdir. Timus T lenfositlerinin, farklı hayvan türlerinde bursa Fabricius, kemik iliği ve Peyer plakları B lenfositlerinin geliştiği organlardır. Sekonder lenfoid organlar, antijene karşı immün yanıt olaylarının geçtiği yerlerdir. Bu organlar dalak, lenf nodülleri, kemik iliği ve mukozal lenfoid dokudur. Bu organların tümünde bir immün yanıt oluşturabilecek tüm unsurlar bulunur.

Kendimizi Sınayalım

1. Bir hayvan türünde bir infeksiyonun hiç görülmesi nasıl açıklanır?
 - a. Relatif direnç
 - b. Doğal direnç
 - c. Doğal savunma engelleri
 - d. Kazanılmış bağışıklık
 - e. Nonspesifik bağışıklık
2. Aşağıdakilerden hangisi antijenitenin zorunlu koşullarından biri **değildir**?
 - a. Vücuda yabancılık
 - b. Molekül ağırlığı
 - c. Molekülün kompleks yapısı
 - d. Çözünürlük
 - e. Antijen dozu
3. Molekül ağırlığı 65.000 olan bir antijende kaç adet antijenik determinant bulunur?
 - a. 5
 - b. 6
 - c. 10
 - d. 13
 - e. 15
4. İmmunglobulin molekülünün sabit hafif bölge ilmeği aşağıdakilerden hangisi ile gösterilir?
 - a. CL
 - b. VL
 - c. VH
 - d. CH1
 - e. CH2
5. Vücutta pentamer formunda bulunan immunglobulin sınıfı aşağıdakilerden hangisidir?
 - a. IgA
 - b. IgG
 - c. IgM
 - d. IgE
 - e. IgD
6. Hangi hayvan türünde IgE'nin iki alt sınıfı vardır?
 - a. At
 - b. Sığır
 - c. Koyun
 - d. Köpek
 - e. Domuz
7. Aşağıdakilerden hangisi myeloid seri hücresi **değildir**?
 - a. Lenfosit
 - b. Makrofaj
 - c. Nötrofil
 - d. Bazofil
 - e. Eosinofil
8. Aşağıdakilerden hangisi bir makrofaj **değildir**?
 - a. Histiosit
 - b. Dendritik hücre
 - c. Plazma hücresi
 - d. Mezangial hücre
 - e. Osteoklast
9. Kanatlı hayvanlarda B lenfositlerin geliştirilmesinden sorumlu organ aşağıdakilerden hangisidir?
 - a. Kemik iliği
 - b. Timus
 - c. Dalak
 - d. Lenf nodülü
 - e. Bursa Fabricius
10. Lenf nodülü, dalak, kemik iliği ve hemolenf nodülünün ortak özelliği aşağıdakilerden hangisidir?
 - a. T lenfositlerini geliştirirler.
 - b. İmmun yanıt oluştururlar.
 - c. Puberteden sonra küçülürler.
 - d. Tüm hayvan türlerinde bulunurlar.
 - e. Sadece lenfositleri barındırırlar.

Kendimizi Sınavalım Yanıt Anahtarı

1. b Yanıtınız yanlış ise "Temel Kavramlar" konusunu yeniden okuyunuz.
2. e Yanıtınız yanlış ise "Antijen" konusunu yeniden okuyunuz.
3. d Yanıtınız yanlış ise "Antijen" konusunu yeniden okuyunuz.
4. a Yanıtınız yanlış ise "Antikor" konusunu yeniden okuyunuz.
5. c Yanıtınız yanlış ise "Antikor" konusunu yeniden okuyunuz.
6. d Yanıtınız yanlış ise "Antikor" konusunu yeniden okuyunuz.
7. a Yanıtınız yanlış ise "İmmun Sistem Hücreleri" konusunu yeniden okuyunuz.
8. c Yanıtınız yanlış ise "İmmun Sistem Hücreleri" konusunu yeniden okuyunuz.
9. e Yanıtınız yanlış ise "İmmun Sistem Organları" konusunu yeniden okuyunuz.
10. b Yanıtınız yanlış ise "İmmun Sistem Organları" konusunu yeniden okuyunuz.

Sıra Sizde Yanıt Anahtarı

Sıra Sizde 1

Bağışıklığın önemi, bağışıklığın olmaması halinde sonuçlarının ne olacağını inceleyerek anlaşılabilir. Bunun için, immün sistem öğelerinden birinin doğuştan olmaması veya sonradan hasara uğraması durumunda ortaya çıkan immün yetmezlik vakalarını incelemek gerekir. Damar çeperinde savunmayla ilgili tek bir molekülün doğmasal eksikliği veya AIDS gibi bir hastalıkta tek bir immün sistem hücresinin işlevinin bozulması ölümcül infeksiyonlara zemin hazırlar.

Sıra Sizde 2

Bir molekülün antijenitesini sahip olduğu antijenik determinantlar belirler. Molekülün her 5.000 dalton ağırlığı için 1 antijenik determinant bulunacağına göre, molekül ne kadar büyükse o kadar çok sayıda; ne kadar kompleksse o kadar çok çeşitlilikte antijenik determinant bulunacaktır. Bu da daha etkili bir antijenik uyarıma, dolayısıyla daha güçlü immün yanıtı neden olacaktır.

Sıra Sizde 3

Antijen ve antikor kimyasal maddeler değil, makromoleküllerdir. Kimyasal maddeler arasında kovalent bağlar kurulurken, makromoleküller arasında nonkovalent bağlar kurulur. Nonkovalent bağlanma iki makromolekülün yüzeyindeki elektron bulutları arasında olur. Bu bağlanmada yüzey topoğrafisi önemlidir; iki molekülün (antijen ve antikor) temas eden yüzleri ne kadar uyumluysa bağ o kadar güçlü olur. Nonkovalent bağlar geriye dönüşlüdür; bu da antikorun vücut tarafından tekrar kullanılmasına olanak sağlar.

Sıra Sizde 4

Tüm immün sistem hücreleri faaliyetlerini yüzey molekülleri ve reseptörler aracılığıyla yürütürler. Gelişim aşamalarında herbir hücre tipinde bunların bazıları ortaya çıkar. Dolayısıyla hücrenin işlevi de sahip olduğu yüzey molekülüne göre belirlenir. Eğer bir hücrede A maddesi için reseptör varsa, A maddesinin dikte ettiği işlevi yürütür, yoksa yürütemez. Eğer bir hücrede CD2 yüzey molekülü varsa, CD2 reseptörü taşıyan tüm hücreleri etkileyebilir, yoksa etkileyemez.

Yararlanılan Kaynaklar

- Cruse, J.M., Lewis, R.E. (1998). **Atlas of Immunology**, Boca Raton: CRC Pres.
- Diker, K.S. (1998). **İmmunoloji**, Ankara: Medisan Yayınevi.
- Erganiş, O., İstanbulluoğlu, E. (1993). **İmmünoloji**, Konya: Mimoza Yayıncılık.
- Male, D., Brostoff, J., Rott, D.B., Roitt, I. (2008). **İmmünoloji**, Çev. T. İmir, Ankara: Palme Yayıncılık.
- Pastoret, P.P., Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A. (1998). **Handbook of Vertebrate Immunology**, San Diego: Academic Pres.
- Tizard, I.R. (2009). **Veterinary Immunology**, St. Louis: Saunders.

8

Amaçlarımız

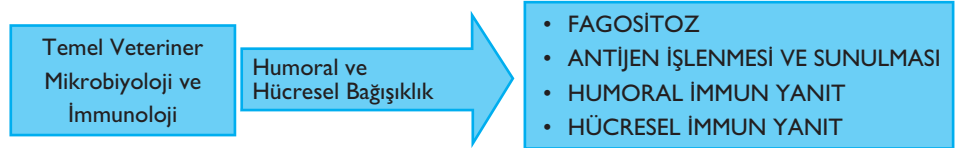
Bu üniteyi tamamladıktan sonra;

- 👁️ Fagositoz olayını ve etkilerini açıklayabilecek,
- 👁️ Antijen işlenmesi ve sunulmasını açıklayabilecek,
- 👁️ Humoral bağışıklığın gelişimini ve sonuçlarını açıklayabilecek,
- 👁️ Hücresel bağışıklığın gelişimini ve sonuçlarını açıklayabileceksiniz.

Anahtar Kavramlar

- Fagositoz
- Antijen sunma
- MHC molekülleri
- Endojen/ekzojen antijen
- Sitokin
- Humoral bağışıklık
- T bağımlı antijen
- Komplement
- Hücresel bağışıklık
- Sitotoksite

İçindekiler



Humoral ve Hücresel Bağışıklık

FAGOSİTOZ

Vücuda giren bir mikroorganizmanın veya yabancı maddenin belirli immun sistem hücreleri tarafından yakalanarak yutulmasına fagositoz denir. Bu olay infeksiyon etkenlerinin etkisiz hale getirilmesi ve vücuttan uzaklaştırılması için en önemli erken savunma mekanizmalarından birisidir. Fagositoz olayı, myeloid seriye bağlı polimorfnükleer hücreler ve mononükleer fagositik hücreler tarafından gerçekleştirilir. Aktif olarak fagositoz yapan polimorfnükleer hücreler, nötrofiller ve eozinofiller, mononükleer hücreler ise makrofajlardır. Fagositoz nonspesifik bir bağışıklık mekanizmasıdır; **fagositler** mikroorganizma veya antijene göre özelleşmemişlerdir.

Fagosit: Tüm fagositik hücreler için kullanılabilen ortak terim.

Fagositozun Aşamaları

Kemotaksis

Hücreleri kendine doğru çeken maddelere kemotaktik madde, hücrelerin kemotaktik maddeye doğru yönelmesine kemotaksis adı verilir. Patojenlerin dokuyu istilası ve buna bağlı doku tahribi sonucunda, o dokuda birçok kemotaktik madde açığa çıkar. Dokuda bulunan fagositik hücreler kemotaktik maddelere, dolayısıyla patojenlere doğru harekete geçer. Kanda dolaşan fagositler ise, bakteri istilası ve doku tahribi durumunda, hasarlı dokudan geçen kılcal damarlarda ilerlerken, bu kemotaktik maddeleri algırlar. Kemotaktik maddeler fagositleri hasarlı dokuya çeker ve damar endotelinin bu hücrelere tutunma özelliğini artırırlar. Fagositler, yüzeylerindeki **integrinler** vasıtasıyla, endotel yüzeyindeki **selektinlere** bağlanırlar. Endotele tutunan fagositler hasarlı dokuda gelişen olaylar sonucunda gevşeyen endotel tabakasından geçerek dokuya ulaşır. Bu olaya diapedezis de denir. Dokuya geçen fagositler kemotaktik maddelerin yoğun olduğu bölgeye, yani patojenlere yönelirler. Eğer mikroorganizma kan gibi sıvı bir ortamda ise fagositler bunlara direkt olarak yönelirler.

İntegrin/selektin: Hücrelerin birbirine nonspesifik olarak tutunmasını sağlayan hücre yüzeyi molekülleri.

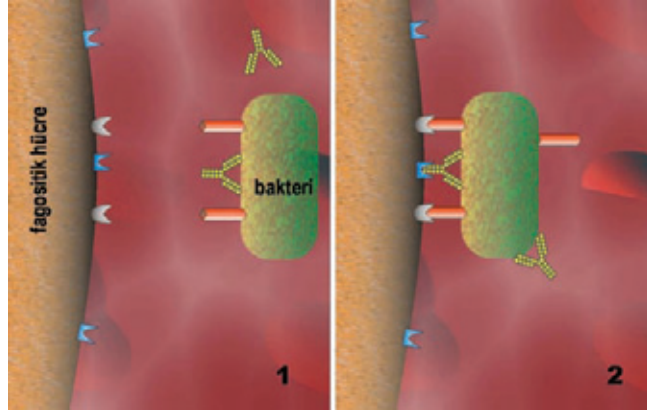
Bağlanma

Bir mikroorganizma ile karşı karşıya gelen fagositik hücrenin öncelikle ona bağlanması gerekir. Fagositler mikroorganizmalar ile katı dokular içinde karşılaştıklarında bunları kolayca yakalayıp bağlanabilirler. Bu olaya *yüzey fagositozu* denir. Yüzey fagositozunda, bağlanmanın ve yutma işleminin gerçekleşmesi için başka maddelerin yardımına gerek yoktur. Ancak olay vücut sıvılarında geçiyorsa bu

bağlanma kendiliğinden olmaz. Çünkü, elektrolit ortamda fagositlerin ve mikroorganizmaların yüzeyleri genellikle negatif yüklüdür. Fagositlerin mikroorganizmaya bağlanmasına engel olan bu duruma *zeta potansiyeli* denir. Bağlanmanın gerçekleşmesi için mikroorganizmanın yüzey elektrik yükünün değişmesi gerekir. Eğer mikroorganizmanın yüzeyi pozitif yüklü olan antikorlar veya komplement ile kaplanırsa elektrik yükü değişir. Böylece, fagositlerin üzerinde bulunan antikor reseptörleri (FcR) ve C3b reseptörleri ile bu bağlanma gerçekleşir. Mikroorganizma yüzeyini kaplayarak fagositozu kolaylaştıran böyle maddelere *opsonin*, bu olaya *opsonizasyon* denir (Şekil 8.1).

Şekil 8.1

Fagositozda antikor ve komplement aracılığı ile opsonizasyon

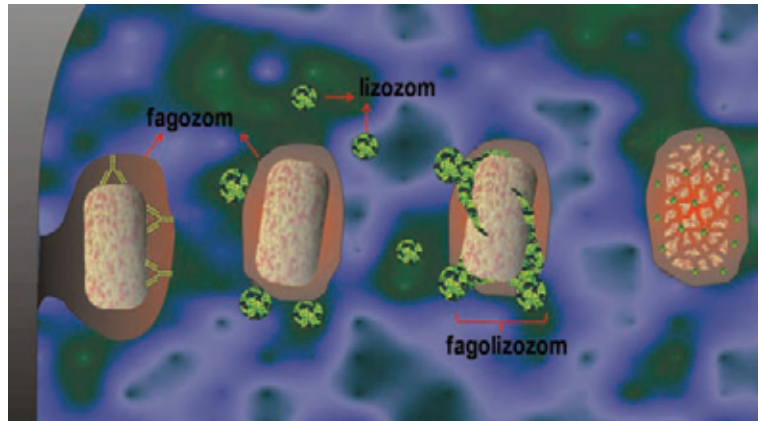


Yutma

Fagositik hücreler mikroorganizmaları bağlanırken, aynı anda membran uzantıları da onu çevrelemeye başlar. Bu kısımdaki hücre yüzeyinde bir çöküntü oluşur. Bu olaylar sonunda mikroorganizma, *fagozom* adı verilen bir vakuol ile fagosit içine alınmış olur (Şekil 8.2). Yutma olayının başarılı şekilde gerçekleşmesi mikroorganizmanın yüzey özelliklerine, özellikle hidrofobik özelliklerine bağlıdır. Fagositler hidrofobik yüzeye sahip bakterileri (örn. *Mycobacterium tuberculosis*) kolayca yutar, hidrofilik yüzeylileri (örn. *Streptococcus pneumoniae*) çok zor yutar. Hidrofilik yüzeyli bakterilerin yutulabilmesi için yüzeylerinin opsoninler tarafından kaplanarak hidrofobik hale getirilmeleri gerekir. Böylece, opsoninlerin hem bağlanma, hem de yutma aşamasında rol oynadıkları anlaşılmaktadır.

Şekil 8.2

Fagositozda yutma ve sindirme aşamaları



Öldürme ve Sindirme

Fagositler tarafından yutulan mikroorganizmalar, hücre içinde iki farklı mekanizma ile tahrip edilirler; respiratorik yıkım ve lizozomal enzim sindirimi. *Respiratorik yıkım* ile ilgili reaksiyonlar mikroorganizmanın hücreye bağlanmasından birkaç saniye sonra başlar ve fagozom membranında devam eder. Raksiyonlar, bir membran enzimi olan NADPH-oksidadaz ile başlar, süperoksit dizmutaz ve miyeloperoksidaz enzimlerinin çalışması ile devam eder. Oksidatif metabolizma olarak da adlandırılan bu reaksiyonlar sırasında hidrojen peroksit ve hipoklorid iyonları oluşur. Bu maddeler birçok biyolojik molekül üzerinde çok etkilidir ve bakterileri proteini okside ederek öldürürler. Hipoklorid ayrıca lizozomal enzimlerin etkisini de artırır. *Lizozomal enzim sindirimi* fagozom içinde gerçekleşir. Mikroorganizma fagozom içine alındıktan sonra, hücre sitoplazmasındaki lizozomlar fagozomla birleşir ve enzimleri boşaltır. Bu birleşik vakuole *fagolizozom* denir (Şekil 8.2). Lizozomal enzimler de bakteri çeperini parçalayarak birçok mikroorganizmayı öldürebilirler. Lizozom enzimleri arasında mikroorganizmaların tüm yapılarını parçalayabilecek onlarca farklı enzim ve madde sayılabilir. Bu maddeler mikroorganizmalar üzerine farklı yollarla etki ederler. Örneğin, lizozim Gram pozitif bakterilerin hücre duvarını parçalar, laktoferrin bakterinin gereksinimi olan demiri bağlayarak üremesini engeller, defensin lipid tabakasının bütünlüğünü bozarak, bakteri ve mantarların hücre membranlarını ve zarflı virusları parçalarlar.

Bağışıklık olaylarının gelişimi ile ilgili daha geniş bilgiyi İmmunoloji (1998) kitabında bulabilirsiniz.



K İ T A P

Farklı Hücrelerin Fagositozu

Vücut savunmasında görev alan fagositik hücreler nötrofil, eozinofil, monosit ve makrofajlardır. Bu hücre tipleri tarafından gerçekleştirilen fagositozun temel mekanizması benzer olmasına rağmen, gerek olayın bazı aşamalarında gerekse fagosite olan materyal bakımından farklılıklar bulunabilir. Nötrofiller, vücuda giren mikroorganizmalara ilk müdahaleyi yapan fagositlerdir. Saldırmaya ve öldürmeye her an hazırdırlar ve diğer yollarla uyarılmaya ihtiyaçları yoktur. Nötrofilleri, özellikle mikrobiyal kökenli kemotaktik maddeler çeker. Nötrofillerin fagosite ettikleri mikroorganizmaları öldürme güçleri makrofajlara göre daha fazladır; bunun için respiratorik yıkım mekanizmasını kullanırlar. Ancak, enerjileri sınırlı olduğundan az sayıda fagositoz yapabilirler ve birkaç fagositozdan sonra kendileri de ölürlür. Eozinofiller de nötrofillere benzer şekilde fagositoz yaparlar. Eozinofilleri çeken kemotaktik maddeler çoğunlukla mast hücreleri tarafından salgınır. Eozinofillerin büyük çoğunluğu dokularda yerleştiği için, damardan dokuya göç olayı fazla görülmez. Eozinofillerin respiratorik yıkım mekanizmasında hipoklorid yerine hipobromid iyonları oluşur ve bu da daha çok parazitler üzerine etkilidir.

Makrofajlar tarafından gerçekleştirilen fagositozun aşamaları nötrofil fagositozuna benzer şekilde gelişir. Ancak, nötrofil fagositozundan farklı bazı özellikleri vardır. Makrofajlar sadece mikroorganizmaları değil, vücuda ait yaşlı, ölü veya hasarlı hücreleri, bunların artıklarını, hatta asbest ve partiküler karbon gibi inorganik maddeleri bile fagosite ederler. Makrofajlar daha geç aktive olurlar ve fagositoza nötrofillerden sonra başlarlar. Ancak, nötrofillerin aksine makrofajlar, yaşamları boyunca sürekli ve defalarca fagositoz yapabilirler. Kemotaktik faktörler açısından bakıldığında, makrofajlar tahrip olan hücrelerden açığa çıkan maddeler tarafından

da olay bölgesine çekilirler. Makrofajlar opsonize olmamış bazı mikroorganizmaları direk olarak yakalama ve bağlanma yeteneğine sahiptirler. Makrofajlar fagozom içinde yuttukları mikroorganizmaları lizozomal enzim sindirimi yoluyla öldürürler. Bazı sitokinler tarafından uyarıldıklarında oksidatif mekanizmayı da kullanmaya başlarlar ve öldürme güçleri çok artar. Ayrıca, fagosite etmeksizin, enzimlerini boşaltarak mikroorganizmayı hücre dışında da öldürebilirler.

Fagositozun Sonuçları

Eğer mikroorganizmalar veya yabancı partiküller damara injekte edilirse, kandan hızla temizlenirler. Bu yabancı partiküllerin kandan temizlenme şekli hayvan türüne bağlıdır. Köpeklerde ve kemiricilerde bunların %80-90'ı dalak ve karaciğer makrofajları tarafından yakalanır. Dalak daha etkili bir filtre olmasına karşın, büyük hacmi nedeniyle karaciğerde daha çok antijen yakalanır. Buna karşın, ruminantlarda, atlarda, kedilerde ve domuzlarda kandaki mikroorganizmaların çoğu akciğer damarlarındaki makrofajlar tarafından yakalanır. Eğer spesifik antikorlar (opsonin) mevcutsa, mikroorganizmalar kandan daha çabuk temizlenir. Antikorla kaplanmış mikroorganizmalar daha çok dalakta, komplementle (C3b) ile kaplanmış olanlar daha çok karaciğerde yakalanır. Eğer spesifik antikorlar yoksa veya bakteri antifagositik bir kapsüle sahipse, kandan temizlenme oranı düşer. Protein molekülleri sıvı ortamlarda kendiliklerinden kümelenme eğilimindedir. Eğer bir protein solüsyonu damar içine injekte edilirse, protein kümeleri nötrofiller ve makrofajlar tarafından fagosite edilerek kandan hızla uzaklaştırılır. Sıvı fazdaki eriyebilir maddelerin fagositozuna **pinositoz** denir.

ANTIJEN İŞLENMESİ VE SUNULMASI

Vücuda giren antijenlerin çoğu, girdikleri andaki yapıları ile immun yanıtı etkili bir şekilde uyaramazlar. Antijenlerin büyük çoğunluğunun, özellikle de protein yapısındaki antijenlerin güçlü bir immun yanıtı uyatabilmeleri için, hücre içinde belli bir düzeye indirgenmeleri (*antijen işlenmesi*) ve **MHC** molekülleri ile birlikte T lenfositlerine sunulması (*antijen sunulması*) gerekir. İşlenme gerekliliği açısından iki temel antijen grubu vardır. *T-bağımlı antijenler* protein yapısındadır ve bunlar sadece işlendikten sonra T lenfositlerine sunulabilirler. *T-bağımsız antijenler* protein dışındaki kimyasal antijen gruplarıdır ve işlenmeden B lenfositlerini uyatabilirler. İşlenen antijenlere karşı güçlü ve uzun süreli bağışıklık oluşurken, işlenmeyen antijenlere karşı daha zayıf ve kısa süreli bağışıklık oluşur. İmmun yanıtı uyarmak için işlenmesi gerekli olan antijenler, ekzojen ve endojen olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Çünkü, bu iki grup antijen tarafından farklı immun yanıt mekanizmaları uyarılır. Ekzojen antijenler, işlendikten sonra MHC sınıf II molekülleri ile, endojen antijenler MHC sınıf I molekülleri ile sunulurlar.

MHC Molekülleri

MHC molekülleri, hücre içinde işlenen antijenleri hücre yüzeyinde lenfositlere sunan polipeptid yapılardır. Bunların polipeptid içerikleri bireyler arasında çok çeşitlilik gösterdiği için, bir bireyin MHC molekülü diğerine verildiğinde antijenik etki yapar ve organ nakillerinde redde neden olurlar. Bu nedenle MHC antijenleri veya transplantasyon antijenleri olarak da adlandırılırlar. Bu molekülleri kodlayan MHC genleri, antijen işleme ve sunma olaylarını kontrol ederler. Bu yüzden MHC, infeksiyöz veya immunitite ile ilişkili hastalıklara direnci veya duyarlılığı belirleyen en önemli genetik faktördür. Bağışıklıkla ilişkili iki tip MHC molekülü vardır. MHC

MHC: Major Histocompatibility Complex (Büyük Dokuuyuşum Kompleksi)

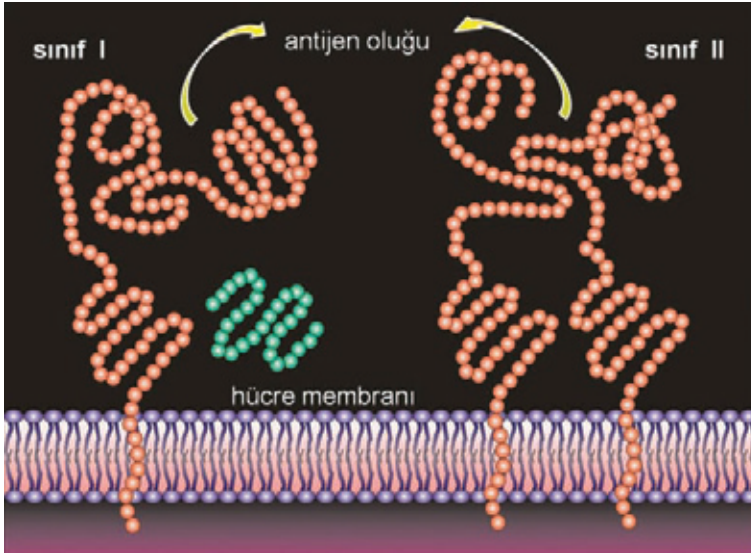
sınıf I molekülleri MHC sınıf I lokusu tarafından kodlanır. Bu moleküller, eşey hücreleri dışındaki tüm çekirdekli hücrelerin yüzeyinde bulunur. İmmun sistem hücrelerinde daha yoğun olarak bulunurlar. Tek bir polipeptid zincirinden oluşmuş, ilmekleri, sabit ve değişken bölgeleri olan yapılardır (Şekil 8.3). Görevleri sitozolik yolla işlenmiş endojen antijenleri T-lenfositlerine sunmaktır. MHC *sınıf II molekülleri* MHC sınıf II lokusu tarafından kodlanır. Bu moleküller sadece makrofaj, dendritik hücre ve B lenfosit gibi profesyonel antijen sunan hücrelerin yüzeyinde bulunur. İki polipeptid zincirinden oluşmuş, ilmekleri, sabit ve değişken bölgeleri olan yapılardır. Görevleri endozomal yolla işlenmiş ekzojen antijenleri T-lenfositlerine sunmaktır. İşlenmiş antijenler her iki tip molekülün de değişken bölgesinde bulunan antijen oluğuna oturduktan sonra sunulurlar. Bu bölgenin yapısı çok polimorfiktir.

MHC moleküllerinin polimorfik yapıda olmasının yararı nedir?



Şekil 8.3

MHC sınıf I ve sınıf II moleküllerinin şematik yapısı.

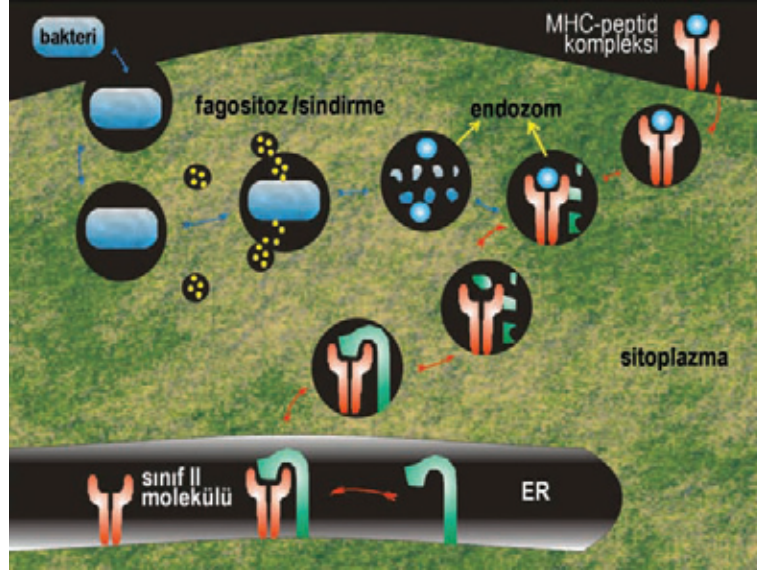


Ekzojen Antijenlerin İşlenmesi ve Sunulması

Ekzojen antijenler sadece MHC sınıf II molekülleri ile birlikte sunulur (Şekil 8.4). Sadece MHC sınıf II moleküllerine sahip hücreler yuttukları yabancı partikülleri immün yanıtı uyuracak şekilde işleyip sunabilirler. Bu moleküller de sadece makrofajlar, dendritik hücreler ve B lenfositlerinde bulunur. Bu nedenle bu hücrelere profesyonel antijen sunan hücreler de denir. MHC sınıf II moleküllerini taşıyan makrofajlar çoğunlukla, dalak, timus ve karaciğerde, dendritik hücreler deri ve lenf nodüllerinde, B hücreleri lenf nodüllerinde bulunur. İmmun sistemin ilk kez karşılaştığı antijenleri genellikle makrofajlar işler. İmmun sistem antijenle daha önce karşılaşmışsa ve antijene karşı antikorlar varsa, antijen işleme olayında makrofajların önemi azalır. Çünkü bu fonksiyonu, antikor varlığında daha etkili çalışan dendritik hücreler ve B hücreleri üstlenirler. Profesyonel antijen sunan hücreler dışında vücuttaki diğer bazı hücrelerde ekzojen antijenleri bir miktar işleyip sunabilirler. Ancak bunun için yoğun sitokin etkisi altında olmaları gereklidir.

Şekil 8.4

Ekzojen antijenlerin endozomal yolla işlenmesi ve MHC sınıf II molekülleri ile sunulması.



Endozom: Maddeleri hücre içine alan her türlü vakuolün ortak adı.

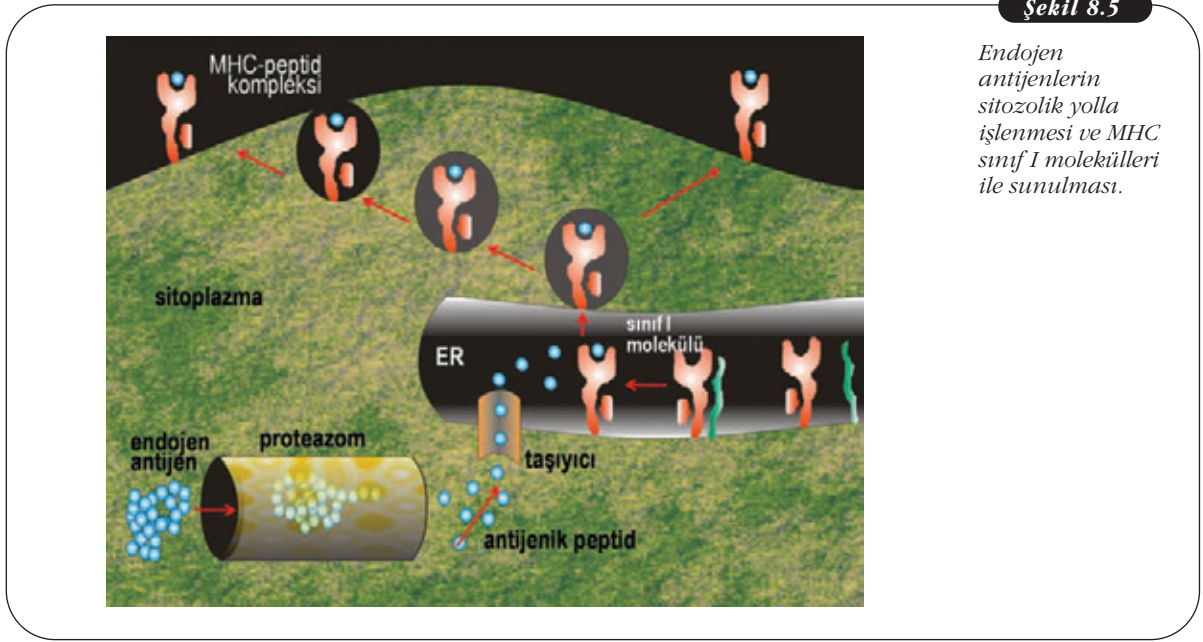
Ekzojen antijenlerin işlenmesi çeşitli aşamalarda gerçekleşir (Şekil 8.4). İlk basamak, antijenin yutulması ve bir fagozom (veya **endozom**) içinde hücreye alınmasıdır. Sitoplazmada bulunan lizozomlar antijen içeren fagozomlarla birleşerek, sindirim enzimlerini antijenlerin üzerine boşaltırlar. Enzimler, antijeni 10-30 amino asitten ibaret küçük peptid parçalarına ayırır. Bu peptid parçalarını içeren fagozom, daha sonra yeni sentezlenmiş MHC sınıf II molekülleri içeren endozomla birleşir. Bu endozom içindeki işlenmiş peptid parçaları, uygun sınıf II moleküllerinin antijen oluşuna bağlanır. Daha sonra endozom hücre membranına doğru gider ve burada açılarak, MHC-peptid kompleksini hücre yüzeyinde sergiler. Yardımcı T lenfositleri işte bu kompleksi spesifik antijen reseptörleri (TCR) ile tanırlar. MHC molekülleri, antijenin parçalanması ile ortaya çıkan peptid parçalarının tümüne değil, kendine uygun olanlara bağlanır. Böylece, ekzojen bir antijenin hangi kısımlarının T hücrelerine sunulacağını, dolayısıyla hangi peptide karşı immun yanıt oluşturulacağını MHC sınıf II molekülleri belirler.

Yukarıda anlatılan ve ekzojen olarak nitelenen antijenlerin işlenmesi ile ilgili mekanizmaya *endozomal işlem* denir. Hangi antijenlerin endozomal yolla işleneceği, dolayısıyla ekzojen antijen olarak niteleneceği, antijenin hücreye giriş şekline ve hücre içindeki konumuna bağlıdır. Hücreye fagozom içinde alınan, dolayısıyla sitoplazmada serbest olarak bulunmayan antijenler endozomal yolla işlenir ve ekzojen antijen olarak nitelenir. Antijen sunan profesyonel bir hücre, 200.000 adet MHC sınıf II molekülü taşıyabilir. Bir yardımcı T hücresi de 200-300 MHC-peptid kompleksi tarafından uyarılabilir. Böylece, antijen işleyen bir hücre aynı anda birçok farklı antijenik peptidi (epitopu) işleyerek bunları farklı yardımcı T lenfositlerine sunabilir.

Endojen Antijenlerin İşlenmesi ve Sunulması

İmmun yanıtı uyarıcı antijenlerin bazıları, direkt olarak içinde buldukları hücreler tarafından işlenirler ve sunulurlar. Vücuda yabancı olmasına rağmen, hücre sitoplazmasında serbest olarak bulunan ve hücreye ait bir yapıymış gibi kabul

edilen antijenlere endojen antijen denir. Bir antijeni, endojen antijen olarak nitelemek için gerekli koşul, hücre sitoplazması içinde serbest halde bulunmasıdır. Endojen antijenler sadece MHC sınıf I molekülleri ile birlikte sunulur. Endojen antijenlere en iyi örnek, virüsle infekte hücreler tarafından oluşturulan viral proteinlerdir. Bu antijenler, ekzojen antijenlerden farklı şekilde işlenirler ve MHC sınıf I moleküllerine bağlanırlar. Sınıf I moleküllerine bağlanan antijenler, sitotoksik T lenfositlerini uyarırlar.



Endojen antijenlerin işlenmesi ekzojen antijenlerin işlenmesinden farklıdır (Şekil 8.5). Endojen antijenler sitoplazma içinde sentezlenirler veya sitoplazmaya direkt olarak geçerler. Kısaca endojen antijenler, sitoplazma içinde serbest olarak bulunurlar. İlk aşamada, ubiquitin denen küçük proteinler işlenecek olan endojen antijene bağlanır; böylece işlenecek protein işaretlenmiş olur. Ubiquitin zinciri, antijeni *proteazom* adı verilen enzimatik bir yapıdan geçirir. Antijen burada küçük peptid parçalarına ayrılır. Peptidler taşıyıcı proteinlere bağlanır ve bunlar vasıtasıyla endoplazmik retikuluma geçirilir. Peptid parçaları, burada kendilerine uygun MHC sınıf I moleküllerinin özel antijen taşıyan oluklarına yerleşirler. Daha sonra, MHC sınıf I molekülleri bağlandıkları peptid ile birlikte hücre membranına taşınır ve burada sergilenirler. Endojen antijenlerle ilgili bu mekanizma, sitoplazma içinde gerçekleştiği için *sitozolik işlem* olarak da adlandırılır.

Endojen ve ekzojen antijenlerin işlenme yolları tamamen ayrı olmasına rağmen bazı istisnalar olabilir. İstisna olarak, ekzojen antijenler serbest şekilde sitoplazma içinde bulunurlarsa, endojen antijenler gibi işlenip sınıf I molekülleri ile sunulurlar. Veya, virüsler makrofajlar tarafından fagosite edilerek fagozomlar içinde hücreye alınırlarsa; ekzojen antijenler gibi endozomal yolla işlenip, sınıf II molekülleri ile birlikte sunulabilirler.

Sitokinler

Sitokinler, çoğunlukla immun sistem hücreleri tarafından salgılanan ve hücrelerin özelliklerini veya fonksiyonlarını etkileyen küçük proteinler veya glikoproteinler-

dir. İmmun yanıtın her aşamasında, hormon benzeri bir etki ile hücrelerarası iletişimi sağlarlar. Diğer bir deyişle, hücrelerarası iletişimi sağlayan sinyal molekülleri- dir. İmmun sistem hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücre tarafından salgıla- nırlar. Sitokinler, hücre gelişmesi, çoğalması, aktivasyonu, yangı, bağışıklık, doku tamiri ve morfogenezis gibi önemli biyolojik faaliyetleri düzenlerler ve işlevleri mutlak gereklidir. İmmun yanıtta hücrenin olduğu her olayda mutlaka sitokin fonksiyonu da vardır.

Sitokinler, çeşitli şekillerde adlandırılmakta ve sınıflandırılmaktadır. Lenfositler tarafından üretilen sitokinlere *lenfokin*, makrofajlar tarafından üretilenlere *mono- kin* adı verilmiştir. Ancak, sitokinler birden fazla hücre tipi tarafından da üretilebil- dikleri için, böyle bir ayırım yapmadan tümüne sitokin demek daha doğrudur. Si- tokinler fonksiyonlarına göre sınıflandırılıp adlandırılabilirler. Buna göre, lenfosit- ler ile diğer immün sistem hücreleri arasında ki ilişkileri düzenleyen sitokinlere *in- terleukin* (örn. IL-1, IL-2, IL-12) adı verilir. Yangı olayında görev alan ve kemotak- tik özellikli sitokinlere *kemokin* denir. Bazı sitokinler, hücrelerin üreme ve çoğal- masını uyarırlar ki, bunlara *büyüme faktörleri* denir. Bunlardan başka, viral infek- syonlarda görevli interferon (IFN), sitotoksik özellikli lenfotoksin veya tümör nek- rozis faktörü (TNF) grupları vardır. Ancak, sitokinler birden çok fonksiyona sahip olabildikleri için, bir sitokin diğer bir grup içinde de yer alabilir.

Sitokinler bir çok yönden hormonlara benzerler. Çok düşük dozlarda bile ken- dileri için uygun reseptörleri taşıyan hücreleri etkilerler. Bir sitokinin bir hücre üzerindeki etkisini gösterebilmesi için mutlaka reseptörüne bağlanması gerekir. Bir hücreden salgılanan sitokinin, çok yakın veya fiziksel temas halindeki hücre- lerde gösterdiği etki parakrin etki olarak nitelenir. Otokrin etki tarzında, sitokinler üretildiği hücrenin reseptörüne bağlanabilir. Yani, hücre kendi salgıladığı sitokin- den etkilenir. Endokrin etki tarzında, sitokinler salgılandıktan sonra vücuda dağı- larak uzak dokulardaki hücrelere ulaşır. Belli bir sitokin birden fazla hücre tipi ta- rafından üretilebilir. Bir sitokin, uygun reseptör taşıyan farklı hücre tiplerine bağ- lanabilir. Bir sitokin, belli bir hücrenin çeşitli fonksiyonlarını etkileyebilir. Farklı si- tokinler belli bir hücrede ortak çalışarak tek bir etki oluşturabilirler. Bazı sitokinle- rin üretimi veya etkisi, diğer sitokinler tarafından engellenebilir veya artırılabilir. Hücre, dışarıdan gelen uyarımlardan sonra sitokin sentezine başlar ve uyarım bi- tince durdurur. Sentezlenen sitokinler hemen salgılanır, hücre içinde biriktirilmez.



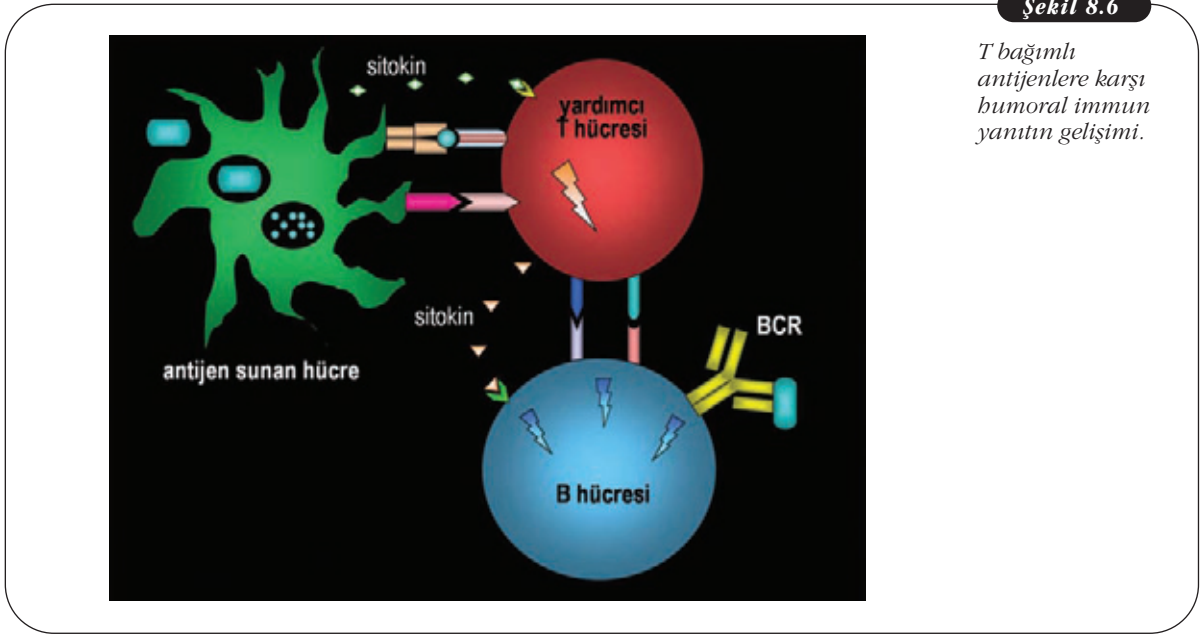
Sitokinlerin görev aldığı bağışıklık olayları nelerdir?

HUMORAL İMMUN YANIT

Humoral immün yanıt, B hücrelerinin antijenle uyarılması ile başlayan ve antikor üretimi ile sonuçlanan olayları içine alır. Çok eskiye dayanan humoral terimi, anti- korların sıvı fazda bulunması nedeniyle kullanılmaktadır. Humoral immün yanıt genellikle B lenfositleri ile özdeşleştirilen bir olay olmasına rağmen, T hücre yardımı olmadan protein yapısındaki antijenlere karşı etkili bir immün yanıt oluşturma- m mümkün değildir. Bu nedenle, B hücrelerini uyarmak için T hücre yardımı gereken ekzojen antijenlere, T-bağımlı antijenler denir. Buna karşın, protein yapı- sında olmayan bazı mikrobiyal antijenler, ek sinyalleri kendileri sağlayarak ve T hücre yardımına gerek duymadan B lenfositlerini direkt olarak aktive edebilirler. Böyle antijenlere ise T-bağımsız antijen denir.

T-Bağımlı Antijenlere Karşı Humoral İmmun Yanıt

Vücuda giren bir mikroorganizma fagositik hücreler tarafından yutulduğunda humoral immün yanıt mekanizması başlamış olur. Mikroorganizmanın fagozom içinde parçalanması sonucu açığa çıkan T-bağımlı antijenler hücre içinde endozomal yolla işlenir (bak. ekzojen antijenlerin işlenmesi ve sunulması). Mikroorganizmanın vücuda ilk kez girişinde bu işi genellikle makrofajlar, daha sonraki girişlerinde dendritik hücreler ve/veya B hücreleri yaparlar. Antijen sunan hücreler işledikleri antijenin peptid parçalarını sınıf II MHC mülükülü ile birlikte hücre yüzeyinde sergilerler. Bu özel kompleks, buna spesifik T hücre reseptörü (TCR) taşıyan yardımcı T lenfositleri tarafından algılanır. Bu iki hücre CD4 molekülü yardımıyla bağlanır (Şekil 8.6).



Bir tarafta yardımcı T lenfositleri antijen sunan hücreler tarafından uyarılırken, diğer tarafta B lenfositleri vücuda giren mikroorganizmayı BCR vasıtasıyla tanıır. Bu tanıma olayı T lenfositlerinin işlenen antijeni tanıma olayından bağımsızdır. Yani T lenfositlerinin tanıdığı işlenmiş antijen ile, B lenfositlerinin direkt olarak tanıdığı antijen, mikroorganizmanın farklı iki antijeni olabilir. B lenfositlerinin spesifik antijeni tanıyarak bağlanması sadece şifrenin girilmesi anlamında bir olaydır; B lenfositlerinin aktivasyonu için yeterli değildir. B lenfositlerinin asıl aktivasyonunu, antijen sunan hücrelere bağlanmış olan yardımcı T lenfositlerinin ürettiği sitokinler sağlar. Diğer bir deyişle, buraya kadar anlatılan olayların tümü B lenfositlerini uyaracak sitokinlerin sağlanması için gerçekleşmiştir.

Antijene BCR ile spesifik olarak bağlanan ve yardımcı T lenfositinden sitokin desteğini alan B lenfosit uyarılmış olur. Bundan sonra bu B lenfosit soyu proliferer olur, yani aktif faza girerek çoğalmaya başlar. Bölünen her bir B hücre neslinde kademeli olarak morfolojik değişiklikler görülür ve birkaç bölünmeden sonra plazma hücreleri ortaya çıkar. Plazma hücreleri, B lenfosit değişiminin son aşamasıdır; çünkü bu hücreler daha fazla bölünemez ve değişime uğrayamaz. Plazma hücrelerinin tek işi yaşadıkları sürece antikor üretmektir. Bir plazma hücresinin ömrü 3

gün ile 4 hafta arasında değişir. Bu hücreler bir protein fabrikası gibi çalışarak spesifik antijene karşı anormal bir hızla antikor üretirler. Bir B hücresi tek bir antijene spesifik olduğundan, spesifik antijeni tarafından uyarılan B hücresinden çoğalan plazma hücreleri de aynı antijene spesifiktir. Diğer bir deyişle plazma hücreleri, atası olan B hücresi ile aynı spesifitede antikor üretir.

T bağımlı antijenlere karşı oluşan humoral immün yanıtın sadece kendine has özellikleri vardır. Yukarıdaki uyarımlar sonucu çoğalmaya başlayan B hücrelerinin bir kısmı *bellek B hücresi* haline geçer. Bu hücreler antijenle daha sonraki karşılaşmalarda doğrudan uyarılarak çok kısa sürede bağışıklığı sağlarlar. B hücrelerinin aynı antijenle tekrar karşılaşmalarında *affinite maturasyonu* denen durum ortaya çıkar. Affinite maturasyonu, üretilen antikorun spesifik antijene bağlanma yeteneğinin artmasıdır. Bu olay immünglobulin genlerindeki düzenli mutasyonların seleksiyonu esasına dayanmaktadır. B hücresi aktive olup çoğalarak plazma hücresine dönüşürken, aynı zamanda hücrenin ürettiği immünglobulin sınıfı da değişir. Gen düzenlenmesi ile gerçekleşen bu olaya *izotip değişimi* denir. Yani, B lenfosit olayların başlangıcında sadece IgM üretirken, plazma hücresine geçiş aşamasında üretilen immünglobulin sınıfı ihtiyaca göre IgG, IgE veya IgA'ya dönüşür. Bu üç olay sadece T bağımlı antijenlere karşı oluşan humoral immün yanıt sırasında görülür.

Primer ve Sekonder İmmün Yanıt

T bağımlı antijenlerle ilgili olarak yukarıda anlatılan olayların tümü mikroorganizmanın veya antijenin vücuda ilk girişinde, yani primer infeksiyon sırasında gerçekleşir. Buna *primer immün yanıt* denir. Primer immün yanıtın işlevi, vücuda antijenden veya infeksiyondan arındırmak ve aynı etkenin sonraki girişlerinde vücuda hazırlamak, yani bağışık kılmaktır. Gerçektende, aynı antijenin vücuda tekrar girişlerinde, primer immün yanıtın çok daha hızlı ve etkili bir antikor yanıtı oluşur. Buna da *sekonder immün yanıt* denir.

İmmün sistemin en çarpıcı özelliklerinden biri immünolojik bellektir. İmmünolojik bellek, immün sistemin daha önce karşılaştığı antijenlere karşı daha hızlı ve etkili bir yanıt vermesidir. Diğer bir deyişle, sekonder immün yanıt, immünolojik bellek sayesinde ortaya çıkar. İmmünolojik belleğin temeli de bellek B lenfositleridir. Bellek B hücreleri uzun ömürlüdür. İzotip değişimi geçirdiklerinden, yüzeylerinde antijen reseptörü olarak IgG taşırlar. En önemlisi de, affinite maturasyonu geçirdikleri için antijenlere daha iyi bağlanırlar. Bütün bunlara bağlı olarak, antijenle tekrar karşılaştıklarında (sekonder immün yanıtta), düşük antijen dozlarında bile, daha çabuk uyarılıp, humoral immün yanıtı kısa sürede pik düzeye çıkarabilirler. Primer immün yanıt sırasında oluşan diğer tip bellek B hücreleri üzerlerinde IgM taşırlar ve bölünerek varlıklarını devam ettirirler.

Tüm bunların sonucunda primer ve sekonder immün yanıt arasında önemli farklar ortaya çıkar. Antikor üretimi, primer immün yanıtta yaklaşık 2 haftada pik düzeye çıkıp aynı sürede hızla azalırken, sekonder immün yanıtta birkaç günde pik düzeye çıkıp haftalarca hatta aylarca yüksek seviyede kalır. Primer immün yanıtta üretilen antikorların çoğu IgM, az kısmı IgG olurken; sekonder immün yanıtta çoğunlukla IgG, antijene göre IgA ve IgE, az miktarda da IgM üretilir. Primer immün yanıtta üretilen antikorların antijene affinitesi düşükken, sekonder immün yanıtta antikorların affinitesi artar. Primer immün yanıtta antikorların çoğu lenf nodülleri ve dalakta üretilirken, sekonder immün yanıtta kemik iliğinde üretilir. Bunlardan da anlaşılacağı gibi, geçirilen infeksiyonlar veya aşılama ile kazanılan bağışıklığın temelinde bu mekanizmalar bulunmaktadır.

T-Bağımsız Antijenlere Karşı Humoral İmmun Yanıt

Belirli antijenler, T hücre yardımı olmadan da B hücrelerini uyarabilir. T bağımsız antijenler olarak bilinen bu grupta, bakterilerin hücre duvarında bulunan lipopolisakkarid, kapsül polisakkaridi ve diğer polimerize moleküller sayılabilir. T bağımsız antijenlerin ortak özellikleri tekrarlayan polimerlerden ibaret moleküller olmalarıdır. Bu tip antijenler direkt olarak BCR'lere bağlanarak B hücrelerini aktive edebilirler. T-bağımsız antijenlerin bu özellikleri, tekrarlayan polimerlerin aynı anda birçok BCR'ye bağlanabilmesi ile açıklanır. Aynı anda birçok BCR'nin antijenle bağlanması da hücreyi uyaracak yeterli sinyali oluşturabilir ve en azından bazı B hücreleri çoğalabilir. T bağımsız antijenler, B hücrelerini uyarma mekanizmalarına göre TI-1 ve TI-2 olmak üzere iki gruba ayrılır. T bağımsız antijenlere karşı oluşan humoral immün yanıtın, T bağımlı antijenlere göre eksiklikleri şunlardır. T bağımsız antijenlerin büyük çoğunluğuna karşı immunolojik bellek gelişmez ve sekonder immün yanıt oluşmaz. T bağımsız antijenlerle tekrarlayan temaslarda bile antikor izotipi değişmez, yani sadece IgM üretilir. T bağımsız antijenlere karşı afinité maturasyonu olmaz, yani antikorun antijene bağlanma gücü başlangıçta ne düzeydeyse, o düzeyde kalır.

T bağımsız antijenlere karşı oluşan immün yanıtın zayıf yönleri olmasına rağmen vücut savunmasına nasıl katkıda bulunur?



Antikorların Görevleri

Direkt Etki: Toksin Nötralizasyonu

Birçok bakteri türü, patolojik etkisini salgıladığı toksinler ile gösterir. Tek bir toksin molekülü bir hücreyi öldürebilir. Bir toksinin etkisini gösterebilmesi için, özel bir kısmı ile konağın somatik hücrelerine bağlanması gerekir. Spesifik antikorlar toksinlerin bu özel kısmına bağlanarak, bunların konak hücrelerine tutunmalarını engellerler. Bu olaya *toksin nötralizasyonu*, böyle antikorlara *nötralizan antikor* denir. Dokulara hızla geçebilmeleri ve yüksek affiniteye sahip olmaları nedeniyle IgG, böyle toksinleri en iyi nötralize eden antikor sınıfıdır. Mukozal yüzeylerde aynı fonksiyonu sIgA yürütür. Ancak, tek bir dozda öldürücü olabilen bazı bakteri, böcek ve bitki toksinlerinin vücuda ilk girişinde nötralizan antikorların oluşumu çok yavaş kalır. Bunun için, böyle toksinlerin girdiği hayvanlara, başka hayvanlarda üretilen nötralizan antikorlar pasif olarak transfer edilir.

Direkt Etki: Virus nötralizasyonu

Konak hücrelerine girip çoğalabilmeleri için, virusların öncelikle özel yapıları ile hücre yüzeyine bağlanmaları gerekir. Virusların bu özel yapıları spesifik antikorlar ile kaplandığında, yani nötralize edildiğinde, viruslar konak hücre ile temas kuramaz, hücreye giremez ve dolayısıyla çoğalamaz. Virusların hücreye bağlanabilecek birçok molekülü olmasına rağmen, bazı durumlarda, tek bir antikorun bunlardan birine bağlanması virüsü girişini engellemeye yeter. Virus nötralizasyon fonksiyonunu vücut içinde çoğunlukla IgG, mukozal yüzeylerde sIgA gerçekleştirir.

Direkt Etki: Bakteriyel Adhezyon İnhibisyonu

Birçok bakterinin hastalık oluşturabilmesi için, adhezyon molekülleri ile konak hücrelerine bağlanması gerekir. Spesifik antikorlar bakterilerin adhezyon moleküllerini bloke ederse, böyle bakteriler hücrelere bağlanamaz ve patolojik etkilerini

gösteremez. Özellikle mukozal yüzeylerde söz konusu olan bu savunma mekanizmasında sIgA önemli bir role sahiptir. Aynı infeksiyon mekanizması vücut içinde ortaya çıktığında IgG de çalışır.

İndirekt Etki: Oponizasyon

Fagositik hücreler bazı bakterileri direk olarak fagosite edebilmelerine karşın, çoğu patojenik bakteriyi tek başlarına fagosite edemezler. Böyle patojenik bakteriler, ancak antikorlarla kaplandıklarında fagositoza duyarlı hale gelirler (opsonizasyon). Bakterileri kaplayan antikorların Fc kısımları, fagositik hücrelerdeki Fc reseptörlerine bağlanır ve bakterinin hücreye temasından sonra yutulması sağlanır. Oponik antikorlar genellikle IgG1 ve IgG2 alt sınıflarındandır. Helmint gibi parazitler ise fagosite edilemeyecek kadar büyüktürler. Özellikle IgE sınıfı antikorlar bunlara bağlandığında, antikorlar IgE için Fc reseptörü taşıyan hücrelere bağlanır, bunlar da sindirici enzimlerini parazitin üzerine boşaltırlar.

İndirekt Etki: Antikora Bağımlı Hücresel Sitotoksite

Viral infeksiyonlarda, infekte hücrelerin yüzeyinde sergilenen viral proteinlere karşı antikorlar oluşur. Bu antikorlar infekte hücrelerin üzerindeki viral proteinlere bağlandıklarında, Fc kısımları NK hücreleri üzerindeki Fc reseptörleri tarafından tanınır. Bu yolla bağlantı kuran NK hücreleri de enzimleri ile infekte hücreyi öldürür. Antikora bağımlı hücresel sitotoksite (ADCC) adı verilen bu olayda IgG1 ve IgG3 sınıfı antikorlar görev alır. Bu mekanizma, endojen antijenlerin ortaya çıktığı diğer infeksiyonlarda, tümörlerde ve organ nakillerindeki red olayında da çalışır.

İndirekt Etki: Komplement Aktivasyonu

Komplement sistemi patojenik mikroorganizmalara karşı savunmada en önemli mekanizmalardan birisidir. IgM ve IgG gibi immunglobulinlerin ağır zincirleri üzerinde komplement bağlanma bölgesi vardır. Bu bölge serbest antikorlarda kapalı durumda bulunur. Ancak bir antikor antijene bağlandığında, komplement bağlanma bölgesi açığa çıkar ve komplement sisteminin ilk proteini buraya bağlanarak zincirleme komplement reaksiyonları oluşur. Klasik komplement yolu olarak adlandırılan bu mekanizmada özellikle IgM çok etkilidir.

İndirekt Etki: Lokal Yangısal Reaksiyon Uyarımı

Mikroorganizmalar lokal bir infeksiyon oluşturduklarında, immun sistem hücrelerinin bu bölgeye çekilmesi gerekir. Bunu sağlayan mekanizmalardan biri aktive olan mast hücreleri tarafından ortama salınan kemotaktik maddelerdir. Diğer tüm hücrelerin ve antikor sınıflarının aksine, antijene bağlanmamış IgE mast hücrelerine bağlanabilir. Mast hücrelerinin aktive olabilmesi için, üzerlerinde bulunan Fc reseptörlerine Fc kısmı ile bağlanan IgE'nin spesifik antijen ile teması yeterlidir. Bu bağlanma sonucunda mast hücreleri içeriğini ortama boşaltır ve lokal yangısal reaksiyonları başlatır. Bu mekanizmanın en iyi örneği alerji olarak da bilinen tip I aşırı duyarlılık reaksiyonlarıdır.

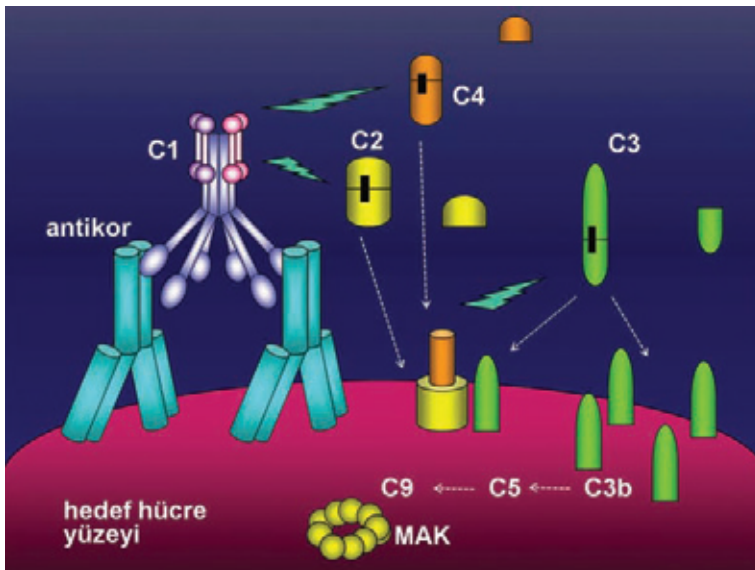
İndirekt Etki: B Hücre Fonksiyonlarının Düzenlenmesi

B hücreleri üzerinde antijen reseptörü olan BCR'lerden başka, Fc reseptörleri de (FcR) bulunur. BCR'lerin aksine, FcR'ler antijen tanınmasında çalışmazlar. Antijene bağlanmış bir IgG, B hücreindeki Fc reseptörüne bağlandığında, FcR hücreye inhibitör sinyaller yollar ve antikor sentezi yavaşlar. Bu, humoral immun yanıtın kontrol altında tutulmasını sağlayan mekanizmalardan biridir.

Komplement

Komplement sistemi, enzimatik özellikteki serum proteinlerinden ve bunların yan ürünlerinden oluşan, vücudun humoral savunmasında ve yangıda önemli rol oynayan bir proteinler topluluğudur. Birçok proteinden oluşmasına rağmen, bu sistem genellikle sadece komplement adı ile anılır. Komplement, zincirleme reaksiyon sistemi şeklinde çalışır. Bu sistemin özelliği, kontrol edilemediğinde vücuda önemli zararlar verebilecek kapasiteye sahip olmasıdır. Bu nedenle, komplement sistemlerinin proteinleri, normal serumda inaktif prekürsörler veya proenzimler halinde bulunurlar. Zincirleme reaksiyon sistemi bir kez aktive olduğunda, bir önceki basamakta oluşan ürünler, bir sonraki reaksiyon basamağının başlamasını sağlar ve reaksiyonlar zincirleme şekilde devam eder. Bu reaksiyonlar sırasında aktif hale geçen her bir molekülün, immunolojik veya biyolojik bir fonksiyonu vardır.

Komplement sistemi içinde 20'den fazla serum proteini bulunur. Bunların her biri numaralandırılmış C harfi ile (örn. C1, C2, C3, ..., C9), veya sadece büyük harflerle (örn. D, B, H, I, vb.) gösterilirler. Komplement moleküllerinin enzimatik aktivite sonucu ortaya çıkan alt birimleri C1s, C2a, C2b, C3a, C3b, vb. şeklinde gösterilirler. Komplement sistemi tek bir mekanizma ile çalışmaz. Komplement reaksiyonları, ilk basamağı uyaran etkenlere göre iki farklı mekanizma ile çalışmaya başlar; klasik yol ve alternatif yol. Bu iki farklı yol ile başlayan mekanizmalar, belli bir aşamaya kadar kendilerine has reaksiyonları yürüttükten sonra, ortak bir reaksiyon zinciri ile sonlanırlar. Bu ortak yola terminal yol denir. Farklı yollarda ortaya çıkan komplement parçalarının fonksiyonları aynıdır. Klasik yol, antikorun antijene bağlanması ve C1 parçasının antikora bağlanması ile başlar. Bu nedenle klasik yol humoral bağışıklık kapsamında değerlendirilir. Alternatif yolu sialik asit içermeyen mikroorganizmaların yüzeyinde bir döngü şeklinde başlar ve devam eder. Alternatif yol, spesifik antikorlar olmasa da başlayabildiği için, nonspesifik bağışıklık kapsamında değerlendirilir. Komplement aktivasyonu hangi yolla başlarsa başlamış olsun, C5 aşamasından sonra terminal yolla devam eder ve sonlanır. Diğer bir deyişle, terminal yol aslında klasik ve alternatif yollarının ortak olan son aşamasıdır. Terminal yolun sonunda membran atak kompleksi oluşur ve bu hedef hücre membranını lize ederek mikroorganizmayı öldürür (Şekil 8.7).



Şekil 8.7

Klasik komplement yolunun hedef hücre yüzeyinde aktivasyonu (antijen+antikor+C1), opsonin oluşumu (C3b) ve terminal yolla sonuçlanması (MAK).

Komplementin Görevleri

Opsonizasyon komplementin en önemli görevlerinden birisidir. Komplementin C3b parçası mikroorganizmaların yüzeyine bağlandığında, C3b reseptörlerine sahip olan makrofajlar ve nötrofiller tarafından daha kolay fagosite edilirler. İnfeksiyonun erken döneminde alternatif yoldan gelen C3b, geç dönemde klasik yoldan gelen C3b daha önemli rol oynarlar. *Lizis*, terminal yolun sonunda membran atak kompleksinin hedef hücre yüzeyinde delikler açması ile gerçekleştirilen etkili bir öldürme şeklidir. Komplement bu şekilde birçok bakteriyi, mantarı ve parazit hücrelerini öldürebilir. *İmmun komplekslerin uzaklaştırılması* önemli komplement fonksiyonları arasındadır. Eriyebilir antijenler antikorla birleştiğinde immün kompleksler oluşur ve bunların dokularda birikmemesi için vücuttan uzaklaştırılmaları gerekir. Bu işlevi makrofajlarla birlikte komplement gerçekleştirir. C3 ve reseptörleri, *immün regülasyon* mekanizmalarında da rol oynarlar. Bu işlev kapsamında B hücrelerinin uyarımı ve ek sinyal iletimi sayılabilir. Komplementin C3a ve C5a parçaları *kemotaktik etki* gösteren en önemli maddeler arasındadır. Bu parçalar eozinofiller, nötrofiller, bazofiller ve makrofajlar için kemotaktik özelliğe sahiptir. Komplementin, anaflatoksin olarak da bilinen C3a, C4a ve C5a parçaları lokal *yangı uyarımı* yaparlar. Bunlar damar geçirgenliğinin artmasına ve düz kas kasılmasına neden olurlar. Ayrıca mast hücre degranülasyonuna yol açarlar. Bu olaylar antikorların ve fagositik hücrelerin bölgeye akımını sağlar.

HÜCRESEL İMMUN YANIT

Tüm viruslar ve bazı bakteriler infekte ettikleri hücrelerin içinde yaşar ve çoğalırlar. Bunlar sadece uygun bir hücre bulmak için geçici bir süre hücre dışında bulunurlar. Hücre içinde ise antikorların bunlara ulaşması olanaksızdır. Bu nedenle, böyle mikroorganizmalar ancak içinde buldukları vücut hücrelerinin öldürülmesi ile etkisiz hale getirilebilirler. Bazı helmintlerin ve protozoonların da humoral immün yanıtla öldürülmesi zordur. Ayrıca, tümör hücrelerinin gelişimi sırasında, normal hücrelerde bulunmayan antijenler ortaya çıkar ve bu hücreler anormal (yabancı) olarak algılanırlar. Tüm bu etkenlere karşı savunmada en önemli görevi, güçlendirilmiş immün sistem hücreleri üstlenirler. Sitotoksik T lenfositleri tarafından yürütülen hücresel sitotoksite ve NK hücre sitotoksitesi, hücresel immün yanıt kapsamında değerlendirilir.

T Hücre Sitotoksitesi

Endojen Antijenlerin Sunulması

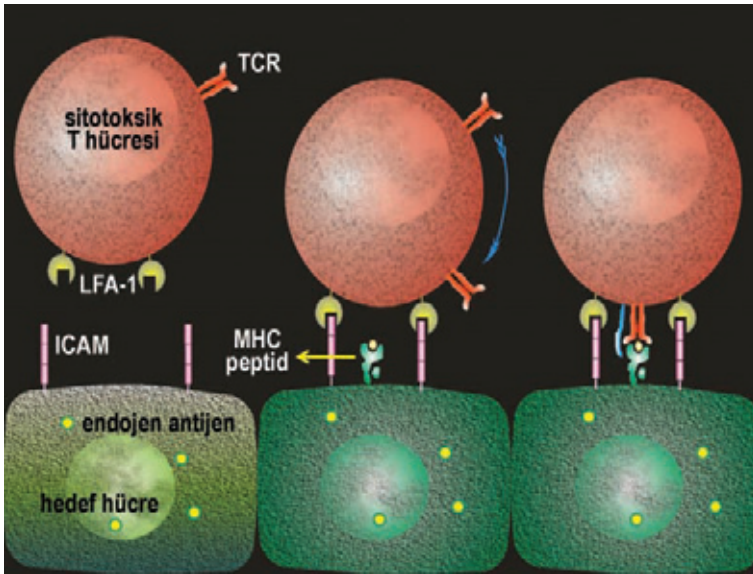
Viruslar zorunlu olarak hücre içinde çoğalan patojenlerdir. Bunlar bir hücreyi infekte ettiklerinde, kendi yapısal proteinlerini konak hücreye yaptırırlar. Endojen antijen niteliğindeki viral proteinler hücre içinde işlendikten sonra MHC sınıf I molekülleri ile birlikte hücre üzerinde sergilenir. Vücuttaki tüm çekirdekli hücreler MHC sınıf I molekülü taşıdıkları için, sitotoksik T hücrelerine endojen antijen sunabilirler. Antijen sunulması sırasında sitotoksik T hücresi üzerindeki CD8, antijen sunan hücrenin MHC sınıf I molekülüne bağlanır. İki hücre arasındaki ilişkinin kurulabilmesi için, CD8-MHC bağlantısının olması birinci koşuldur.

Sitotoksik T Hücrelerinin Aktivasyonu

Sitotoksik T hücreleri, antijenle temas etmeden önce naif CD8 T hücreleri olarak bulunurlar. CD8 T hücrelerin sitotoksik T lenfositleri haline geçebilmeleri için iki önemli uyarımı alması gerekir. Bunlardan birincisinde; anormal hücreler veya dendritik hücreler tarafından MHC sınıf I ile sunulan endojen antijenler, CD8 T hücreleri üzerindeki TCR'lere bağlanır. Sitotoksik T lenfositlerinin aktivasyonunu sağlayan en önemli ikinci faktör Interleukin-2'dir. IL-2'nin en önemli kaynağı da yardımcı T lenfositleridir. Bu hücreler tarafından salgılanan IL-2, doğrudan veya CD8 hücrelerde IL-2 üretiminin otokrin etki artmasını sağlayarak CD8 hücrelerin daha çok uyarımına neden olur. Bu uyarımları alan CD8 T hücreleri bölünür, bir kısmı sitotoksik T hücresi, bir kısmı sitotoksik bellek T hücresi haline geçer.

Sitotoksik T Hücrelerinin Adhezyonu

Aktive olan sitotoksik T hücrelerinin, hedef hücreler üzerindeki etkilerini gösterebilmeleri için bu hücrelere bağlanmaları gerekir. Sitotoksik T hücreleri hedef hücrelere önce nonspesifik adhezyon molekülleri ile bağlanırlar. Bu bağlantıyı, T hücresindeki LFA-1 ve hedef hücredeki ICAM gerçekleştirir. Hedef hücrede T hücresine spesifik antijen yoksa bu bağlanmanın önemi yoktur; T hücresi hücreye etkimeden ayrılır ve sıradaki hücreye geçer. Eğer hücre spesifik antijen taşıyorsa, aktive olan sitotoksik T lenfosit, TCR ve CD8 molekülü ile hedef hücre üzerindeki MHC-peptid kompleksine bağlanır (Şekil 8.8).

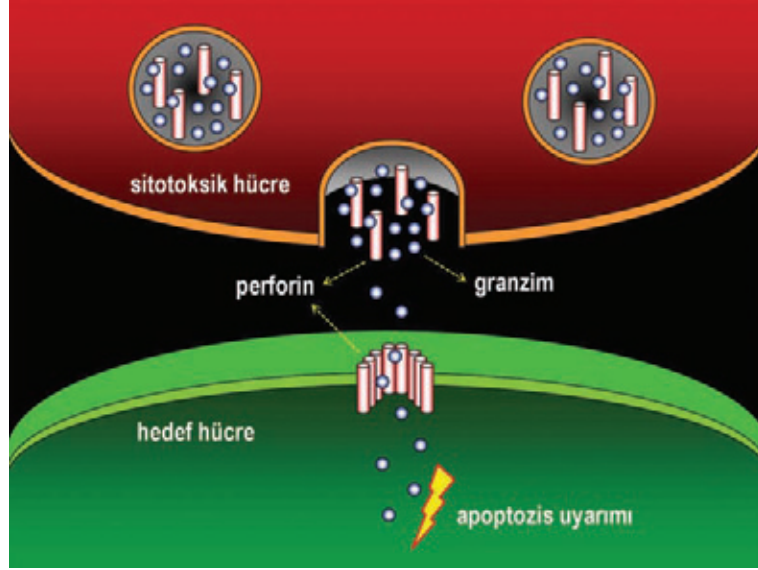


Şekil 8.8

Sitotoksik T hücrelerinin endojen antijen sunan infekte hücreyi tanıması ve aktive olması.

Şekil 8.9

Sitotoksik hücrenin hedef hücreyi perforin yoluyla öldürmesi.



Hedef Hücrenin Öldürülmesi

Sitotoksik T hücreleri tamamen uyarılıp hedef hücreye spesifik olarak bağlandıklarında bu hücreyi apoptozis mekanizmasıyla öldürürler (Şekil 8.9). Sitotoksik T hücreleri, en önemli fonksiyonları olan apoptozisi üç mekanizma ile gerçekleştirebilirler; perforin yolu, CD95 yolu ve TNF-beta yolu. Bunların arasında infeksiyonlarda vücut savunması için en çok kullanılan yol perforin yoludur. Sitotoksik T hücrelerinin tip I granülleri iki tip sitotoksin içerir; perforin ve granzim. Bu enzimler sitotoksik T hücrelerinin içindeki granüllerde salgılanmaya hazır şekilde bulunurlar. Sitotoksik T hücresi hedef hücreye bağlandıktan ve yüzey molekülleri ile gerekli uyarımı aldıktan sonra, bu enzimleri içeren granülleri hedef hücreye doğru boşaltılırlar. Perforinler, hedef hücre yüzeyinin lipid tabakasında silindir şeklinde açıklıklar oluşturur. (Doğal koşullarda perforinler hedef hücreleri tek başlarına öldürmezler. Granzimler, perforinlerin açtıkları porlardan hücre içine girerler ve programlı normal hücre ölümünde çalışan proteazları taklit ederek, endonükleazları harekete geçirirler. Endonükleazlar da hedef hücre DNA'sını 200 bazlık parçalara ayırırlar ve hücre ölür. Kısaca apoptozis olarak nitelenen bu mekanizmayla, sadece hücre öldürülmez, hücre içindeki viruslar da etkisiz hale getirilmiş olur. Sitotoksik T hücreleri hedef hücrelere bağlandıktan ve yüzey molekülleri ile gerekli uyarımı aldıktan sonra 5 dakika içinde etkilerini gösterirler. Sitotoksik T hücreleri enzimlerini hedef hücre üzerine boşalttıktan sonra, hücrenin ölümünü beklemeden hemen başka bir hücreye yönelirler ve hedefin yanındaki normal hücreleri de ayırt edebilirler.

İNERNET



Bağışıklık olayları ile ilgili çok sayıda resim ve animasyona, arama motorlarında “phagocytosis”, “cytotoxic T cells” ve “immune response” sözcükleri ile yapacağınız tarama ile ulaşabilirsiniz.

Sitotoksik T Lenfositlerinin Fonksiyonları

Sitotoksik T lenfositleri spesifik hücresel immün yanıtın en önemli hücreleridir. Çoğunluğu sitotoksite vasıtasıyla gerçekleştirilen efektör fonksiyonları şunlardır.

1. Sitotoksik T lenfositleri, virüsle infekte hücreleri apoptozis yoluyla öldürür. Sitotoksik T lenfositleri tarafından gerçekleştirilen apoptozis mekanizması viral infeksiyonlardaki en iyi savunma şeklidir. Çünkü, eğer infekte hücre başka bir mekanizma ile parçalanırsa, hücre ölmesine rağmen canlı virüsler çevreye yayılabilir. Apoptozis sırasında ise bir taraftan hücre ölürken, diğer taraftan endonükleazlar viral DNA'yı da parçalayarak viriyonun montajını, dolayısıyla virüsün sağlam hücrelere yayılmasını engeller.

2. Virüsler dışında, bazı hücre içi bakteriler ve bazı protozoonlar da eğer buldukları hücrede sitotoksik T lenfositlerini uyarabilecek değişiklikler yaparlarsa, bu hücrelerin sitotoksik etkisine maruz kalabilirler.

3. Sitotoksik T lenfositlerinin, tümör hücrelerinin öldürülmesinde ve yabancı doku transplantlarının reddinde önemli rolleri vardır. Tümör hücreleri üzerinde ortaya çıkan yeni tümör antijenleri endojen antijenler gibi işlem görür.

4. Sitotoksik T lenfositleri, T hücre gelişimini düzenler. Daha açık bir ifadeyle, timustaki gelişimleri sırasında otoreaktif T hücrelerini apoptozis yoluyla öldürürler. Bundan başka, erişkin dönemde ortaya çıkabilecek veya aktive olabilecek otoreaktif T hücrelerini de kontrol altında tutarlar. Bu fonksiyon supresyon (baskılama) olarak da bilinir. Geçmişte, bu fonksiyonu yürüten sitotoksik T lenfositleri ayrı bir hücre popülasyonu olarak kabul edilmiş ve supresör T hücreleri olarak adlandırılmıştır. Eğer bu fonksiyon yürütülemezse otoimmün hastalıklar ortaya çıkar. Sitotoksik T lenfositlerinin supresör fonksiyonu daha çok CD95 yoluyla gerçekleştirilir.

5. Sitotoksik T lenfositleri tarafından salgılanan bazı önemli sitokinler, direkt veya indirekt etkilere sahiptirler. IFN-gama direkt olarak virüslerin replikasyonunu önler. Ayrıca, hücre içi parazitleri öldürmesi için makrofajları aktive eder. TNF-alfa ve TNF-beta hedef hücrelerin öldürülmesini ve makrofajların aktivasyonunu sağlarlar.

NK Hücre Sitotoksitesi

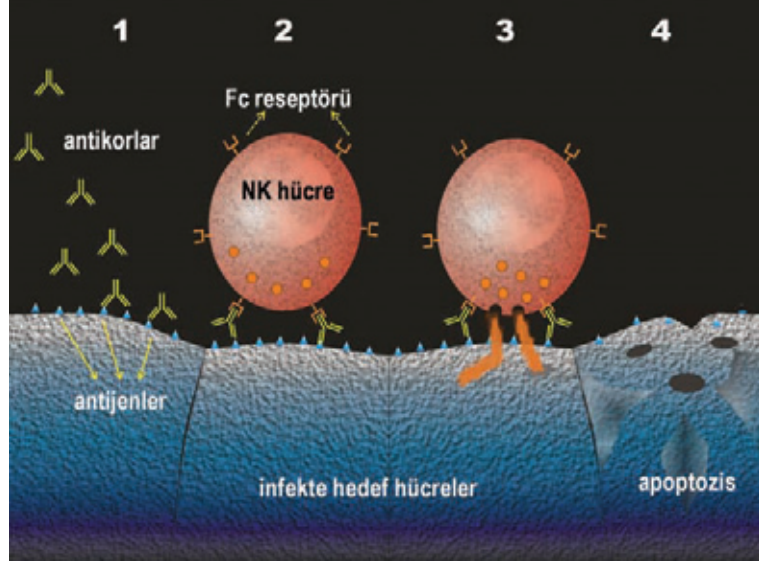
NK hücreler (natural killer/doğal öldürücü), spesifik antijen reseptörleri taşımamalarına karşın, anormal veya infekte hücreleri çeşitli mekanizmalarla öldürebilirler. Bu nedenle, nonspesifik savunma sisteminin önemli bir parçası olarak kabul edilirler. NK hücrelerinin, hedef hücreleri öldürme mekanizması sitotoksik T lenfositleri ile aynı olmasına rağmen, hedef hücreyi tanıma ve bağlanma yolları farklıdır. NK hücreleri, fonksiyonlarını iki farklı mekanizma ile gerçekleştirirler; antikora bağımlı hücrel sitotoksite (ADCC) ve direk sitotoksite.

Antikora Bağımlı Hücrel Sitotoksite (ADCC)

NK hücreler spesifik antijen reseptörleri taşımamalarına karşın, immunglobulinler için Fc reseptörlerine sahiptirler. Bu reseptörler IgG1 ve IgG3 sınıfı immunglobulinlerin Fc kısımlarına bağlanır. NK hücrelerin bu mekanizma ile tanıdıkları hedef hücrelerin başında virüsle infekte hücreler gelir. Bazı virüslerle infekte olan hücrelerin üzerinde virusa ait proteinler bulunabilir (Bunlar MHC sınıf I ile birlikte infekte hücre yüzeyinde sunulan endojen viral antijenlerden farklıdır). Spesifik antikolar bu viral antijenlere bağlandığında, Fc kısımları NK hücreleri üzerindeki Fc reseptörlerine bağlanır ve böylece hedef hücre ile temas sağlanır (Antijenle bağlanmamış durumdaki bir serbest antikor Fc reseptörüne bağlanamaz). Fc reseptörüne antikorun bağlanması, NK hücrelerine uyarım sinyali gönderir. Bundan sonraki öldürme aşamaları sitotoksik T hücreleri ile tamamen aynıdır; NK hücreler de hedef hücreleri, perforin yolunu kullanarak apoptozis yoluyla öldürür. ADCC, direkt T hücre sitotoksitesinden daha yavaş gelişir (Şekil 8.10).

Şekil 8.10

NK hücrenin ADCC mekanizması ile hedef hücreyi öldürmesi.



Direkt NK Hücre Sitotoksitesi

NK hücreleri, hücre içi patojenlerden ileri gelen infeksiyonların ve tümörlerin erken dönemlerinde ADCC'den farklı bir mekanizma ile direkt sitotoksik etki gösterebilirler. Antikorların kullanılmadığı bu mekanizma için, vücudun daha önce patojenle veya tümör hücresi ile karşılaşmış olması gerekli değildir. Direkt sitotoksik etki yolunun başlaması için NK hücrelerinin çeşitli sitokinler tarafından uyarılması gerekir. Bu mekanizma; sitotoksik T lenfositlerinden kaçmak için virusların hücrenin MHC sınıf I sentezini engellemesi, NK hücrelerinin de bu durumu algılaması esasına dayanır. NK hücreler bunun için farklı iki reseptör kullanır. NK hücreleri direkt sitotoksik mekanizmada da hedef hücreyi daha önce belirtilen apoptozis yolu ile öldürür. NK hücreleri, yukarıda anlatılan özelliklerinden dolayı, hücre içi patojenlerden ileri gelen infeksiyonlara ve tümör hücrelerine karşı savunmada önemli role sahiptirler. Ayrıca, diğer immun sistem elemanlarının henüz tam olarak faaliyet gösteremediği erken dönemlerde fonksiyonel olmaları, önemlerini daha da arttırmaktadır.

SIRA SİZDE



4

Hücresel bağışıklık hangi durumlarda vücut savunmasına katkıda bulunur?

Özet



Fagositoz olayını ve etkilerini açıklamak.

Fagositoz vücuda giren mikroorganizmaların ve yabancı maddelerin fagositik hücreler tarafından yutulmasıdır. Bu olay vücudun ilk ve en önemli nonspesifik savunma hatlarından birini oluşturur. Savunma amaçlı fagositoz daha çok nötrofiller ve makrofajlar tarafından yürütülür. Fagositoz olayı, kemotaksis, bağlanma, yutma ve öldürme aşamalarında gerçekleşir. Nötrofiller daha aktif hücrelerdir, erken dönemde fagositoza başlarlar ve öldürme güçleri daha fazladır. Makrofajlar fagositoza daha geç katılırlar ve öldürme güçleri daha azdır. Buna karşın, nötrofiller kısa süre yaşayıp az sayıda fagositoz yaparken, makrofajlar uzun ömürlü olup sürekli fagositoz yapabilirler. Vücuda giren her türlü yabancı madde, kandan ve lenften sekonder lenfoid organlarda ve akciğerde bulunan fagositik hücreler tarafından süzülür.



Antijen işlenmesi ve sunulmasını açıklamak.

Bazı antijenlere karşı bellekli ve etkili bir immun yanıtın oluşabilmesi için, antijenlerin hücre içinde işlenerek MHC molekülleri ile birlikte T lenfositlerine sunulması gerekir. Protein yapısındaki bu tip antijenlere T bağımlı antijen denir. Profesyonel antijen sunan hücrelere fagositoz yoluyla alınan ve ekzojen antijen olarak nitelenen antijenler, endozomal yolla işlenip MHC sınıf II molekülleri ile birlikte yardımcı T lenfositlerine sunulur. Bu olayın devamı humoral bağışıklıkla sonuçlanır. Hücrelere girip sitoplazmada serbest olarak bulunabilen ve endojen antijen olarak nitelenen antijenler sitozolik yolla işlenip MHC sınıf I molekülleri ile birlikte sitotoksik T lenfositlerine sunulur. Bu olayın devamı hücresel bağışıklıkla sonuçlanır. Vücuttaki her türlü bağışıklık olayının gerçekleşmesinde ve düzenlenmesinde, hücrelerarası iletişimi kuran sitokinlerin önemli rolleri vardır.



Humoral bağışıklığın gelişimini ve sonuçlarını açıklamak.

Humoral bağışıklık T bağımlı ve T bağımsız antijenlere karşı iki farklı şekilde gelişir. T bağımlı karşı immun yanıtın ilk aşamasında ekzojen antijenler işlenip MHC sınıf II ile birlikte yardımcı T lenfositlerine sunulur. Bu hücrelerin ürettiği sitokinler BCR vasıtasıyla antijeni doğrudan tanıyan B lenfositlerini uyarır. Uyarılan B lenfositleri hızla çoğalır, bir kısmı antikor üreten plazma hücresi, bir kısmı bellek B hücresi haline geçer. T bağımsız antijenleri B lenfositlerini direkt olarak uyarabilir; ancak T bağımlı antijenlerin aksine affinite maturasyonu, izotip değişimi ve bellek oluşmaz. Üretilen antikorlar toksin, virus ve bakterileri nötralize eder. Dolaylı olarak da fagositoz, komplement aktivasyonu, lokal yangı uyarımı ve ADCC olaylarına katılır. Bir antijenin immun sistem ile ilk temasında primer, sonraki temaslarında daha kısa süre içinde sekonder immun yanıt oluşur.



Hücresel bağışıklığın gelişimini ve sonuçlarını açıklamak.

Hücresel bağışıklık kapsamında T hücre sitotoksitesi ve NK hücre sitotoksitesi değerlendirilir. T hücre sitotoksitesinin ilk aşamasında endojen antijenler çekirdekli hücrelerin içinde işlenip MHC sınıf I molekülü ile birlikte sitotoksik T lenfositlerine sunulur. Sitotoksik T hücresi antijen sunan hücreyi hedef olarak tanır ve üzerine özel enzimlerini boşaltır. Bu enzimler de infekte hedef hücreyi apoptozis mekanizması ile öldürür. Apoptozis sonucunda hedef hücre parçalanmadan küçük birimlere ayrılır, dolayısıyla patojen çevreye yayılmaz. NK hücreleri hedef hücreleri nonspesifik yolla direkt olarak veya anti-kora bağımlı hücresel sitotoksite (ADCC) yoluyla öldürür. NK hücreleri de hedef hücreyi öldürmek için apoptozis yolunu kullanır. Hücresel bağışıklık virüslere, hücre içi bakterilere, tümörlere ve yabancı hücrelere karşı savunmada önemli role sahiptir.

Kendimizi Sınavalım

1. Nötrofillerin yaptığı fagositoz için aşağıdakilerden hangisi **söylenemez?**

- En erken devreye giren fagositik hücrelerdir.
- Raspiratorik yıkım mekanizmasını kullanırlar.
- Kandan dokulara geçebilirler.
- Opsonizasyon fagositozu artırır.
- Defalarca ve uzun süre fagositoz yapabilirler.

2. Aşağıdakilerden hangisi fagositozun aşamalarından biri **değildir?**

- Tanıma
- Kemotaksis
- Bağlanma
- Yutma
- Öldürme/sindirme

3. Antijenlerin işlenmesi ve sunum ile ilgili aşağıda tanımlanan olaylardan hangisi doğrudur?

- Ekzojen antijen MHC sınıf I molekülü ile yardımcı T hücrelerine sunulur.
- Ekzojen antijen MHC sınıf II molekülü ile sitotoksik T hücrelerine sunulur.
- Ekzojen antijen MHC sınıf II molekülü ile yardımcı T hücrelerine sunulur.
- Endojen antijen MHC sınıf II molekülü ile sitotoksik T hücrelerine sunulur.
- Endojen antijen MHC sınıf I molekülü ile yardımcı T hücrelerine sunulur.

4. Kemotaktik özellikteki sitokinler aşağıdaki grupların hangisinde yer alır?

- Lenfokin
- Monokin
- Büyüme faktörleri
- İnterferon
- Kemokin

5. Primer immün yanıtta daha çok hangi antikor sınıfı üretilir?

- IgA
- IgD
- IgE
- IgM
- IgG

6. Aşağıdakilerden hangisi antikorların indirekt fonksiyonlarından biri **değildir?**

- Opsonizasyon
- Toksin nötralizasyonu
- Lokal yangısal reaksiyon uyarımı
- B hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi
- Komplement aktivasyonu

7. Komplement reaksiyonlarının terminal yolu sonunda aşağıdakilerden hangisi gerçekleşir?

- Fagositoz
- Opsonizasyon
- Hedef hücre lizisi
- Aglütinasyon
- Apoptozis

8. Sitotoksik T lenfositleri antijenik uyarımdan önce hangi hücre olarak bulunur?

- CD4 T hücresi
- Naif CD2 T hücresi
- Naif CD4 T hücresi
- Naif CD8 T hücresi
- NK hücresi

9. Sitotoksik T hücreleri infeksiyonlarda en çok hangi öldürme yolunu kullanır?

- CD95 yolu
- Perforin yolu
- TNF-beta yolu
- Klasik yol
- Alternatif yol

10. Antikora bağımlı hücre sitotoksitesi hangi hücre tipi tarafından gerçekleştirilir?

- NK hücre
- Dendritik hücre
- Sitotoksik T hücresi
- Supresör T Hücreleri
- Bellek T hücresi

Kendimizi Sınavım Yanıt Anahtarı

1. e Yanıtınız yanlış ise “Fagositoz” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
2. a Yanıtınız yanlış ise “Fagositoz” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
3. c Yanıtınız yanlış ise “Antijen İşlenmesi ve Sunulması” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
4. e Yanıtınız yanlış ise “Antijen İşlenmesi ve Sunulması” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
5. d Yanıtınız yanlış ise “Humoral İmmun Yanıt” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
6. b Yanıtınız yanlış ise “Humoral İmmun Yanıt” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
7. c Yanıtınız yanlış ise “Humoral İmmun Yanıt” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
8. d Yanıtınız yanlış ise “Hücresel İmmun Yanıt” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
9. b Yanıtınız yanlış ise “Hücresel İmmun Yanıt” konusunu yeniden gözden geçiriniz.
10. a Yanıtınız yanlış ise “Hücresel İmmun Yanıt” konusunu yeniden gözden geçiriniz.

Sıra Sizde Yanıt Anahtarı

Sıra Sizde 1

MHC moleküllerinin polimorfik yapıda olması farklı birçok antijenin sunulmasına olanak verir. Bu durum enfeksiyonlara yanıt anlamında bireysel düzeyde bir avantaj sağlamaz. Çünkü her bireyin sahip olabildiği MHC çeşitliliği sınırlıdır. Ancak MHC polimorfizmi türlerin nesillerini sürdürebilmesi bakımından önemli yarar sağlar. Çünkü, bir popülasyonda MHC çeşitliliği çok olduğunda, o popülasyonda ölümcül enfeksiyonlara karşı etkili immün yanıt oluşturabilen bireyler mutlaka bulunacaktır. Hatta yeni bir enfeksiyon çıktığında bile bireylerin bazıları bu sayede hayatta kalacaktır. Bu da o türün neslinin devamını sağlayacaktır.

Sıra Sizde 2

Sitokinler istinasız olarak tüm bağışıklık olaylarında görev alır, ancak işlevleri 5 genel başlık altında toplanabilir. Sitokinler, immün sistem hücrelerinin tüm gelişim evrelerinde fonksiyonlara sahiptirler. Tüm immün sistem hücrelerinin kemik iliğindeki oluşumlarından, hücre hatlarına dönüşümlerine kadar geçen evrede belli sitokinler uyarıcı etki yaparlar. Bazı sitokinler viral enfeksiyonlara karşı direkt korunmayı sağlayarak ve bakteri-

lere karşı korunmayı sağlayan yangısal reaksiyonları başlatarak doğal bağışıklığı düzenlerler. Bazı sitokinler lenfositlerin gelişimi ve değişimini kontrol ederek hücre ve humoral immün yanıtı düzenlerler. İmmün kökenli yangısal reaksiyonların düzenlenmesi de sitokinlerin işlevleri arasındadır. Bazı sitokinler de immün sistem dışındaki hücrelerin yenilenmesini sağlar.

Sıra Sizde 3

T bağımsız antijenlere karşı oluşan immün yanıtın afinite maturasyonu, izotip değişimi ve bellek gibi özellikleri olmamasına rağmen vücut savunması için tamamen yetersiz olduğu söylenemez. Bu immün yanıt tipi mukozal patojenlere karşı acil koruma gerektiğinde önemli bir role sahip olabilir. Çünkü ilk kez karşılaşılan bir patojenin T bağımlı antijenlerine karşı oluşan primer immün yanıtın koruyucu düzeye çıkması 10-15 gün zaman alır. Ancak aynı patojenlerin T bağımsız antijenlere karşı 1-2 gün içinde antikorlar lokal olarak üretilmeye başlar. Bu da diğer tarafta immunolojik bellek oluşuncaya kadar enfeksiyonu kontrol altında tutmaya yardımcı olur.

Sıra Sizde 4

Hücresel bağışıklık, vücuda yabancı antijenlerin vücut hücreleri üzerinde bulunduğu veya MHC sınıf I molekülleri ile sunulduğu her olayda görev alır. Bu olayların başlıcaları viral enfeksiyonlar ve hücre içi bakteriyel patojenlerden ileri gelen enfeksiyonlardır. Ama aynı mikroorganizmalar vücuda ölü olarak verildiklerinde (örn. inaktif aşı şeklinde) hücresel immün yanıtı uyarmazlar. Hücresel bağışıklık tümörlere karşı savunmada da primer rol oynar. Çünkü tümör hücrelerinde vücuda yabancı olan yeni antijenler ortaya çıkar. Bunlara yönelik olarak gelişen hücresel immün yanıt tümör hücrelerini hedef alır ve muhtemelen birçok tümör gelişimini daha fark edilmeden sonlandırır. Hücresel bağışıklık, vücuda sokulan yabancı hücreleri uzaklaştırmak için de çalışır. Bu durum doku ve organ nakillerinde olumsuz sonuçlar doğurmasına karşın, immün sistemin bunu vücuda savunmak için yaptığını unutmamak gerekir.

Yararlanılan Kaynaklar

- Cruse, J.M., Lewis, R.E. (1998). **Atlas of Immunology**, Boca Raton: CRC Pres.
- Diker, K.S. (1998). **İmmunoloji**, Ankara: Medisan Yayınevi.
- Erganiş, O., İstanbulluoğlu, E. (1993). **İmmunoloji**, Konya: Mimoza Yayıncılık.
- Male, D., Brostoff, J., Rott, D.B., Roitt, I. (2008). **İmmünoloji**, Çev. T. İmir, Ankara: Palme Yayıncılık.
- Pastoret, P.P., Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A. (1998). **Handbook of Vertebrate Immunology**, San Diego: Academic Pres.
- Tizard, I.R. (2009). **Veterinary Immunology**, St. Louis: Saunders.

9

Amaçlarımız

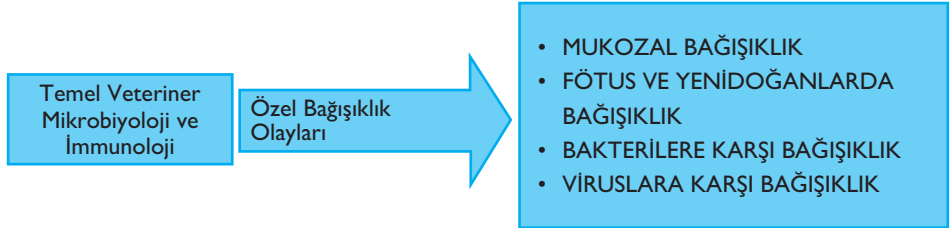
Bu üniteyi tamamladıktan sonra;

- Mukozal bağışıklığın unsurlarını ve işlevini açıklayabilecek,
- Fötüs ve yenidoğanlarda bağışıklığın gelişimini açıklayabilecek,
- Bakterilere karşı bağışıklığın gelişimini ve etkilerini açıklayabilecek,
- Viruslara karşı bağışıklığın gelişimini ve etkilerini açıklayabileceksiniz.

Anahtar Kavramlar

- Mukozal savunma
- Fötal savunma
- Antibakteriyel bağışıklık
- Antiviral bağışıklık

İçindekiler



Özel Bağışıklık Olayları

MUKOZAL BAĞIŞIKLIK

Sindirim, solunum, boşaltım ve üreme kanalları ile meme bezi ve gözün mukoz membranları vücudun dış çevreye açık yüzeyleridir. Bu nedenle, doğal koşullarda vücudun mikroorganizmalarla ve diğer antijenlerle ilk ve en çok karşılaştığı yerler mukozal yüzeylerdir. Eğer patojenler mukozal yüzeylerde yerleşme şansı bulurlarsa, gerek buralarda, gerekse vücuda girerek klinik infeksiyonlar oluşturabilirler. Patojenlerin mukozal yüzeylere yerleşmesi ve hastalık oluşturması, buralardaki spesifik ve nonspesifik savunma faktörleri tarafından önlenir. Mukozal savunma mekanizmaları bir çok orijinal özelliğe sahiptir ve sistemik immün yanıtta farklılıklar gösterir.

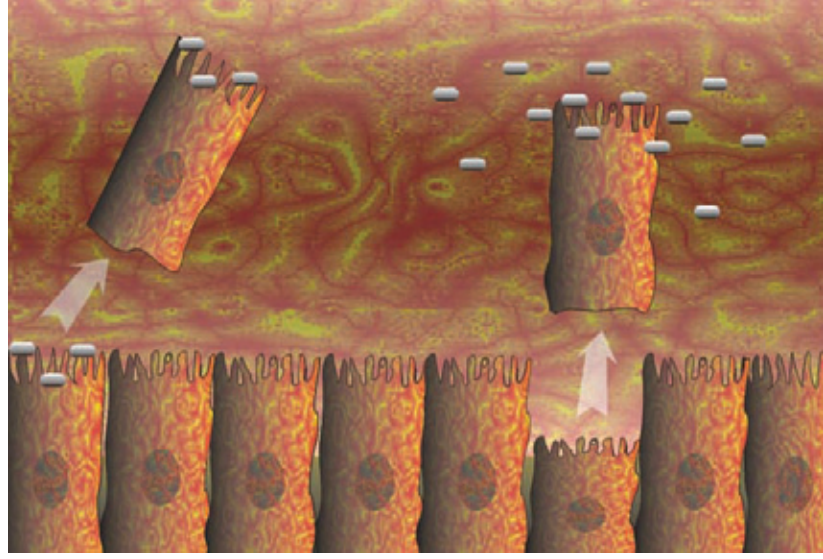
Doğal Savunma Mekanizmaları

Sindirim Kanalı

Epitel bariyeri en önemli savunma mekanizmalarından birisidir. Bağırsak epitel hücreleri aktif olarak sürekli yenilenir. Mukozal odaklarda oluşan hücreler, villuslara geçer, olgunlaşır ve buradan bağırsak boşluğuna bırakılır (Şekil 9.1). Hücre yenilenmesinin mukozal savunmaya yaptığı katkı şu şekilde açıklanır; bağırsak lumenindeki patojenler mukozaya ulaşmadan bu serbest enterositlerle karşılaşır, bunlara bağlanırlar ve birlikte dışkı ile atılırlar. Böylece bağırsak boşluğuna bırakılan hücreler bir yem gibi kullanılmış olurlar. Ayrıca, patojenlerin bağlandığı anda da mukozadaki hücreler bağırsak boşluğuna bırakılabilir. Barsağın belli aralıklarla yaptığı *peristaltik hareket*, ince bağırsaktaki mikroorganizma sayısını azaltan en önemli faktörlerden birisidir. Bu yolla, bağırsak lumeninde serbest halde bulunan veya enterositlere bağlanmış patojenler vücut dışına doğru itilir. *Mide asitliği* ağız yoluyla giren mikroorganizmaların barsağa ulaşmasını önleyen önemli bir engeldir. Düşük pH direk olarak mikrobisidal etki gösterir. Bu etki pH 3-4 arasında oldukça yüksek, pH 3'ün altında ise tamdır. Mikroorganizmalar, süt gibi mide asitliğini gideren gıdalar ile birlikte alındıklarında veya gıda kitlesinin tam sindirilemeyen orta kısmında kaldıklarında bu engeli aşarak bağırsaklara geçebilirler. *Safra asitleri* lipid kapside sahip viruslar ve bazı bağırsak patojenlerini inaktive edebilir.

Şekil 9.1

Epitel yenilenmesi ile patojenlerin mukozal hücrelerden uzaklaştırılması.



Mukoz membranların yüzeyini kaplayan *mukus tabakası* diğer fonksiyonları yanında, mikroorganizmalara karşı savunmada da önemli bir role sahiptir. Mukus, kıvam olarak çok yoğun bir maddedir; mikroorganizmalar mukus tabakasını geçerek epitel hücrelerine kolayca ulaşamaz. Ayrıca, mukusu oluşturan maddeler içinde epitel hücrelerinin bakteri reseptörlerine benzer moleküller bulunur. Bakteri bunlara bağlandığında, mukozal hücrelere bağlanamaz. Ağızdan başlamak üzere bağırsakların sonuna kadar tüm sindirim kanalında çeşitli nonspesifik *antimikrobiyal maddeler* bulunur. Bunlardan en önemli olan lizozim enzimi tükürükte ve bağırsak salgısında bulunur. Lizozim, özellikle Gram pozitif bakterileri ve bazı virüsleri nonspesifik olarak öldürür. Bağırsak mukozasındaki panet hücreleri ve makrofajlar, bakteriler için toksik olan kriptidin ve defensin grubu maddeleri bağırsak boşluğuna salgırlar. Bağırsak ve tükürük salgısında bulunan laktoperoksidaz sistemi birçok bakteri üzerinde toksik etki gösterir. Bağırsak salgısında bulunan laktoferrin, bakterilerin üremesi için gerekli serbest demiri bağlayarak etkili olur.

Sindirim kanalında onlarca farklı mikroorganizma türünden oluşan bir *mikroflora* bulunur. Bu dengeli mikroflora kendi içindeki bir mikroorganizmanın ön plana çıkmasına izin vermediği gibi, patojenlerin barsağa yerleşmesini de önler. Normal flora bakterileri, bağırsaktaki sınırlı besin kaynağı için patojenik organizmalarla yarışa girerek, bunların çoğalmalarını sınırlarlar. Bu olaya kompetatif eksklüzyon (yarışla dışlama) da denir. Ayrıca, normal flora bakterileri patojenler üzerinde toksik etki yapan çeşitli inhibitör maddeler salgırlar. Normal flora bakterilerinin metabolizma ürünleri ve bununla sağlanan düşük pH patojenlerin üremesini engeller. Normal flora bağırsak peristaltliğini arttırarak indirekt yolla da etki eder. Bunlara ek olarak, immün sistemin doğal gelişimi normal floranın yaptığı sürekli uyarıma bağlıdır. Bağırsak florası çeşitli nedenlerle bozulduğunda normal koşullarda hastalık oluşturmayan etkenler bile hastalık oluşturabilir.

Solunum Sistemi

Akciğer vücudun içi ile en yakın bağlantılı mukozal yüzeydir. Sindirim sistemindeki epitel bariyeri, mukozal enzimler, mukus ve normal mikroflora üst solunum yollarında da vardır ve benzer mekanizmalarla doğal savunmaya katkıda bulunurlar. Ancak, solunum sisteminin havayı filtre eden ek savunma mekanizmalarına gereksinimi vardır. Üst solunum sisteminin hava yolları, ince rulo tarzındaki turbinatlar dan oluşmuştur ve bunlar havanın geçişi sırasında bir turbulans oluşturur. Hava turbulansı mikroorganizmaları ve yabancı partikülleri mukozal duvarlara doğru iterek mukusa yapışmalarını sağlar. Bu şekilde 10-15 µm'den büyük partiküller üst solunum yollarında tutulur. Benzer şekilde havanın bronşiolardan geçişi sırasında oluşan turbulans yabancı partikülleri bronşiyal duvarlardaki mukusa iter ve yapıştırır. Bu şekilde de 5 µm'den büyük olan partiküller tutulur. İçinde mikroplar ve partiküller biriken mukus kirpikli epitel hücrelerinin kirpik hareketleri ile taşınır ve dışarı atılır. Alveollere kadar inebilen 3-5 µm'den küçük mikroorganizmalar ise burada alveolar makrofajlar ve nötrofiller tarafından fagosite edilirler. Bu hücreler de daha sonra mukusa karışıp aynı yolla atılırlar.

Ürogenital Sistem

Erkek genital kanalı anatomik yapısı nedeniyle savunma faktörlerine gereksinim duymaz, doğal savunma faktörleri daha çok dişi genital kanalı için gereklidir. Lizozim, laktoferrin ve laktoperoksidaz gibi enzimler ve mukus, dişi genital kanalının önemli savunma faktörleridir. Ayrıca, vagina kalıcı bir mikrofloraya sahiptir. Erişkin dişilerde, vagina duvarındaki hücreler döküldüğünde, vagina florasını oluşturan laktobasillere besin kaynağı olurlar. Laktobasiller de laktik asit üreterek ve ortamın pH'sını düşürerek, patojenlerin vaginaya yerleşmesini engellerler. Üriner sistemin ise en önemli ve başlıca savunma mekanizması idrar akışıdır. İdrarın akışı, patojenlerin alt idrar kanalından böbreğe doğru ilerlemelerini engeller. Eğer herhangi bir nedenle idrar akışı çok azalır veya durursa, idrar kanalları, hatta böbrek, infeksiyonlara duyarlı hale gelir. Ayrıca, düşük pH'lı idrar da mikroorganizmaların üremesini önleyen diğer bir faktördür. İdrar kanallarında antimikrobiyal enzimler de bulunmasına rağmen, idrarın boşalmasıyla miktarları sürekli azaldığından doğal savunmada önemleri yoktur.

Meme Bezi

Hemen tüm meme infeksiyonları meme başı kanalından köken alır. Süt vermeyen hayvanlarda meme başı kanalı keratin ile kaplıdır ve normal koşullarda mikroorganizmaların geçişine izin vermez. Süt veren hayvanlarda ise memenin doğal savunmasını diğer mekanizmalar sağlar. Sütün memeden periyodik olarak boşalması önemli bir savunma mekanizmasıdır. Memeye girip üreyen patojenlerin çoğu sütle birlikte tekrar dışarı atılırlar. Sütte bulunan çeşitli antimikrobiyal maddeler de savunmaya yardımcı olurlar. Sütte bulunan komplement, lizozim, laktoferrin ve laktoperoksidaz gibi maddelere ortak olarak lakteninler adı verilir. Sütte bulunan nötrofiller de nonspesifik savunmada önemli bir role sahiptirler.

Mukozal Yüzeylerdeki Lenfoid Dokular

Mikroorganizmalarla sürekli temasta olmalarından dolayı, mukozal yüzeylerde çok miktarda lenfoid doku bulunur. Mukozal yüzeylerdeki bazı lenfoid dokular, immün yanıtı gerçekleştirmek için gerekli tüm elemanlara sahiptirler. Bu dokular ara-

sında, farinksteki tonsiller, bağırsaktaki Peyer plakları, müstakil lenfoid düğümler, apendiks ve akciğerdeki lenfoid düğümler sayılabilir. Bağırsaktaki lenfoid foliküller, Peyer plakları ve müstakil lenfositler *GALT*, akciğerdeki bronşlarla ilişkili lenfoid doku ise *BALT* olarak nitelenir. Vücuttaki tüm mukoz membranlarda bulunan lenfoid doku ise *MALT* olarak adlandırılır. Mukozal lenfoid dokular, fonksiyonlarına göre iki kategoriye ayrılabilirler: antijenlerin işlendiği ve immün yanıtın başlatıldığı uyarıcı odaklar ve antikorların üretildiği ve hücresele bağışıklığın geliştiği efektör odaklar.

Uyarıcı Odaklar

Lenf nodüllerinin aksine, uyarıcı lenfoid odaklar antijeni lenf dolaşımından değil, doğrudan mukoz membranların boşluğundan alır. Tüm bu lenfoid dokular, kısmen de olsa, sistemik immün sistemden bağımsız olarak çalışır. Mukozal yüzeylerde uyarılan B lenfositleri, barsağın lenfoid dokusu arasında, hatta solunum sistemi, meme ve salgı bezleri arasında dolaştığı için, bunlar mukozal immün sistemin bir parçası olarak da kabul edilirler. Bağırsak savunmasında jejunal Peyer plaklarının önemli rolü vardır. Peyer plaklarının üzeri, M hücreleri olarak adlandırılan özel epitel hücrelerini de içeren bir epitel tabakası ile kaplanmıştır. M hücreleri antijen işleyen hücrelerdir ve bağırsak boşluğundan aldıkları antijenleri doğrudan yardımcı T lenfositlerine veya intraepitelyal lenfositlere (IEL) sunarlar. Ayrıca, dendritik hücreler ve enterositler de antijen işler ve IEL'lere sunarlar.

Efektör Odaklar

Peyer plakları çok sayıda lenfosit içermesine karşın, IgA'nın büyük çoğunluğu mukoz membranlara yayılmış lenfoid foliküller ve tek tek bulunan plazma hücreleri tarafından üretilir. Bağırsak duvarındaki B hücreleri antijene, vücuttaki diğer B hücreleri ile aynı şekilde yanıt verirler; reseptörleri ile antijenik uyarımı alır, bölünür ve bir kısmı plazma hücresine dönüşür. Uyarılan B ve T hücrelerinin bir kısmı bölgesel lenf nodüllerine ve bağırsak lenf damarlarına göçer. Buralardan da lenf ve kan dolaşımına geçerler. Dolaşımdaki IgA sentezleyen B hücrelerinin, vücuttaki tüm mukozal yüzeylere ilgisi vardır. Dolayısıyla, antijenik uyarımı bağırsakta alan bir B hücresi sadece bağırsağın lenfoid dokusunda dağılmakla kalmaz, meme, solunum ve ürogenital sistem mukozalarına da göçer. Böylece, örneğin bağırsaktaki bir antijene karşı oluşan antikor yanıtı sonucu, bağırsakla birlikte meme, solunum ve ürogenital sistem mukozalarında da antikor üretilir. Bağırsak lenfoid dokusunun efektör kısmının önemli bir bölümü T hücreleri içerir. Ayrıca, bağırsak epitel hücrelerinin arasında ve hemen altında intraepitelyal lenfositler (IEL) bulunur. Bunlar mukozada fonksiyon görmek üzere özelleşmiş farklı bir T hücre popülasyonudur.

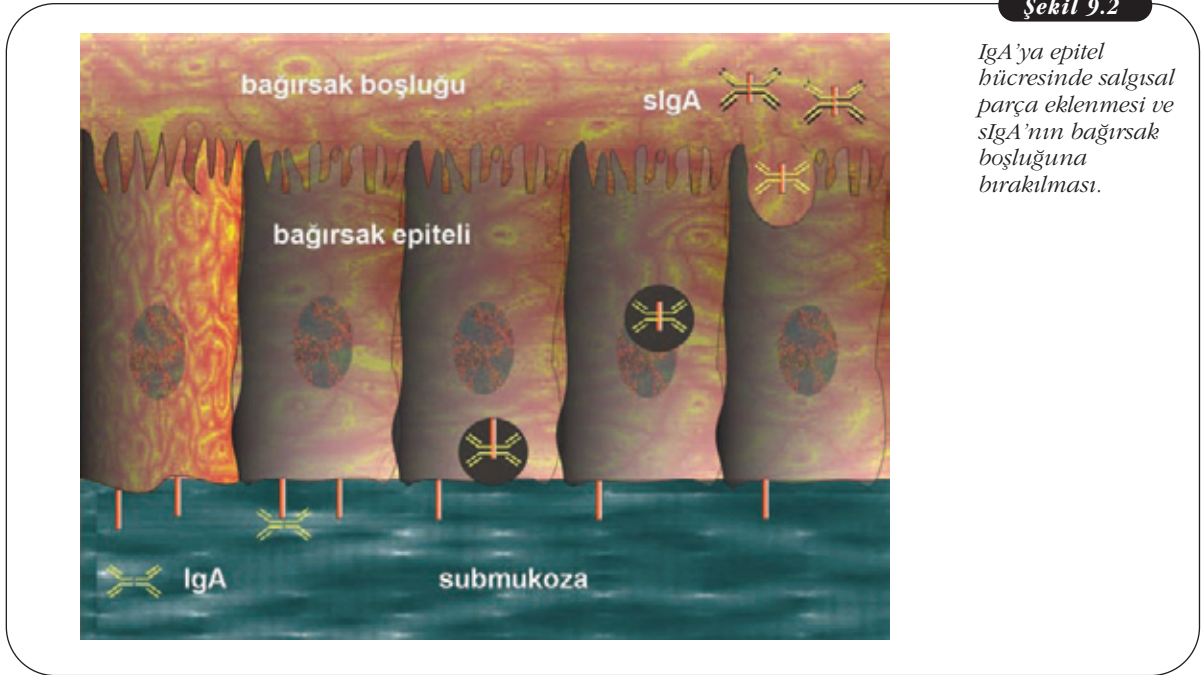
Mukozal Yüzeylerde Humoral Bağışıklık

İmmunglobulin A

IgA tüm mukozal salgılarda en çok bulunan immunglobulin sınıfıdır (ruminant barsağı ve memesi dışında). Tükürük, bağırsak, burun ve trahea salgıları, gözyaşı, kolostrum ve genital sekresyonlarda oldukça yüksek konsantrasyonda sIgA bulunur. Mukozal yüzeylerde IgA sentez mekanizması, immunglobulinlerin sistemik sentez mekanizmasından farklı değildir. M hücreleri, B hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücreler tarafından işlenen antijenler yardım-

Efektör: Hedeflenen sonuca varan, işi bitiren.

cı T hücrelerine (Th2) sunulur. Aktive olan Th2 hücreler salgıladıkları sitokinlerle B lenfositlerini IgA ve IgE sentezlemek üzere uyarır. IgA, barsağın submukozasında yerleşmiş plazma hücreleri tarafından sentezlenir ve salgılanır. Bu aşamada, plazma hücrelerinden çıkan IgA dimer formundadır. Dimerik IgA, bağırsak epitel hücrelerinin alt yüzünden salgısal parça ile birlikte alınır ve hücrenin üst yüzünden barsağa bırakılır (Şekil 9.2).



Şekil 9.2
IgA'ya epitel hücrelerinde salgısal parça eklenmesi ve sIgA'nın bağırsak boşluğuna bırakılması.

Bağırsaktaki patojenler tarafından uyarılıp IgA üreten B hücreleri, dolaşıma geçerek diğer mukozal dokulara taşınabilirler. Buralarda yerleşen hücreler bağırsaktaki gibi antikor sentezlemeye devam ederler. Diğer bir deyişle, bağırsaktaki bir patojene karşı memede, solunum sisteminde ve ürogenital kanalda da IgA üretilir. sIgA'nın en önemli fonksiyonu nötralizasyon yoluyla bakterilerin ve virusların epitel hücrelerine bağlanmasını önlemektir. Epitel hücrelerine bağlanamayan patojenler vücuda zarar vermeden bağırsaktan atılırlar. Bu mekanizmaya *immun dışlama* da denir. IgA bağırsak boşluğundan başka mukoza altında ve göç geçirdiği epitel hücreleri içinde de mikroorganizmalara bağlanabilir. Mukozal yüzeylerdeki IgA yanıtının önemli bir özelliği, immunolojik belleğin gelişmemesidir. Çünkü IgA sentezleyen hücreler, mukozal lenfoid dokularda, bellek hücresi haline geçmek için gerekli uyarımları alamazlar.

İmmunglobulin E

Patojenler IgA engelini aşarak submukozaya geçerlerse, IgE ile karşılaşılır ve IgE'nin düzenlediği immun reaksiyonlar başlar. IgE üreten hücreler, dalak ve lenf nodüllerinden çok vücut yüzeylerindeki lenfoid dokularda bulunur. IgE yoluyla savunma mekanizması IgA'dan farklıdır. Mukozal lenfoid dokularda üretilen IgE'nin çoğu, mukozadaki mast hücrelerinin yüzeyine Fc kısmı ile bağlanır. Antijen mast hücrelerinin üzerindeki IgE'ye bağlandığında, mast hücre granüllerindeki **vazoaktif** maddeler ortama boşalır. Bu vazoaktif maddeler damar geçirgenliğini artırarak, çok miktarda IgG ve yangı hücresi içeren sıvının geçişine neden olur. Böylece böl-

Vazoaktif: Damar çeperinin geçirgenliğini arttıran, damara etkili olan

gesel bir akut yangı tablosu gelişir. IgE tarafından düzenlenen savunma mekanizması *immun eliminasyon* olarak da nitelenir.

İmmunglobulin G

Mukozal savunmada IgG'nin rolü daha çok ruminantlarda önemlidir. Ruminantlarda, tüm mukozal yüzeylerde yüksek düzeyde IgG bulunur. Ayrıca IgG, tüm hayvan türlerinin bronş salgılarında orta düzeyde, diğer mukozal yüzeylerinde düşük düzeyde bulunur. IgG de, fonksiyonlarını immun eliminasyon mekanizması ile yürütür. Diğer bir deyişle, eğer fonksiyon gördüğü yüzeyde komplement varsa aktive eder, fagositik hücre varsa opsonizasyon yapar, sitotoksik hücre varsa ADCC mekanizmasını başlatır.

İmmunglobulin M

Bağırsaktaki mukozal lenfoid dokuda sentezlenen IgM epitel hücreleri vasıtasıyla mukoza boşluğuna taşınabilir. Ancak yapısı nedeniyle, IgM mukoz boşluklardaki enzimlerin etkisine çok duyarlıdır. Bu nedenle erişkinlerde IgM'nin mukozal yüzeylerde önemli bir fonksiyonu yoktur. Ancak, yenidoğanların mukoz membranlarındaki en önemli immunglobulin sınıfı IgM'dir. Bunun bir nedeni, yenidoğanların antijenlerle ilk kez karşılaşmaları ve primer immun yanıtta IgM'lerin baskın olması; diğer nedeni bağırsaktaki enzim aktivitesinin düşük olması nedeniyle IgM'nin parçalanmadan fonksiyonunu yürütebilmesidir.

Mukozal Yüzeylerde Hücresel Bağışıklık

Mukozal yüzeylerde çeşitli hücresel savunma mekanizmaları yürütülür. Bu mekanizmaların tümünü bağırsak mukozasında görmek mümkündür. Bağırsak mukozasında en yaygın olarak bulunan ve antijenle ilk teması yapanlar, intraepitelyal lenfositlerdir. IEL'ler epitel hücreleri arasında ve altında bulunurlar. IEL'ler, M hücreleri veya epitel hücreleri tarafından işlenen antijenleri tanıdıkları gibi, hiç işlenmemiş antijenlere de TCR ile doğrudan bağlanabilirler. TCR ile antijenlere bağlandıklarında ürememelerine rağmen, çeşitli efektör fonksiyonlar yürütürler. IEL'ler bağırsak lumenindeki parazitler ve bakteriler üzerinde direkt sitotoksik etki gösterebilirler. NK hücreleri gibi ADCC mekanizmasında çalışabilirler. Bazı IEL'ler, kontrasupresör aktivite göstererek, gıda kökenli antijenlere karşı vücudun genelinde bir tolerans varken, bağırsak mukozasında bu antijenlere karşı immun yanıt oluştururlar. Mukozal dokularda ayrıca sitotoksik T lenfositleri ve NK hücreleri de bulunur. Bu hücreler sitotoksite ve ADCC gibi işlevlerini yürütürler.

SIRA SİZDE



Gıda kökenli proteinler de vücuda yabancı antijenler olmalarına rağmen, normal koşullarda bunlara karşı neden bağışıklık oluşmaz?

Deride Savunma ve Bağışıklık

Deri mukozal bir organ değildir, ancak dış çevreye ve mikroorganizmalara en açık vücut yüzeyi ve en önemli fiziksel bariyerdir. Derideki savunma ve bağışıklık olayları, derinin sadece kendisini değil, aynı zamanda vücudu savunmak için gereklidir.

Doğal Savunma Mekanizmaları

Deri histolojik yapısı nedeniyle, mikroorganizmalara ve çevresel antijenlere karşı önemli bir fiziksel engeldir. Derinin çok katlı histolojik yapısı içindeki hücre organizasyonu, normal koşullarda birçok mikroorganizmanın girişine izin vermez. De-

rinin en önemli doğal savunma faktörlerinden biri, yağ asitleridir. Bunlar birçok bakteri üzerinde direkt etki yapar. Ayrıca, yağ asitleri derinin pH'sını düşürerek birçok mikroorganizmanın üremesini engeller. Deri salgılarında ayrıca bakterisidal enzimler de bulunur. Deri epidermisindeki epitel hücreleri, bağırsak mukozasında olduğu gibi sürekli yenilenir. Bu da keratinositlere bağlanabilen patojenlerin derinin alt katmanlarına geçme fırsatı bulmadan uzaklaştırılmalarını sağlar. Derinin kuruluşu da mikroorganizmaların üremesini engelleyen diğer bir mekanizmadır. Derinin yerleşik mikroflorası patojenlerin deriye yerleşmesini engeller.

Deride Bağışıklık

Deri genel yapısı itibarıyla katı bir doku olduğundan, daha çok hücresel bağışıklık olayları ön plana çıkar. Derinin, immun yanıtta rol oynayan hücreler keratinositler, Langerhans hücreleri, intraepidermal lenfositler, makrofajlar ve plazma hücreleridir. Mikroorganizmalar veya diğer ekzojen antijenler, derinin doğal savunma engellerini aşıp epidermise veya dermise girdiklerinde; 1) intraepidermal lenfositler tarafından direk sitotoksik etkiye maruz kalırlar, 2) Langerhans hücreleri, keratinositler veya makrofajlar tarafından işlenirler. Keratinositler ve makrofajlar antijenleri derideki T lenfositlerine sunarken, Langerhans hücreleri lenf düğümlerine göçer ve antijenleri buradaki CD4 hücrelerine sunarlar. Böylece, deriden giren antijene karşı hem lokal immun yanıt, hem de sistemik immun yanıt oluşur. Lokal immun yanıt daha çok hücresel ağırlıklı reaksiyonları kapsarken, sistemik immun yanıtta antijene karşı antikolar da oluşturulur. Bölgesel lenf yumrularında oluşturulan IgG ve IgM serumdan deriye geçerken, IgA sentezi deride lokal olarak gerçekleşir. IgA özellikle ter salgısında yoğun olarak bulunur. Ayrıca, belirli antijenlere karşı IgE yanıtı ön plana çıkabilir.

FÖTUS VE YENİDOĞANLARDA BAĞIŞIKLIK

Fötusda İmmun Sistemin Gelişimi

Memeli hayvanların fötusunda immun sistemin gelişimi belirli bir sıra izler. Hayvan fötuslarında immun sistem elemanlarının gelişim sırası aynı olmasına rağmen, gelişim zamanları türün gebelik süresine bağlıdır. Gebelik süresi kısa olan hayvanlarda, immun sistemin gelişimi daha hızlıdır, ancak doğuma kadar tüm gelişim tamamlanamayabilir. Gebelik süresi uzun olan hayvanlarda, immun sistemin gelişimi nispeten daha yavaş olmasına rağmen, doğuma kadar tüm gelişim tamamlanır. Sığır fötusunun lenfoid organları, gebelik sürelerine göre nispeten erken dönemde gelişir. Sığırların gebelik süresi 240 gün olmasına karşın, timus 40. günde farkedilebilir. Kemik iliği ve dalak 55. günde görünür. Lenf nodülleri 60. günde bulunmasına karşın, Peyer plakları 175. günde ortaya çıkar. Periferal kan lenfositleri 45., IgM taşıyan B hücreleri 60. ve IgG taşıyan B hücreleri 135. günlerde saptanabilir. Sığır fötusu virüslere karşı en erken 73. günden itibaren immun yanıt oluşturabilir. Çeşitli **mitojenlere** karşı 75-80. günlerde immun yanıt oluşturulabilir. Sığır fötusunun kan nötrofilleri ve monositleri gebeliğin 130. gününde ortaya çıkar. Sığır fetal serumunda 75. günden itibaren litik aktivite görülür ve 90. günde komplement düzeyi ölçülebilir hale gelir. Diğer hayvan türlerinin fötuslarında da immun sistem organ ve hücrelerinin gelişimi aynı sırayı izler.

Mitojen: B lenfositlerini nonspesifik olarak uyararak, çok sayıda lenfosit soyunu uyaraabilen antijen.

Fötal Savunma Mekanizmaları

Fötüs tamamen savunmasız olmamasına karşın, infeksiyonları yenme güçleri erişkinlerden daha düşüktür. Komplemant aktivitesi fötal yaşamın nispeten erken dönemlerinde ortaya çıkmasına rağmen, hiçbir zaman erişkin düzeyinde olamaz. Evcil hayvanların lökositleri fagositoz yapma yeteneğini gebeliğin son dönemlerinde tam olarak kazanırlar. Ancak, bu hücrelerin öldürme güçleri zayıftır. Fötal immun sistemin nisbi yetersizliğinin nedenleri, tam olgunlaşmaması, organize olamaması ve intrauterin yaşamda karşılaşacağı her türlü etkeni ilk kez tanıyor olmasından kaynaklanır. Ayrıca, doğuma yakın zamanlarda artan glukokortikoid düzeyleri, immun sistem hücrelerinin aktivitelerini daha da kısıtlamaktadır. Bütün bunların sonucu olarak, erişkinlerde çok hafif seyreden veya hiç görülmeyen infeksiyonlar, fütusta çok şiddetli seyredip öldürücü olabilir.

Genelde, fötal dönemde mikroorganizmalara verilen yanıt, fütusun immunolojik gelişim düzeyi, yani fütusun yaşı ile ilişkilidir. Fötal infeksiyonlar üç temel seyir izleyebilir. 1) Eğer fütusun immun sistemi henüz tam fonksiyonel hale gelmeden patojen bir mikroorganizma ile karşılaşır, önemli doku tahribi ve ardından ölüm gelir. Bu durum gebelin erken dönemlerinde görülür. 2) Eğer fütusun immun sistemi tam olarak gelişmeden az virulent bir mikroorganizma ile karşılaşır, immunolojik yanıtızlık veya immunolojik tolerans gelişir. Böyle infeksiyonlar fötal yaşam boyunca, hatta ömür boyunca kalıcı olur. Fütusta kalıcı bir viral infeksiyon bulunmasına rağmen antikor yanıtı oluşmaz. Bu fütüs diğer viruslara karşı ve farklı virusun antijenik tiplerine karşı immun yanıt oluşturabilir. 3) Fütusun immun sistemi geliştikten sonra bir mikroorganizmayla karşılaşır, buna karşı immun yanıt oluşturur. İnfeksiyonun bundan sonraki seyri ise erişkinlerden farklı değildir. Eğer immun sistem yeterli korumayı sağlarsa infeksiyon yenilir, eğer yeterli korumayı sağlamazsa sonuç ölüme kadar gidebilir. Çoğu bakterilere karşı fötal dönemde immun yanıt oluşmaz, bu özellik genellikle doğumdan sonra kazanılır.

Plasental Bağışıklık Transferi

Anneden fütusa plasenta vasıtasıyla antikor geçişi, bazı türlerde fütusun ve yenidoğanların pasif savunmasına katkıda bulunur. **Maternal** antikorların fütusa geçişi plasentanın yapısı ile ilişkilidir ve sadece bazı hayvan türleri için geçerli olan bir yol değildir. Plasentanın histolojik katları ne kadar çoksa, antikor geçişi o kadar zordur. *Hemokorial plasenta* insan, diğer primatlar ve kemiricilerde bulunur. Bu plasenta tipinde anneden fütusa IgG geçer, diğer immunoglobulin sınıfları geçemez. *Endoteliokorial plasenta* köpek ve kedilerde bulunan plasenta tipidir. Bu plasentasyon tipinde, maternal IgG'lerin az bir kısmı (%5-10) fütusa geçebilir. *Sindesmokorial plasenta* ruminantlarda bulunur ve anneden fütusa hiç antikor geçişi olmaz. *Epiteliokorial plasenta* atlar ve domuzların sahip olduğu plasenta tipidir ve antikor geçişine izin vermez. Kanatlılarda ise embriyoya antikor transferi memelilerden daha farklı bir yolla olur. Tavuklarda yumurta henüz ovaryumda iken, anne serumundan yumurta sarısına kolaylıkla antikor geçişi olur. Bu nedenle sarı daha sıvı fazda iken, annenin serumuna eşit düzeyde IgG'ye sahip olur. Yumurta oviduktan geçerken, salgıdaki IgM ve IgA yumurta akına karışır. Tavuk embriyosu kuluçkada iken, sarıda IgG ile akdaki IgM ve IgA'nın bir kısmı embriyoya geçer.

Maternal: Anneye ait, anneden gelen

Yenidoğanlarda Bağışıklık

Gebe uterus normal koşullarda steril bir ortamdır. Büyük bir çoğunlukla, fötüs doğana kadar herhangi bir patojenle karşı karşıya gelmez. Ancak yavru doğar doğmaz, hatta doğum anında annenin dış genital kanalına geçer geçmez birçok mikroorganizmayla ilk kez karşılaşır. Gebelik süresi uzun olan hayvanların yavruları, immün sistemleri tamama yakın bir düzeyde gelişmiş olarak doğarlar. Ancak gebelik süresi kısa olan türlerin yavrularında immün sistem henüz tam gelişmemiştir. Yenidoğan hayvanların immün sistemi gebeliğin son dönemindeki fötusun immün sisteminin bir devamıdır; doğumla birlikte yavru tüm immün kapasitesini bir anda kazanmaz. Eğer, fetal yaşam sırasında plasental bağışıklık transferi olmuşsa, bu yavruyu bir çok patojene karşı korur. Ancak, evcil türlerin çoğunda plasentadan fötusa pasif bağışıklık geçişi söz konusu değildir. Bu durumda, yenidoğanın infeksiyonlardan korunabilmesi için olası iki yol vardır; yavrunun kendi immün sisteminin çalışması ve yavruya doğumdan sonra pasif bağışıklık transferi.

Yenidoğanlarda İmmün Sistem

Birçok hayvan türünün yavruları immün sistemleri fiziksel olarak gelişmiş şekilde doğarlar. Ancak, yenidoğanların immün sistemlerinin yetersiz kapasitede olmasının çeşitli nedenleri vardır. Bunlar arasında maternal antikolar, maternal anti-idiotipik antikolar, doğum anında glukokortikoid düzeyinin ve baskılayıcı T hücre aktivitesinin artması ve yavrunun patojenlerle ilk kez karşılaşması sayılabilir. Dolayısıyla, yavrular patojenlere spesifik primer immün yanıt oluşturmak durumundadırlar. Aslında, yenidoğanların çeşitli antijenlerle karşılaşması, immün sistemin olgunlaşması için gerekli bir aşamadır. Ancak primer immün yanıtın koruyucu düzeye çıkabilmesi için de en az 1-2 hafta gereklidir. Bu durumda, patojenler hastalık tablosunu hızla şiddetlendirirken, antijene spesifik immün yanıt yenidoğanı patojenlerden korumakta geç ve yetersiz kalacaktır. Spesifik bağışıklığın henüz etkili olamadığı yenidoğanlarda, savunma işi spesifik olmayan nötrofillere ve komplemente kalmaktadır. Yenidoğan buzağular yaşamlarının ilk 10 gününde, erişkinlerden fazla düzeyde nötrofile sahiptirler. Bu hücreler, çeşitli bakterileri erişkin düzeyinde fagosite etme ve öldürme kapasitesine sahiptir, ancak kemotaktik yanıtları zayıftır. Yenidoğanlarda makrofaj aktivitesi zayıftır. Yenidoğan buzağı ve kuzularda toplam komplement aktivitesi ise erişkin düzeyinin %15-60'ı kadardır. Komplement düzeyi erişkin seviyesine buzağularda 6 ayda ulaşır.

Spesifik bağışıklık yenidoğanları infeksiyondan hemen korumasa da çalışmaya devam eder. Doğum anında, bağışıklık sisteminin deneyimi eksiktir. Primer lenfoid organlarda geliştirilen lenfositler antijenik uyarım olmasada sekonder lenfoid organlara yerleşmişlerdir. Ancak, bunların aktive olabilmeleri için antijenlerle karşılaşmaları gerekmektedir. Doğum anında, yenidoğanların dolaşımlarındaki B lenfositlerinin sayısı erişkinlerin üçte biri kadardır. B lenfosit sayısı 20-30 günde erişkin düzeyine ulaşır. Yenidoğanlar tarafından üretilen ilk antikolar doğumdan birkaç gün sonra kanda görülmeye başlar. Doğumdan sonra immün sistemin gelişimi ilerledikçe, yanıt verebildiği antijen sayısı da artar. Birçok hayvan türünün yavrusu doğum anında bazı antijenlere yanıt veremez. Bu durum immün sistemin gelişme düzeyi, dolayısıyla gebelik süresi ile ilişkilidir. Gebelik süresi uzun olanlarda ise yanıt verilen antijen çeşidi daha çoktur. Ayrıca, yenidoğanların antijenlere karşı yanıt vermeye başladıkları süre, antijen tipine göre de değişir. Yenidoğan buzağılara doğum anında belirli antijenler verildiğinde, bunlara karşı oluşan antikolar farklı

sürelerde ortaya çıkar. Yenidoğanlarda lokal ve hücrenel bağışıklık da geç başlamaktadır. Buzağı barsağında lokal bağışıklık ilk hafta içinde ortaya çıkar. Hücrenel bağışıklık erişkin düzeyine, buzağılarda 2 haftada, köpeklerde 6 hafta-6 ay arasında ulaşır.

Yenidoğanlara Pasif Bağışıklık Transferi

Yenidoğan hayvanların immun sistemi tam kapasiteyle çalışmadığı ve türlerin çoğunda plasenta yoluyla antikör transferi yapılmadığı için, yenidoğanların immun sistemleri olgunlaşmaya kadar başka mekanizmalarla patojenlerden korunması gerekir. İşte bu korunma, kolostrum vasıtasıyla anneden yavruya bağışıklık transferi ile gerçekleşir.

Kolostrumun Yapısı ve Sentezi

Kolostrum, veya ağız sütü, gebeliğin son birkaç haftasında meme salgılarının ve kandan geçen proteinlerin birikmesi ile oluşur. Bu yüzden, besin değeri ve bağışıklık elemanları yönünden çok zengindir. Kolostrumda bulunan antikörlerin çoğu anne kanından aktif olarak geçer. Kolostrum IgG yönünden çok zengindir, ayrıca daha az miktarlarda, IgA, IgM ve IgE de bulunur. İlk emzirmeden sonra kolostrumun içeriği saatler ile ifade edilebilecek kadar kısa sürede değişir ve süt niteliği kazanmaya başlar. Dolayısıyla bağışıklık elemanlarının konsantrasyonu da hızla düşer. Ruminantlar dışındaki hayvanların kolostrumlarında IgG baskın iken, sütte IgA daha yoğun hale gelir. Ruminantların gerek kolostrum gerekse sütlerindeki baskın immunglobulin sınıfı IgG1'dir. Kolostrum ayrıca, makrofaj, B ve T hücreleri de içerir. Kolostrumun her mililitresinde bu hücrelerden 2-3 milyon adet vardır.

Bağırsaktan Kolostrum Emilimi

Yenidoğanların sindirim sistemindeki özel koşullar nedeniyle, emilen kolostrumdaki proteinler ve hücreler tahrip olmadan barsağa ulaşırlar. Kolostral immunglobulinler bağırsak epitel hücreleri üzerindeki yenidoğanlara özel Fc reseptörlerine (FcRn) bağlanırlar. Bağlandıktan sonra, antikörler epitel hücrelerinin içine alınır ve hücrelerin lamina propriaya bakan yüzünden içeriye bırakılırlar. Antikörler burarlardan lenf kanalları ve kan dolaşımına geçerler. Kolostrumla alınan hücreler ise epitel aralarından geçerek lenfoid sisteme yerleşirler. Tüm immunglobulin sınıfları bağırsaktan emilir, ancak IgA bağırsakta kalır. Bağırsağın geçirgenliği ilk emzirmeden sonraki 6 saat içinde maksimum düzeydedir ve bundan sonra hızla düşer.

Yenidoğanlarda Maternal Bağışıklık

Annenen yavruya transfer edilen antikörlere *maternal antikör*, bu yolla sağlanan pasif bağışıklığa *maternal bağışıklık* denir. Kolostrum ile emilen antikörlerin yenidoğanların kanındaki seviyesi, bağırsaktan emilim işleminin özelliği nedeniyle 12-24 saat içinde maksimum düzeye çıkar. Bu antikör seviyesi erişkinlerin serum antikör düzeyine eşittir. Ayrıca maternal immun sistem hücreleri, yavrunun immun sistemi tarafından reddedilene kadar vücutta kalırlar. Dolayısıyla, bu hayvanlar birçok enfeksiyona karşı pasif yolla korunmuş olurlar. Kolostrum bir taraftan yavruyu pasif olarak korurken, diğer taraftan yenidoğanın immun sistemini spesifik ve nonspesifik olarak baskılar. Kolostrum almayan yavrularda nonspesifik antikör sentezinin, alanlara göre daha erken başladığı saptanmıştır. Spesifik baskılamada ise, eğer yavru kolostrumla aldığı bir antikora spesifik antijenle karşılaşır, bu antijene karşı immun yanıt oluşturamaz. Buradan da, yavrunun kendi antikör yanıtı-

nı oluşturabilmesi için, maternal antikorların minimal düzeye inmesi gerektiği anlaşılmaktadır. Bu nedenle, pasif maternal bağışıklıktan aktif bağışıklığa geçiş periyodu, yavrunun infeksiyonlara en duyarlı olduğu dönemlerden birisidir. Ayrıca, maternal antikora sahip yenidoğanlara uygulanan aşılar karşı yeterli immun yanıt oluşmaz. Ancak, kolostrumun yenidoğanları korumadaki değeri tartışılmayacak kadar önemlidir. Hatta, yavrunun kolostrum alamaması sonucu ortaya çıkan hastalıklar “pasif transfer yetmezliği” denen özel bir grup oluşturur. Kolostrumdaki kadar olmasa bile, süt de IgG1 ve IgA yönünden zengindir. Yenidoğanların barsağındaki proteolitik aktivite ilk bir hafta içinde nispeten düşük olduğu için, bu süre zarfında sütle alınan IgG ve IgA bağırsaktan emilmese bile, bağırsakta kalarak yavrunun mukozal savunmasına katkıda bulunabilir.

Pasif transfer yetmezliği hangi durumlarda ortaya çıkar?



BAKTERİLERE KARŞI BAĞIŞIKLIK

Bakteriler yeryüzünde en çok türe sahip canlı grubudur. Hayvanlar bakterilerle dolu bir çevrede yaşamalarına rağmen bu organizmaların çoğu hayvanları infekte etmez. Tüm bakteri popülasyonu içinde, hayvanlara adapte olmuş bakteri türlerinin sayısı azdır. Bu bakterilerin bir kısmı zorunlu patojendir, yani hayvanı infekte ettiğinde çoğunlukla hastalığa neden olur. Hayvanlara adapte olmuş bakterilerin çoğunluğu ise, deri ve mukoz membranlar gibi vücut yüzeyinde **komensal** olarak yaşarlar. Bakteriyel hastalıkların gelişmesi, konak direnci, hasarlı dokuların varlığı, bakterinin yerleşimi ve hastalık oluşturma gücü (virulens) gibi birçok faktöre bağlıdır. Çeşitli bakteri grupları farklı virulens faktörlerine sahiptir ve farklı mekanizmalarla hastalık oluşturabilirler.

Komensal: Normal koşullarda konağa zarar vermeden, konakla birlikte yaşayan organizma

Bakteri Antijenleri

Bakterilerin birçok **organeli** bulunur. Bu organellerin bazıları tüm bakteriler için ortaktır, bazı organeller ise sadece belirli bakterilerde bulunur. Ayrıca, antijenite ile direkt ilgileri vardır. Aslında, bakteri hücrelerinde bulunan yapısal moleküllerin ve salgıların tüme yakını antijenik özelliktedir. Bu antijenik moleküller içinde bilinen tüm kimyasal antijen grupları bulunur (protein, polisakkarid, glikoprotein, lipoprotein, glikolipid vb). Bu nedenle bir bakteri hücresi, onlarca antijenden oluşmuş bir antijen kompleksi olarak da nitelenebilir. Bakterilerin dış yüzlerindeki organelere ait olan veya salgılanan antijenleri immun sistem ile direk temas halindedir. Ancak, bakteri hücresi vücut içinde parçalandığında iç yapısında bulunan antijenler de açığa çıkar.

Organel: Bakteri hücrelerinin işlevlerini yürüten organlar, hücre organları.

Hücre duvarı tüm bakterilerde ortak olarak bulunan en önemli antijenik organeldir. Bakterilerde Gram pozitif ve Gram negatif olmak üzere iki tip hücre duvarı bulunur ve bunların kimyasal içerikleri birbirinden farklıdır. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı peptidoglikan tabakası ve bunun içine dağılmış teikoik-lipoteikoik asitten oluşmuştur. Bu yapıların kapsamında bulunan proteinler, glikoproteinler, lipoproteinler ve bazı bakterilerdeki polisakkaridler Gram pozitif bakterilerin en önemli antijenleri arasındadırlar. Gram negatif hücre duvarı antijenlerine ortak olarak “O antijeni” veya “somatik antijen” adı da verilir. Lipopolisakkarid (LPS) ve porin proteinleri başta olmak üzere fosfolipid tabakası, lipoproteinler, glikoproteinler ve polisakkaridler Gram negatif bakterilerin antijenik yapıları arasındadır. Hücre duvarına karşı oluşan immun yanıt, bakterinin opsonizasyonunu dolayısıyla fagositozunu ve komplement tarafından parçalanmasını sağlar. Ayrıca, hücre

duvarına karşı oluşan antikorlar bakterileri kümelendirerek ve nötralize ederek konak hücrelerine bağlanmalarını önler. Bazı bakterilerde hücre duvarının üstünde bir *kapsül* bulunur. Kapsül, bakterilerin önemli antijenleri arasındadır ve “K antijeni” olarak da adlandırılır. Kapsül çoğu bakterilerde polisakkarid yapısındadır. Kapsülün en önemli görevi, bakteriyi çevresel faktörlerden, özellikle de immun sistemden korumaktır. Kimyasal yapısı nedeniyle kapsül fagositozu engeller. Kapsüllü bakteriler, kolayca fagosite edilemezler ve parçalanamazlar. Ayrıca kapsül, hücre duvarının üzerini örttüğünden, somatik antijenlere karşı oluşan immun yanıtı engeller veya antikorların hücre duvarına ulaşmasını önler. Kapsüle karşı oluşan immun yanıt kapsülün opsonizasyonunu sağlar, böylece bakteri daha kolay fagosite edilir ve komplement tarafından parçalanır. Ayrıca, immun sistem kapsülü etkisiz hale getirilmiş bakterilerin hücre duvarına daha kolay ulaşır.

Bazı bakterilerde hareket organeli olarak *flagella* bulunur. Flagella, bakterinin en önemli antijenik yapılarından birisidir. Flagellin adı verilen flagella proteini kuvvetli bir antijendir ve buna “H antijeni” de denir. Flagellaya karşı oluşan immun yanıt, bakterilerin bir araya kümelenmesini (aglutinasyon) ve hareketsiz kalmalarını sağlar. Böylece, eğer flagella bir virulens faktörüysen, bakteri patojenitesini kaybeder. Bazı bakterilerde bulunan *fimbria*, sitoplazmik membrandan köken alan ve kısa kirpik şeklinde bir organeldir. Fimbria protein alt ünitelerinden oluşmuştur ve ortak olarak “pilin” adı verilen bu proteinler antijenik yapıdadır. Fimbriaya karşı oluşan immun yanıt, bakterilerin nötralize olmasına ve kümelenmesine neden olur. Antikorlar fimbrialara bağlanarak maskelediklerinde, bakteri önemli bir virulens faktörünü kaybeder ve hücrelere bağlanamaz.

Bakterilerin hücre duvarının altında kalan organeller *iç yapı* olarak kabul edilir. Bakterilerin iç yapısında bulunan organeller ve bunlara ait moleküller potansiyel antijen olmalarına karşın, immun sistem ile temasta olmadıklarından, koruyucu bağışıklıkta önemli bir rolleri yoktur. Bakterilerin hücre duvarı altında yer alan sitoplazmik membranda antijenik özellikteki enzimler ve lipoproteinler bulunur. Sitoplazmik membran ile çevrili sıvı haldeki bakteri sitoplazmasında ribozomlar, genetik materyal (DNA) ve sitoplazmik sıvı içine dağılmış çok çeşitli organik moleküller bulunur. Bu organellerin ve moleküllerin antijenik özellikleri genellikle zayıftır.

Ekzotoksinler, bazı bakteriler tarafından salgılanan çok önemli virulens faktörleridir. Ekzotoksinler büyük proteinler olduklarından antijenik güçleri genellikle çok yüksektir. Toksinlere karşı humoral immun yanıt oluşur. Genellikle IgM ve IgG sınıfından olan antitoksin antikorları toksinleri nötralize ederek etkisiz hale getirirler. Bazı bakteriyel toksinler, çok düşük konsantrasyonlarda bile yardımcı T hücrelerini nonspesifik şekilde direkt olarak uyarabilirler. Bu nedenle, böyle toksinlere “süperantijenler” de denir. Bunlar immun sistemi çok etkili bir şekilde uyarmalarına karşın, bu uyarım vücudun zararınadır. Bazı bakteriler üremeleri sırasında çeşitli *enzimler* salgırlar. Klasik toksinlerden farklı olmalarına rağmen, bu enzimler konak dokuları üzerinde zararlı etki gösterebilirler. Bu maddeler genellikle hücreler arası maddeleri ve doğal savunma engellerini parçalayarak bakterilerin vücutta yayılmalarını kolaylaştırırlar. Enzimler de protein yapısındadır ve antijenik özelliğe sahiptirler. Çevre koşullarının uygun olmadığı durumlarda (yüksek ısı, gıdasızlık, üremeyi önleyen maddeler, vb) tüm organizmalar, normal koşullarda bulunmayan “stres proteinleri” üretirler. *Isı şoku proteinleri* (HSP) içlerinde en iyi bilinenlerdir. Bakterilerde üç farklı molekül ağırlıkta ısı şoku proteini; HSP90, HSP70 ve HSP60 bulunur. HSP’ler antijen sunan hücreler tarafından kolayca işlenirler ve

immün sistemde HSP'lere spesifik çok sayıda hücre bulunur. Bu nedenle, HSP'lerin antijeniteleri çok yüksektir ve anti-HSP yanıtı bakteriyel patojenlere karşı en önemli savunma mekanizmalarından birisidir.

Doğal Savunma Mekanizmaları

Bakteriler vücut ile temas ettikleri ve mukozal yüzeylere ulaştıkları andan itibaren doğal savunma mekanizmaları ile karşılaşılırlar. Bu mekanizmalar, mukozal bağışıklık konusunda anlatılmıştır. Bu yüzden, burada bakterilere karşı direnci etkileyen genel faktörler ve vücuda giren bakterilere karşı etkili nonspesifik kimyasal faktörlere yer verilecektir.

Antibakteriyel Direnci Etkileyen Genel Faktörler

Bazı türlerde bazı bakteri infeksiyonlarının hiç oluşmaması veya bazı bireylerin daha dirençli olması *genetik faktörler* ile ilişkilidir. Örneğin, bazı hücre içi bakterilere karşı relatif direnç "Nramp" geni tarafından kontrol edilir. Doğal koşullarda bir hayvan popülasyonuna giren infeksiyonlar, popülasyon üzerinde *selektif baskı* uygular. Diğer bir deyişle, ölümler sonucunda duyarlı hayvanları çoğalamazken ve sayıları azalırken, dirençli olanlar yaşar ve popülasyondaki sayıları artar. Bu tip direnç aynı zamanda *MHC tipleri* ile de ilişkilidir. Infeksiyonlara direnci etkileyen diğer nonspesifik faktörler arasında *hormonlar* bulunur. Örneğin, östrojenlerin düşük dozları bağışıklığı uyarırken, yüksek dozdaki testosteron immün baskılayıcı etkiye sahiptir. Bu yüzden, genelde dişi hayvanlar infeksiyonlara erkeklerle göre daha dirençlidirler. Stres altındaki hayvanlarda steroid düzeyinin artması infeksiyonlara direnci azaltır. *Beslenme*, infeksiyonlara dirençle ilgili diğer bir faktördür. Yetersiz beslenme bakterilere karşı duyarlılığı artırır. Ağır parazit istilası altındaki hayvanlarda gelişen negatif protein dengesi, infeksiyonlara direnci azaltır.

Nonspesifik Kimyasal Faktörler

Dokularda, doku sıvılarında ve kanda bakterileri öldüren (bakterisidal) ve bakterileri durduran (bakteriyostatik) çeşitli maddeler bulunur. Bunların etkileri bakteri türüne spesifik değildir, ancak bazı maddeler bazı bakteri grupları üzerinde daha etkili olabilir. Bakterilere karşı etkili olan en önemli maddelerden birisi *lizozim*'dir. Lizozim, hemen tüm vücut sıvılarında, yumurta akında ve dokularda bulunur. Gram pozitif bakteriler lizozimin etkisine daha duyarlıdır. Lizozim, spesifik antikorların bulunmadığı durumlarda bir opsonin olarak da çalışabilir. *Serbest yağ asitleri* bakteri üremesini engelleyen önemli faktörlerdir. Genelde, oleik asit gibi doymamış yağ asitleri bakterisidal etki gösterirken, doymuş yağ asitleri mantar öldürücü (fungisidal) etki gösterirler. Memeli hayvanların dokularında ve hücrelerinde, lizin ve arginin yönünden zengin çeşitli *antibakteriyel peptidler* ve proteinler bulunur. Bunlar genellikle, nötrofiller ve trombositler tarafından salgılanan proteolitik enzimlerce sindirilen proteinlerden köken alırlar. Bunlardan başka çeşitli dokularda, sperm, spermidin, plakin ve defensinler gibi antibakteriyel maddeler bulunur.

Bakteri istilasını etkileyen en önemli faktörlerden biri, vücut sıvılarındaki demir düzeyidir. Birçok bakteri üremek için demire gereksinim duyar. Vücuttaki demirin çoğu, laktoferrin, transferrin ve ferritin gibi *demir bağlayan proteinler* tarafından tutulur. Bakteriyel infeksiyonlar sırasında bağırsaktan demir emilimi çok azalır, karaciğerde demir bağlayan proteinlerin üretimi artar ve vücuttaki demirin çoğu karaciğerde toplanır. Böylece, bakterilerin demir kaynakları kısıtlanmış ve üremeleri engellenmiş olur. Ancak, bazı bakteriler sahip oldukları demir bağlayan proteinler

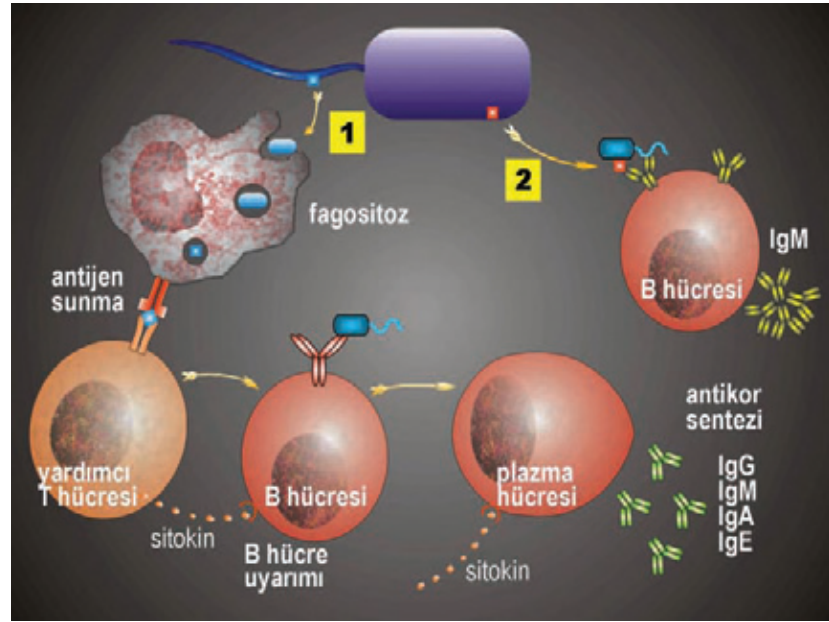
vasıtasıyla serum proteinlerindeki demiri çekebilir ve kullanabilirler. Hemolitik anemi gibi serum demir düzeylerinin arttığı hastalıklarda, hayvanlar bakteriyel infeksiyonlara daha duyarlı hale gelirler.

İmmunolojik Savunma Mekanizmaları

Bakterilere karşı, önceki bölümlerde anlatılan temel mekanizmalarla humoral ve hücreyel immun yanıt gelişebilir. Spesifik immun yanıt, çeşitli efektör mekanizmalar ile bakteriyel infeksiyonlara karşı etkili olabilir ve belirli bir bakteriye karşı bu mekanizmalardan biri veya birkaçı çalışabilir. Bu mekanizmalardan hangisinin çalışacağı, bakteri tipine ve bakteriyel infeksiyonun patogeneziğine göre değişir. Bu bakımdan, hücre dışı ve hücre içi bakterilere karşı immun yanıt ayrı başlıklar altında incelenecektir (Şekil 9.3).

Şekil 9.3

T bağımlı (1) ve T bağımsız (2) bakteri antijenlerine karşı humoral immun yanıtın gelişimi.

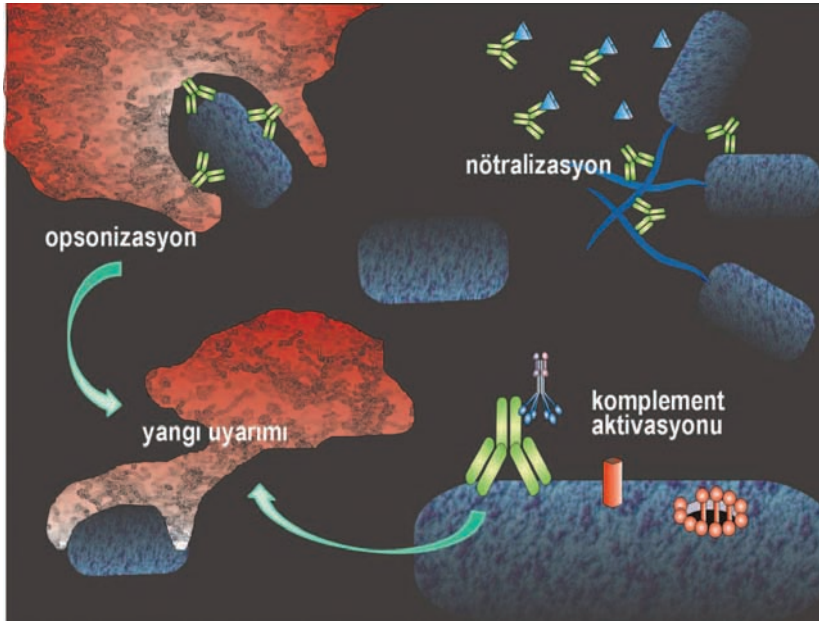


Hücre dışı Bakterilere Karşı Bağışıklık

Hücre dışı bakterilere karşı en önemli savunma mekanizması humoral immun yanıtıdır. Bakteriyel hücre duvarı ve kapsülüne ait polisakkaridler T-bağımsız antijenlerdir. Böyle antijenler B hücrelerini direkt olarak uyarabilirler ve sadece IgM sınıfı antikorların üretimine neden olurlar. Bakterilerin hücre duvarındaki antijenlerin çoğu, flagellaları, fimbriaları, toksinleri ve enzimleri T bağımlı antijen özelliğindedir. Bu antijenler profesyonel antijen sunan hücreler tarafından işlendikten sonra, MHC sınıf II molekülleri ile birlikte yardımcı T lenfositlerine sunulurlar. Bu hücreler de salgıladıkları sitokinler vasıtasıyla, spesifik antikor üretimi yapması için B hücrelerini uyarırlar. Bakterilerin T-bağımlı antijenlerine karşı, başta IgG olmak üzere tüm antikor sınıfları üretilebilir. Bu antikorlar aşağıdaki mekanizmalarda görev alırlar (Şekil 9.4).

Şekil 9.4

Bakterilere karşı humoral bağışıklıkta antikorların görev aldığı mekanizmalar.



1. Komplement aktivasyonu: IgM ve IgG sınıfı antikorlar bakteri yüzeyine bağlandıktan sonra klasik komplement yolunu aktive edebilirler. Komplementin aktivasyonu sonucu bakteri C3b parçası ile opsonize edilebilir veya reaksiyonların son aşamasında oluşan membran atak kompleksi (MAK) bakteriyi lize edebilir. Spesifik antikorların henüz üretilmediği durumlarda sialik asit içermeyen bakteriler alternatif komplement yolunu direkt olarak aktive edebilir. Böylece opsonizasyon veya bakteri lizisi ile sonuçlanan komplement fonksiyonları gerçekleşir.

2. Opsonizasyon: IgM ve IgG sınıfı antikorlar bakterileri opsonize ederek fagositik hücreler tarafından yutulmalarını kolaylaştırırlar. Opsonik antikorlar kapsüllü bakterilerin kapsülüne, kapsülsüz bakterilerin hücre duvarı antijenlerine karşı oluşur. Nötrofiller ve makrofajlar antikorsuz da fagositoz yapabilmelerine karşın, birçok patojenik bakterinin fagositozu için opsonizasyon gereklidir. Özellikle kapsüllü bakteriler fagositoza dirençlidirler, ancak opsonik antikorlar kapsülün antifagositik etkisini giderirler. Bakteriler opsonize olduktan sonra, Fc reseptörü taşıyan fagositler bunlara bağlanır ve bakteriyi kolayca yutabilir. Moleküler düzeyde IgM'nin opsonizasyon gücü, IgG'ye göre daha fazladır.

3. Nötralizasyon: Antikorlar tek başlarına bakterileri, toksinlerini ve enzimlerini nötralize edebilirler. Mukozal yüzeylerde nötralizasyon fonksiyonunu yürüten immunglobulin sınıfı sIgA'dır (ruminantlarda ayrıca IgG). sIgA bakteri toksinlerine bağlanarak nötralize eder; toksin konak hücresi üzerindeki spesifik reseptörüne bağlanamaz. Salgısal antikorlar, flagellaya bağlanarak bakterinin hareketsizleşmesini ve fimbriaları bloke ederek mukozal hücrelerin istilasını önler. Vücut içinde ise, bakteriyel toksinleri veya enzimleri IgM ve IgG nötralize eder. Ekzotoksin veya enzimleri yoluyla hastalık oluşturan bakteriler için hem bakteriye, hem de salgısal ürünlerine karşı immun yanıt oluşmalıdır.

4. Yangı uyarımı: Antikorlar tarafından yürütülen direkt bir mekanizma olmasına rağmen, antikorlar vasıtasıyla gerçekleşen fagositoz ve komplement akti-

vasyonu sonucunda lokal yangı da oluşabilir. Bu da yangı bölgesine daha çok bağıklık elemanı çekilmesini sağlar.

SIRA SİZDE

3

Spesifik antikorların olmadığı durumlarda fagositik hücreler bakterileri hangi yolla algılar?

Patogenezi: Enfeksiyonun veya hastalığın oluşum mekanizması.

Hücreiçi Bakterilere Karşı Bağışıklık

Hücreiçi bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonlarda gerek **patogenezi**, gerekse immün yanıt diğer bakterilerden farklılıklar gösterir. Bunların hücre dışında bulunduğu dönemde yukarıda anlatılan efektör mekanizmalar fonksiyon görebilir ve enfeksiyon başlamadan önlenir. Ancak fagosite edilseler bile, hücrelerin içinde uzun süre yaşayabilirler. Bu şekilde hücre içine girme fırsatı bulduklarında bu mekanizmaların bir önemi kalmaz ve hücrel immün yanıt ön plana çıkar. Hücreiçi bakterilere karşı etkili olan üç temel hücrel bağışıklık mekanizması vardır.

1. Makrofaj aktivasyonu: Hücreiçi bakterilerin tahribini sağlayan en önemli mekanizma makrofaj aktivasyonudur. Aktive olmamış makrofajlar fagositoz yapabilmelerine karşın, hücreiçi bakteriler çeşitli yollarla makrofajlar içindeki sindirim aşamasından kurtulurlar. Bu nedenle, makrofajların bu bakterileri öldürebilmesi için aktive olması ve daha güçlü silahlarla donanması gerekir. Hücreiçi bakterilerin antijen işleyen hücreler tarafından sindirilememesi halinde, sadece ortama saldıkları eriyebilir antijenler işlenip sunulabilir. Bu antijenler, antijen işleyen hücreler tarafından MHC sınıf II molekülleri ile birlikte yardımcı T lenfositlerine sunulurlar. Bu uyarım sonucunda özellikle Th1 tipindeki yardımcı T hücreleri aktive olur. Uyarılan Th1 hücreler salgıladıkları sitokinlerle makrofajları aktive ederler. Aktive olan makrofajların sindirici enzimleri güçlenir ve böylece içlerindeki bakterileri sindirebilirler. Aktive olmuş makrofajların etkisi spesifik değildir; öldürme gücü tüm bakteriler için artar.

2. T hücre sitotoksitesi: Hücreiçi bakterilerin protein antijenleri sitotoksik T lenfositlerini de uyarabilir. Eğer bakteriler makrofaj içinde yaşar ve antijenlerini sitoplazma içine bırakırsa, bu antijenler işlenerek MHC sınıf I molekülleri ile birlikte hücre yüzeyinde sergilenir. MHC sınıf I molekülleri ile sunulan antijenleri sitotoksik T lenfositleri tanır. Sonuçta, sitotoksik T lenfositleri bakteri ile infekte makrofajları öldürür.

3. NK hücre sitotoksitesi: Hücreiçi bakteriler direk olarak veya aktive ettikleri makrofajlardan salgılanan sitokinlerle NK hücreleri uyarabilir. NK hücreler de direk olarak infekte hücreleri öldürebilirler. Veya sitokin salgılayarak makrofajları aktive edebilirler. Böylece NK hücreleri, spesifik bağışıklık oluşmadan önce, hücreiçi bakterilere karşı erken savunma hattını oluştururlar.

Bakterilerin İmmün Yanıttan Kurtulma Yolları

Patojenik bakterilerin vücut içindeki yaşam stratejilerinin tümü immün sistemden gizlenme ve immün yanıtın efektör mekanizmalarını engelleme üzerine kurulmuştur. Bunları da sahip oldukları çeşitli özel organeller ve genetik mekanizmalarla başarırlar. Bir bakterinin immün yanıttan kurtulabilmesi, onun patojenik olduğunun göstergesidir. Bakteriler immün yanıttan çeşitli yollarla kurtulabilirler.

1. Fagositoza direnç: Bakterilerin fagositoza direnci, yutulmaya ve sindirilmeye direnç şeklinde olabilir. Diğer bir deyişle bakteriler fagositik hücrelerin etkisine, hücre dışında ve hücre içinde direnç gösterebilirler. Bazı bakterilerde bulunan kapsül direkt olarak fagositozu engelleyebilir. Ayrıca bakteriler, nötrofillerin fago-

sitozunu engelleyen maddeler salgılayabilirler, nötrofil kemotaksisini engelleyebilirler, fagositik hücreleri öldüren leukotoksin üretebilirler veya salgıladıkları proteini A gibi maddeler ile opsonizasyonunu önleyebilirler.

Bazı bakteriler ise, fagositik hücreler tarafından yutulmalarına bile öldürülemezler. Bakteriler fagositik hücreler içindeki enzimatik sindirimden dört temel yolla kurtulurlar. 1) Bazı bakterilerin hücre duvarındaki parafin benzeri maddeler lizozom enzimlerinin sindirimine dirençlidir. 2) Lizozomların fagozomlar ile birleşmesini engelleyerek lizozomlardaki enzimlerin etkisinden kurtulurlar. 3) Fagozomlardan kaçarak hücre sitoplazması içinde serbest yaşarlar ve enzim etkisinden kurtulurlar. 4) Fagositik hücrelerdeki enzimatik yıkım mekanizmasını engelleyebilirler.

2. Komplement etkisine direnç: Bazı bakteriler, komplementin etkisine dirençlidirler. Bakterilerin komplement direnci genellikle kapsül ve hücre duvarı yapıları ile ilişkilidir. Bu nedenle komplement etkisine dirençli bakterilerin çoğu, fagositoza da dirençlidir. Bazı bakterilerin kapsülünde bulunan sialik asit C3b parçasının hücre duvarında aktive olmasını önler. Böyle bakterilerin yüzeyinde alternatif komplement yolu çalışmaz. Kapsül dışında, M proteini gibi bazı moleküller de klasik ve alternatif komplement yolunu engelleyebilirler.

3. İmmunglobulin tahribi: Bazı patojenik bakteriler özellikle doğrudan IgA'yı parçalayan proteolitik enzimler üretirler.

4. Antijenik varyasyon: Bakterilerin immün yanıt denetiminden kurtulma yollarından biri antijenik yapılarını değiştirmeleridir. Özellikle hücre dışı bakterilerde oluşan antijenik varyasyon önceden oluşmuş antikorların etkisiz kalmasına neden olur. Antijenik varyasyon hücre duvarı, fimbria ve flagella gibi yüzey antijenlerinde oluşur ve bu organelleri kodlayan genler tarafından düzenlenir. Bazı bakteriler periyodik antijenik varyasyon geçirir. Hayvanı infekte eden bir antijenik tipe karşı oluşan immün yanıt bu tipi giderirken, bakteri ikinci bir antijenik tipe geçer. Böylece, ilk tipe karşı oluşan immün yanıt ikinci tipe karşı etkisiz kalır ve ikinci antijenik tipe karşı ayrı bir immün yanıt oluşturulması gerekir. Bakteri antijenik yapısını sürekli bu şekilde değiştirerek yerleştiği yerde uzun süre kalabilir. Ayrıca, birçok bakteri türünün doğal olarak bir çok antijenik tipi mevcuttur. Bunlara serotip de denir. Bir bakteri türü içinde, bir serotipe karşı oluşan immün yanıt genellikle diğer serotiplere karşı koruma sağlamaz.

VİRUSLARA KARŞI BAĞIŞIKLIK

Viruslar, zorunlu hücre içi yapılardır. Yapısal proteinlerini sentezleyemezler, hatta bazıları nükleik asit replikasyonunu bile gerçekleştiremez. Nükleik asitlerinin replikasyonu ve yapısal proteinlerinin sentezi için konak hücrelerinin replikasyonu ve sentez mekanizmalarını kullanırlar. Bu nedenlerle, zorunlu olarak hücre içinde çoğalırlar. Bu özellikleri nedeniyle viruslar, konaklarıyla ve immün sistemle olan ilişkileri açısından diğer mikroorganizmalardan farklı bir konuma sahiptirler. Viruslar, konak immün sistemini aşma yeteneği yönünden adaptasyon geçirirken, konaklar viral infeksiyonlara direnç yönünde seleksiyona uğramışlardır. Bir virusun konak immün sistemine rağmen vücutta uzun süre kalabilmesi, genellikle patojenitesi ile zıt ilişkilidir. Virusun konağa adaptasyonunun zayıf olduğu durumlarda, viral infeksiyonlar şiddetli hastalıklar ile sonuçlanır. Örneğin, kuduz hastalığı köpek, keçi, at ve sığırlar için öldürücüdür, çünkü bunlar virusun doğal konakları değildir ve virusun adaptasyonu zayıftır. Bu tip infeksiyonda immün yanıt etkili olur. Buna karşın kuduz virusu yarası gibi doğal konağında hastalığa neden olmadan uzun süre kalabilir, çünkü iyi adapte olmuştur.

Virus-konak adaptasyonunun daha iyi sağlandığı durumlarda, hastalık şiddetli geçebilmesine karşın ölüm oranı düşük olabilir ve virus vücutta daha uzun süre kalabilir. Bu tip infeksiyonlarda tekrarlayan hastalık ataklarına, aynı virusun farklı antijenik tipleri neden olur. Bu tip infeksiyonda immün yanıt etkili olmasına rağmen, antijenik varyantlar nedeniyle koruma değişik düzeydedir. Virusun konağa çok iyi adapte olduğu durumlarda, immün sistem virusu uzaklaştırılmaz ve viruslar konakda uzun süre kalabilirler. Bu infeksiyonlar sırasında virus değişime uğrayabilir ve immün sistemden mutlaka kurtulur.

Virus Antijenleri

Viruslar en basit canlı formlarıdır. Yaşamları için gerekli tüm materyalleri konak hücresinden sağladıkları için, bir hücre yapısına ve hücre organellerine sahip değildirler. Viral nükleik asidin çevresi, kapsomer adı verilen protein alt ünitelerinden oluşmuş kapsid ile çevrilidir. Bu şekildeki tam bir viral yapı virion olarak da nitelenir. Bazı viruslarda kapsidin çevresinde kısmen konak hücresinden köken alan lipoprotein, glikoprotein veya fosfolipid yapısında bir zarf bulunur. Ayrıca, zarf kapsamında nöraminidaz ve hemagglütinin aktiviteleri ve virion içinde enzim aktiviteleri saptanabilir. Viruslar, basit yapıları nedeniyle az sayıda antijene sahiptirler. Virusların kapsid proteinleri kuvvetli antijenlerdir. Zarfta bulunan lipoprotein ve glikoprotein gibi yapısal moleküller ile nöraminidaz ve hemagglütinin aktivitesi gösteren maddeler de antijenik özelliğe sahiptir. Virus bir hayvanın vücuduna girdiğinde virion proteinleri immün yanıtı uyandırır. Viruslar hücre içine girdikten sonra ise, viral nükleik asit hücre genomuna integre olarak hücreye yeni proteinler sentezletir ve bunlar hücre yüzeyinde sergilenir. Bu proteinler hücre içinde sentezlenmiş olmalarına rağmen, immün sistem tarafından yabancı olarak algılanırlar ve immün yanıtı uyandırılır. Böyle antijenlere endojen antijen de denir. Virionun içinde ve dışında bulunan tüm protein epitoplarına karşı immün yanıt gelişebilir. Özetle immün sistem virus antijenleri ile 3 şekilde temas edebilir; serbest virus partikülü, hücre membranına integre viral antijen ve MHC molekülü ile sunulan viral antijen.

Doğal Savunma Mekanizmaları

Virusların büyük çoğunluğu, doğal koşullarda mukoz membranlardan vücuda girer veya direkt olarak mukozal hücrelerde yerleşir. Viruslar mukozal yüzeylere ulaştıkları andan itibaren doğal savunma mekanizmaları ile karşılaşılırlar. Bu mekanizmaların çoğu mukozal bağışıklık konusunda anlatılmıştır.

Antiviral Direnci Etkileyen Genel Faktörler

Viral infeksiyonlara dirençle ilişkili en önemli etken genetik faktörlerdir. Bazı hayvan türleri bazı infeksiyonlara hiç yakalanmazlar ve bu durum absöüt direnç olarak nitelenir. Bunun temel nedeni, dirençli hayvan türünün hücrelerinde virusun bağlanabileceği reseptörün olmamasıdır. Sonuçta, bu reseptörün sentezi de genetik kontrol altındadır. Ayrıca, bazı bireyler viral infeksiyonlara nispeten daha dirençli olurlar, buna da relatif direnç denir. Relatif direnç de genelde MHC tipleri ile ilişkilidir ve virusa karşı oluşturulan immün yanıtın gücünden kaynaklanır. MHC genleri tarafından kontrol edilen relatif direnç, doğal koşullarda seleksiyon ile popülasyondaki dirençli bireylerin artmasını sağlar.

Viruslara karşı nonspesifik savunma faktörlerinden en önemlisi interferonlardır. Interferonlar virüsle infekte olan hücrelerden birkaç saat içinde salgılanır, birkaç günde pik serum düzeyine ulaşır ve çeşitli mekanizmalarla virüsleri inhibe ederler. Tip I ve tip II olmak üzere iki temel gruba ayrılırlar. Tip I interferon grubu içinde bulunan alfa ve beta interferonlar antiviral aktivite bakımından önemlidirler. Virüsle infekte olan hücrelerde, viral nükleik asitin hücre ribozomlarına bağlanması interferon sentezini başlatır. IFN-alfa ve IFN-beta, üretildikleri hücrelerde antiviral aktiviteye sahip değildirler, etkilerini çevredeki diğer hücrelerde gösterirler. İnfekte hücrelerden salgılanan interferonlar komşu hücreler üzerindeki interferon reseptörlerine bağlanırlar. İnterferona bağlanan hücreler birkaç dakika içinde yeni proteinler sentezlenmeye başlarlar. Bu proteinler çeşitli mekanizmalarla viral RNA'yı parçalayabilir, viral proteinlerin sentezini engelleyebilir, viral mRNA'nın translasyonunu önleyebilir. Bunlar ayrıca makrofaj ve NK hücrelerin antiviral aktivitelerini artırırlar.

İmmunolojik Savunma Mekanizmaları

Humoral İmmun Yanıt

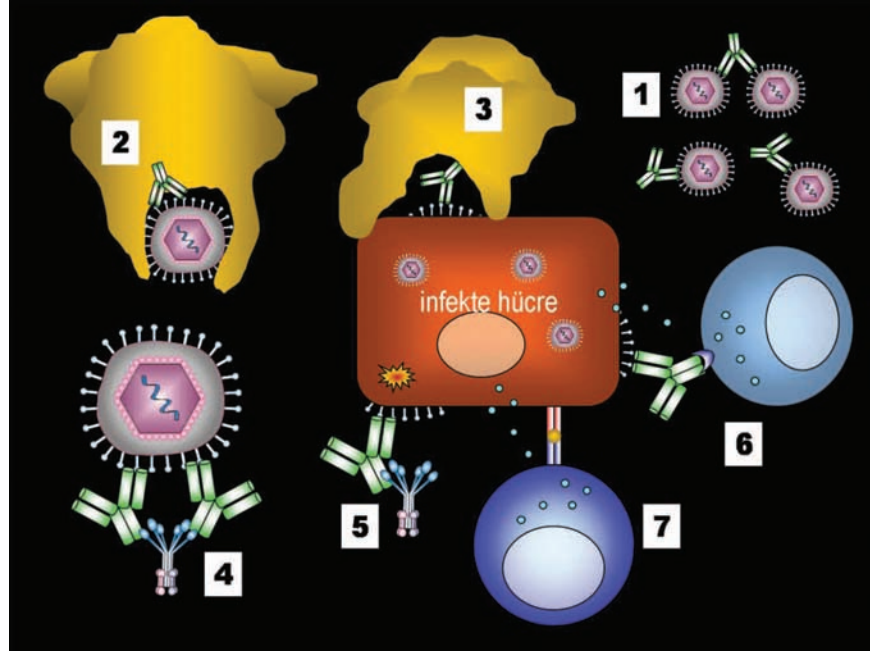
Viruslar hücreiçi patojenleri olmalarına rağmen, hücrelere ulaşabilmek için vücut içinde serbest halde buldukları bir dönem geçirirler. Ayrıca, infekte ettikleri bir hücreden diğer bir hücreye geçerken de serbest halde bulunurlar. Ayrıca, inaktif aşılarda vücuda sokulan ölü virüsler de doğal olarak hücre dışında kalacaklardır. Bundan başka, bazı viral proteinler MHC sınıf I molekülleri olmadan da hücre membranında bulunabilir. İşte, serbest haldeki bu virionlar veya viral antijenler humoral immün yanıtı uyarabilir. Viruslara karşı oluşan humoral immün yanıtın gelişimi, diğer antijenlerden farklı değildir. Özetle, viral antijenler sitozolik yolla işlenir, MHC sınıf II molekülleri ile birlikte yardımcı T hücrelerine sunulur ve bu hücrelerin uyarımı ile B hücreleri aktive olup antikor sentezlemeye başlar.

Antikorlar özellikle, sekonder immün yanıtın erken dönemlerinde önemli rol oynarlar. Viral kapsid veya zarf proteinlerine bağlanan spesifik antikorlar, virüslerin hücre reseptörlerine bağlanmasını engeller. Buna virus nötralizasyonu denir. Ayrıca, antikorlar virüsleri kümelendirerek hücreyi infekte edecek virion sayısının azaltılmasına yardımcı olur. Viral nötralizasyonda etkili olan antikorlar, vücut içinde IgG ve IgM, mukozal yüzeylerde sIgA'dır. Bağırsak ve solunum sisteminde IgE de virüslere bağlanabilir. Nitelik açısından IgM, konsantrasyon açısından IgG en önemli nötralizan antikorlardır.

Antikorlar viral partikülleri opsonize ederek makrofajlar tarafından fagosite edilmelerini kolaylaştırabilirler. Ayrıca antikorlar komplementi aktive ederek virüslerin tahribine yardımcı olabilirler. Özellikle, lipid zarfa sahip virüsler komplement etkisine duyarlıdır ve böyle virüsler alternatif komplement yolunu da direkt olarak aktive edebilirler. Virüslerin komplement tarafından tahribine, viroliz de denir. İnfekte hücrelerin yüzeyindeki viral antijenlere karşı da antikorlar oluşabilir. Bu antikorlar, komplement vasıtasıyla infekte hücrelerin lizisini sağlar (Şekil 9.5).

Şekil 9.5

Serbest virusa, viral antijenlere ve virüsle infekte hücrelere karşı humoral ve hücreyel bağışıklık olayları; 1)serbest virüslerin nötralizasyonu, 2)virusun opsonizasyonla veya direkt fagositozu, 3)virüsle infekte hücrenin fagositozu, 4)komplement ile virus tabrihi, 5)komplement ile virüsle infekte hücrenin tabrihi, 6)NK hücrenin ADCC veya direkt yolla infekte hücreyi tabrihi, 7)sitotoksik T hücrelerinin infekte hücreyi tabrihi.

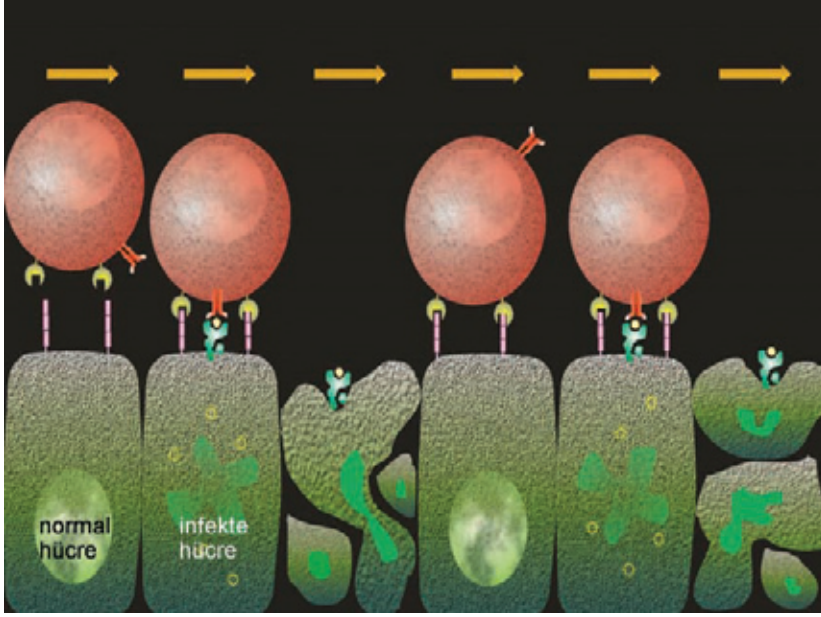


Hücreyel İmmun Yanıt

Antikorlar hücre dışındaki virüsleri nötralize edebilmelerine karşın, hücre içindeki virüslere karşı etkili değildir. Tüm virüsler zorunlu hücre içi patojenleri oldukları için, humoral immun yanıt tek başına bazı viral infeksiyonları önleyemez. Bu nedenle, viral infeksiyonlara karşı savunmada hücreyel immun yanıtın da mutlak bir rolü vardır. Bunun en belirgin göstergesi, antikor yanıtında yetmezlik olan hayvanlarda viral hastalıkların şiddetinde önemli bir artış olmaması, buna karşın T hücre yetmezliği olanlarda vasat viral infeksiyonların bile öldürücü olabilmesidir.

Virüsler hücre içine girdikten sonra endozomal yolla işlenirler ve viral antijenler MHC sınıf I molekülleri ile birlikte hücre yüzeyinde sergilenirler. Bu MHC-antijen kompleksi hücreyel immun yanıtındaki en önemli hücreler olan sitotoksik T lenfositleri tarafından tanınır. Sınıf I molekülleri tüm çekirdekli hücrelerde bulunduğu için, virüsle infekte olan ve bunları sunabilen tüm hücreler sitotoksik T lenfositlerinin hedefi olabilir. Sitotoksik T lenfositleri hedef hücreye bağlandıktan sonra ve sitotoksik maddelerini hücre membranına boşaltırlar. Bu maddeler, infekte hücrenin apoptozis mekanizmasını harekete geçirerek ölümüne neden olur. Apoptozis sırasında aktive olan enzimler hem hücre DNA'sını hem de viral nükleik asitleri de parçalar. Böylece, sitotoksik T lenfositleri tarafından uyarılan apoptozis olayında, hücre parçalanmadan öldürüldüğü için hem virionlar çevreye yayılmaz, hem de virüsler hücre içinde direkt olarak etkisiz hale getirilir. Ayrıca, uyarılan sitotoksik T lenfositleri salgıladıkları IFN-gama ile, makrofajların virüsleri öldürme gücünü artırırlar. (Şekil 9.6)

Şekil 9.6



Sitotoksik T hücreleri immun denetim yapar. Hücreleri sırayla kontrol ederek, MHC sınıf I ile yabancı antijen sunan hücreleri tanır ve öldürür. Antijen sunulmayan hücreleri de algılayıp bunları öldürmez. (Olayın aşamaları oklarla gösterilmiştir)

Sitotoksik T lenfositlerinin pik düzeyde aktive olabilmesi için yaklaşık bir haftalık süre gereklidir. Bundan önce, vücudun virüslara karşı savunmasını büyük ölçüde NK hücreler üstlenir. NK hücreler antijene spesifik değildir, yani viral antijenleri tanımaları için, bunların MHC molekülleri ile birlikte sunulmasına gerek yoktur. Özellikle viral infeksiyonların çok erken dönemlerinde, NK hücreleri aktive eden faktörler, virüsle enfekte hücrelerden salınan IFN-alfa ve IFN-beta'dır. NK hücreler, MHC sınıf I antijenlerinin üretimi virüsler tarafından engellenmiş, yani üzerinde sınıf I molekülü taşımayan hücreleri direkt olarak tanıyabilir. Ayrıca, NK hücreler, enfekte hücrelere bağlanmış antikorlara Fc kısımları ile bağlanır ve böylece hedef hücrelerle temas kurmuş olurlar. NK hücreler, hedef hücrelerle temas kurduktan sonra, sitotoksik T lenfositlerindeki mekanizma ile hücreyi öldürürler. Antikor yardımı ile gerçekleştirilen öldürme mekanizması ADCC olarak da nitelebilir. Özetle, NK hücreleri, sitotoksik T lenfositleri yeterli düzeye çıkmadan, virüslara karşı savunmayı sağlayan en önemli hücrelerdir.

Makrofajlar da önemli ölçüde antiviral aktivite gösterirler. Virüsler, makrofajlar tarafından fagosite edilebilir ve öldürülebilirler. Spesifik antikorlar ve komplement virüsleri opsonize ederek fagositozu artırırlar. Virüs sitopatik değilse ama hücre içinde üreyebiliyorsa kalıcı infeksiyon oluşur. Bu durumda, virüslerin öldürülebilmesi için makrofajların aktive edilmesi gerekir. Aktive olmuş T hücreleri tarafından salgılanan IFN-gama, makrofajların hem fagositoz hem de öldürme yeteneğini artırır. Makrofajların IFN-gama etkisi ile ürettikleri nitrik oksid sentetaz virüsidal etkiye sahiptir.

Virüslara karşı oluşan immunolojik belleğin süresi çok değişkendir. Bazı virüslara karşı oluşmuş antikorlar, antijenik uyarım olmasa bile uzun yıllar boyunca bulunabilir. Sitotoksik T hücrelerinden köken alan bir bellek T hücre popülasyonu uzun süre vücutta kalır. Bazı virüsler vücuttan uzaklaştırılsa bile, antijenleri antijen sunan dendritik hücreler üzerinde uzun süre kalabilir.

Virusların İmmun Yanıttan Kurtulma Yolları

Virusların hücre içinde yaşamaları, immün sistemin direkt denetiminden ve etkisinden kurtulmalarını sağlayan en önemli faktördür. Viruslar ayrıca immün sistem denetiminden ve immün yanıt etkisinden kurtulmak için başka mekanizmaları da kullanırlar.

Antijenik Değişimler

Viruslar antijenik yapılarını değiştirme özelliğine sahiptirler. Bazı virusların antijenik yönden farklı birçok serotipi bulunur. Böylece, bir serotipe karşı oluşan immün yanıt, diğer serotiplerden ileri gelen infeksiyonlara karşı koruma sağlamayabilir. Veya bir yıl salgınlara neden olan virus tipine karşı oluşan immün yanıt, daha sonraki yıl infeksiyona neden olan virusa karşı koruma sağlamaz. Bu tip antijenik değişikliğe *antijenik varyasyon* denir.

Bazı viruslarının zarflarında, hemagglütinin ve nörominidaz adı verilen proteinlerin birçok tipi bulunur. Böyle viruslar bir popülasyonda yayılırken, yaklaşık 2-3 yılda bir nokta mutasyonu geçirerek hemagglütinin ve nörominidazlarının yapılarını aşamalı olarak değiştirirler. Bu da viral antijenik yapıların özelliklerini önemli ölçüde değiştirir. Bu antijenik değişiklik sonucunda, eski tip virusa spesifik nötralizan antikolar ve sitotoksik T lenfositleri yeni tip virusa karşı çok etkili olamaz. Antijenik yapıdaki bu aşamalı değişime antijenik geçiş denir. Böylece, virus popülasyonda sürekli bulunma olanağına sahip olur. Bazı viruslar, 2-8 hafta kadar kısa sürelerde antijenik yapı değişikliği geçirebilirler.

Bazı viruslarda ise daha farklı bir şekilde *tam antijenik değişim* görülür. Bu tip varyasyonda, örneğin viral hemagglütininin yapısı aniden tamamen değişir ve yeni bir virus suşu ortaya çıkar. Bu yeni suşun hemagglütinini, eski suştan tamamen farklıdır. Bu tip varyasyon, genellikle o virus ile diğer bir virus arasındaki genetik rekombinasyondan kaynaklanır. Böyle viruslar, popülasyonlarda aniden patlak veren periyodik salgınlara neden olurlar. Çünkü, eski virusa karşı oluşan ve popülasyonun sahip olduğu bağışıklık, yeni virusa karşı hiç koruma sağlamaz.

SIRA SİZDE



4

Viruslardaki tam antijenik değişimin günümüzdeki örnekleri ve önemi nelerdir?

İmmunbaskılama (İmmunosupresyon)

Viruslar immün yanıtı çeşitli yollarla baskırlar. Bunlardan en önemlisi, virusların direkt olarak immün sistem hücrelerini infekte etmeleri ve bunların fonksiyonlarını bozmalarıdır. Viruslar, primer ve sekonder lenfoid dokuları etkileyebilirler. Örneğin, bir virus tipi, fare timusunda gelişmekte olan yardımcı T lenfositlerini öldürerek timus korteksinde nekroza neden olur. Bunun sonucunda immün sistem aşırı derecede baskılanır ve şiddetli bir immün yetmezlik şekillenir. Tavuklarda bazı viruslar bursa Fabriciusdaki lenfositleri tahrip ederek nekroza neden olur. Bunun sonucunda, infekte civcivler antikor sentezleyemezler. Bazı viruslar doğrudan yardımcı T lenfositlerini (CD4 hücreler) veya sitotoksik T lenfositlerini (CD8 hücreler) infekte eder ve fonksiyonlarını bozarlar. Bazı viruslar da sekonder lenfoid dokularda çoğalır ve tahrip ederler. Bunun sonucunda, lenfosit sayısı azalır, sitokin sentezi baskılanır, lenfosit ve makrofajların fonksiyonu bozulur, antikor seviyeleri düşer. İmmün sistemin baskılanması sekonder infeksiyonlara zemin hazırlar.

K İ T A P



İnfeksiyonlarda bağışıklık ile ilgili daha geniş bilgiyi İmmunoloji (1998) kitabında bulabilirsiniz.

Özet



Mukozal bağışıklığın unsurlarını ve işlevini açıklamak.

Mukozal savunma, asıl görevleri savunma olmayan ancak normal anatomik veya fizyolojik işlevlerini yürütürken savunmaya katkıda bulunan nonspesifik faktörlerle başlar. Mukozal lenfoid doku, mukoza ile temastaki antijenlere karşı, immun sistemden bağımsız olarak yanıt oluşturabilir. Spesifik bağışıklıkta salgısal antikorların önemli rolü vardır. Bunlar nötralizasyon yoluyla mikroorganizmaların ve toksinlerin girişini engeller. Ayrıca, intraepitelyal lenfositler, vücuttaki hücresel bağışıklık olaylarının çoğunu mukozada gerçekleştirirler.



Fötüs ve yenidoğanlarda bağışıklığın gelişimini açıklamak.

Evcil hayvanların fötüslerinde immun sistem organ ve hücrelerinin oluşumu aynı sırayı izler. Fötüsün anne karnında antijenlere verdiği yanıt fötüsün yaşı ile ilişkilidir. Evcil hayvanların çoğunda plasenta tipinden dolayı anneden fötüsa bağışıklık transferi olmaz. Gebelik süresi uzun olan türlerde yavru immun sistemi tam gelişmiş olarak doğar. Ancak antijenlere verdiği yanıt erişkin düzeyinde değildir. Bu açık doğumdan hemen sonra yenidoğanın anneden kolostrum emmesi ile kapatılır. Kolostrum bağışıklık elemanları yönünden çok yoğun bir salgıdır. Bu nedenle, yenidoğanın kendi immun sistemi yeterli olana kadar infeksiyonlardan korunması için mutlaka kolostrum alması gerekir.



Bakterilere karşı bağışıklığın gelişimini ve etkilerini açıklamak.

Bakterilerin sahip olduğu hücre duvarı, kapsül, flagella, fimbria, ekzotoksinler ve enzimler antijenik yapılardır ve bütün kimyasal gruplardan antijenler içerirler. Nonspesifik savunma engelleri ve mukozal savunma bakterilerin vücudunu engeller. Vücuda giren hücre dışı bakterilere karşı humoral immun yanıt oluşur. Humoral bağışıklık, antikorların nötralizasyon, opsonizasyon, komplement aktivasyonu ve yangı uyarımı gibi fonksiyonları ile patojenler üzerinde etkili olur. Hücre içi bakterilerin serbest olduğu dönemde humoral immun yanıt oluşur, ancak hücre içindeki bakterilere karşı makrofaj aktivasyonu ve sitotoksiteyi kapsayan hücresel bağışıklık etkilidir. Bakteriler fagositoz ve sindirimi engelleyerek, komplemente direnç göstererek, antikorları parçalayarak ve antijenik yapılarını değiştirerek immun yanıtı kurtulabilirler.



Virüslere karşı bağışıklığın gelişimini ve etkilerini açıklamak.

Çok basit bir yapıya sahip olan virüslerin kapsid, zarf ve enzim gibi az sayıda yapısı antijenik özelliğindedir. İnterferon virüslere karşı en önemli nonspesifik savunma faktörüdür. Virüsler hücre dışında buldukları sırada bunlara karşı humoral immun yanıt oluşur ve antikorlar nötralizasyon yoluyla virüsleri etkisiz hale getirir. Hücre içindeki virüslere karşı tek savunma yolu hücresel bağışıklıktır. Sitotoksik T hücreleri spesifik viral antijeni sunan infekte hücreleri tanır ve apoptozis yoluyla öldürür. NK hücreler viral antijen taşıyan infekte hücreleri direkt olarak tanıyarak veya antikora bağımlı hücresel sitotoksite mekanizması kapsamında apoptozis yoluyla öldürür. Virüsler immun sistemin çeşitli organ ve hücrelerinin fonksiyonunu bozarak immun baskılama yoluyla veya antijenik yapılarını değiştirerek immun yanıtı kurtulabilirler.

Kendimizi Sınayalım

1. Aşağıdakilerden hangisi sindirim kanalının doğal savunma mekanizmalarından biri **değildir**?
 - a. Epitel bariyeri
 - b. Mikroflora
 - c. Kirpikli epitel
 - d. Mide asitliği
 - e. Safra asitleri
2. İmmun dışlama mekanizması ile çalışan immunglobulin sınıfı aşağıdakilerden hangisidir?
 - a. IgG
 - b. IgM
 - c. IgA
 - d. IgE
 - e. IgD
3. Fötusta ilk ortaya çıkan immün sistem organı hangisidir?
 - a. Timus
 - b. Dalak
 - c. Lenf nodülü
 - d. Kemik iliği
 - e. Bursa Fabricius
4. Maternal bağışıklık için aşağıdakilerden hangisi **söylenemez**?
 - a. Kolostrum ile anneden yeni doğana antikor transfer edilir.
 - b. Kolostrum ile anneden yeni doğana bağışıklık hücreleri transfer edilir.
 - c. Maternal antikorlar yavrunun kendi immün yanıtını oluşturmamasını geciktirir
 - d. Maternal antikorlar yavrunun aşıya yanıtını azaltır.
 - e. Maternal antikorlar yeni doğanın bağırsağında emilmeden kalır.
5. "O antijeni" terimi hangi bakteri organelinin antijenik yapıları için kullanılır?
 - a. Hücre duvarı
 - b. İç yapı
 - c. Flagella
 - d. Fimbria
 - e. Kapsül
6. Hücre dışı bakterilere karşı bağışıklıkta antikorların hangi olayda rolü **yoktur**?
 - a. Yangı uyarımı
 - b. Tolerans
 - c. Opsonizasyon
 - d. Komplement aktivasyonu
 - e. Nötralizasyon
7. Aşağıdakilerden hangisi bakterilerin immün yanıtı kurtulma yollarından biri **değildir**?
 - a. Antijenik yapısını değiştirme
 - b. İmmün baskılama
 - c. Fagositoza direnç
 - d. Komplement etkisine direnç
 - e. İmmunglobulin tahribi
8. Aşağıdakilerden hangisi virüslere ait bir antijenik yapı **değildir**?
 - a. Hemagglütinin
 - b. Nörominidaz
 - c. Kapsid
 - d. Kapsül
 - e. Zarf
9. Viral enfeksiyonun başlangıcında en etkin hücresel bağışıklık elemanı aşağıdakilerden hangisidir?
 - a. Sitotoksik T hücresi
 - b. Yardımcı T hücresi
 - c. B hücresi
 - d. Makrofaj
 - e. NK hücre
10. Virusle infekte hücreyi ADCC mekanizması ile öldüren hücre aşağıdakilerden hangisidir?
 - a. Yardımcı T hücresi
 - b. Sitotoksik T hücresi
 - c. Baskılayıcı T hücresi
 - d. NK hücre
 - e. B hücresi

Kendimizi Sınavım Yanıt Anahtarı

1. c Yanıtınız yanlış ise, "Mukozal bağışıklık" bölümü yeniden gözden geçiriniz.
2. c Yanıtınız yanlış ise, "Mukozal bağışıklık" bölümü yeniden gözden geçiriniz.
3. a Yanıtınız yanlış ise, "Fötüs ve yenidoğanlarda bağışıklık" bölümü yeniden gözden geçiriniz.
4. e Yanıtınız yanlış ise, "Fötüs ve yenidoğanlarda bağışıklık" bölümü yeniden gözden geçiriniz.
5. a Yanıtınız yanlış ise, "Bakterilere karşı bağışıklık" bölümü yeniden gözden geçiriniz.
6. b Yanıtınız yanlış ise, "Bakterilere karşı bağışıklık" bölümü yeniden gözden geçiriniz.
7. b Yanıtınız yanlış ise, "Bakterilere karşı bağışıklık" bölümü yeniden gözden geçiriniz.
8. d Yanıtınız yanlış ise, "Viruslara karşı bağışıklık" bölümü yeniden gözden geçiriniz.
9. e Yanıtınız yanlış ise, "Viruslara karşı bağışıklık" bölümü yeniden gözden geçiriniz.
10. d Yanıtınız yanlış ise, "Viruslara karşı bağışıklık" bölümü yeniden gözden geçiriniz.

Sıra Sizde Yanıt Anahtarı

Sıra Sizde 1

Gıda kökenli proteinlerin büyük çoğunluğu bağırsakta antijenik olamayacak kadar küçük birimlere indirgenir ve çok azı antijenik formda vücuda girer. Supresör (baskılayıcı) T hücreleri bunlara karşı oluşan immun yanıtı baskılar ve gıda antijenlerine karşı tolerans gelişir. Ancak bu olay bile immun sistemi fazlasıyla meşgul edecektir. Bu nedenle bağırsaktaki kontrasupresör hücreler, supresör hücreleri baskılayarak gıda antijenlerine karşı sadece bağırsakta immun yanıt oluşmasını sağlarlar. Böylece gıda antijenleri vücuda girmeden bağırsakta giderilir.

Sıra Sizde 2

Yavruya kolostrum ile bağışıklık transferi çeşitli nedenlerle sekteye uğrayabilir. Bunlardan birincisi, erken doğumlarda memede yeterli kolostrumun birikmemesi veya kolostrumun doğumdan önce memeden sızmasıdır. İkinci neden, yavrunun yeterli kolostrumu alamamasıdır. Bu durum, özellikle normalden fazla sayıda yavru doğduğunda, ilk doğumlarda annelik içgüdüğü yeterince gelişmediğinde ve yavrunun emme refleksinde mekanik bir bozukluk bulunduğu söz konusu olur. Üçüncü neden ise, kolostrumun bağırsaktan yeterince emilememesidir.

Sıra Sizde 3

Gram negatif bakterilerin hücre duvarında endotoksin özelliğindeki lipopolisakkarid (LPS) maddesi algılanır. Dokularda endotoksinlere yanıt veren hücreleri nötrofiller, makrofajlar ve endotel hücreleridir. Ancak LPS bu hücreler tarafından direkt olarak algılanmaz. LPS önce lipopolisakkarid bağlayan protein (LBP) vasıtasıyla serumda serbest olarak bulunan CD14 molekülüne bağlanır, bu molekül de LPS'yi yangı hücrelerinin membranına taşır. Buradan da anlaşılacağı gibi, spesifik immun yanıt gelişmemiş olsa da, yangı hücrelerinin LPS'yi dolayısıyla bakterileri tanımalarını sağlayan iki anahtar molekül LBP ve CD14'tür.

Sıra Sizde 4

Tam antijenik değişimin günümüzdeki en çarpıcı örnekleri, kuş gribi ve domuz gribi olarak bilinen influenza enfeksiyonlarıdır. Doğada farklı hayvan türlerine ait influenza virusları arasında genetik çaprazlama olduğunda antijenik yapısı tamamen farklı bir virus ortaya çıkmaktadır. Antijenik yapının değişmesi sonucunda, geçmiş yıllarda kazanılan influenza bağışıklığının hiçbir önemi kalmamakta, insan ve hayvan popülasyonları bu enfeksiyona tamamen duyarlı olmaktadır. Bu tip salgınlar geçmişte milyonlarca kişinin ölümüne neden olmuştur. Gelişen teknoloji nedeniyle günümüzde bu durum yaşanmasa da, olayın hayvancılık endüstrisinden turizm sektörüne kadar olumsuz etkileri görülebilmektedir.

Yararlanılan Kaynaklar

- Cruse, J.M., Lewis, R.E. (1998). **Atlas of Immunology**, Boca Raton: CRC Pres.
- Diker, K.S. (1998). **İmmunoloji**, Ankara: Medisan Yayınevi.
- Erganiş, O., İstanbulluoğlu, E. (1993). **İmmunoloji**, Konya: Mimoza Yayıncılık.
- Male, D., Brostoff, J., Rott, D.B., Roitt, I. (2008). **İmmünoloji**, Çev. T. İmir, Ankara: Palme Yayıncılık.
- Pastoret, P.P., Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A. (1998). **Handbook of Vertebrate Immunology**, San Diego: Academic Pres.
- Tizard, I.R. (2009). **Veterinary Immunology**, St. Louis: Saunders.

10

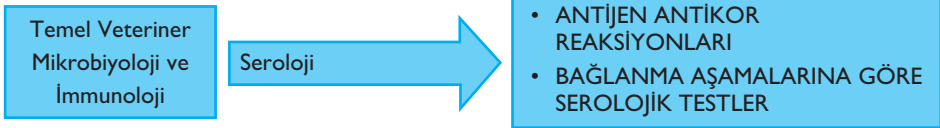
Amaçlarımız

- Bu üniteyi tamamladıktan sonra;
- Antijen-antikor reaksiyonlarının temel mekanizmasını tanımlayabilecek;
 - Tanı amaçlı kullanılan farklı serolojik testleri ilişkilendirerek karşılaştırabilecek;
 - Serolojik testlerin uygulama alanlarını ayırd edebileceksiniz.

Anahtar Kavramlar

- Antijen
- Antikor
- Spesifik
- Sulandırma (Dilüsyon)
- Aglutinasyon
- Presipitasyon
- Titre
- Konjugat
- Anti-immünglobulin
- Substrat

İçindekiler



Seroloji

ANTİJEN ANTİKOR REAKSİYONLARI

Seroloji kelimesinin tam karşılığı “serum bilimi”dir. Diğer bir ifade ile seroloji kan serumunda antikor varlığını/düzeyini inceleyen bir bilim dalıdır. Bu kavram içinde yer alan serolojik testler antijen antikor reaksiyonlarına dayalı teknikleri kapsar. Bilindiği gibi **infeksiyöz hastalıklar** sonucu konakçıda hastalık etkenlerine **spesifik** antikor yanıtı oluşur. Antikorlar vucutta en fazla kan serumunda bulunur. Bu nedenle hastalıkların teşhisinde kan serumunda spesifik antikor varlığının/düzeyinin saptanması büyük önem taşır. Bu amaçla çeşitli serolojik testler kullanılmaktadır. Serolojik testler kısa sürede yanıt alınması ve güvenilir olmaları nedeni ile infeksiyöz hastalıkların teşhisinde öncelikle tercih edilen yöntemlerden biridir.

Serolojik testlerin temelini antijen ve antikor molekülleri arasındaki spesifik reaksiyonlar oluşturmaktadır. Testlerin uygulanmasındaki amaca bağlı olarak serum veya antijen sulandırılmaları yapılır. Örneğin; infeksiyöz bir hastalık sonucu ya da yapılan bir aşılama sonrasında konakçıda oluşan spesifik antikor yanıtını saptamak amacı ile uygulanan serolojik testlerde şüpheli serum örneği sulandırılır ve üzerine uygun miktarda antijen eklenir. Uygun sıcaklıktaki inkübasyon süresi sonunda reaksiyonun oluşup oluşmadığı incelenir. Pozitif reaksiyonun gözlemlendiği en yüksek serum sulandırması serum titresi olarak değerlendirilir. Eğer konakçının doku ve vucut sıvılarında infeksiyöz bir hastalık etkeninin saptanması amaçlanıyorsa, antijen sulandırması yapılır ve üzerine uygun miktarda **antiserum** (antikor) eklenir. Yine yöntemine uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilir. Inkübasyon süresi sonunda pozitif reaksiyonun gözlemlendiği en yüksek antijen sulandırması antijen titresi olarak ifade edilir. Bu durumda bilinmeyen antijen kaynağı konakçının şüpheli kan, doku vb. örnekleridir. Bazı testler, antijen veya serum sulandırma yapılmaksızın direkt bir araya getirilerek uygulanır. Bu durumda serumun veya antijenin titresi belirlenemez ve sonuç “pozitif” veya “negatif” olarak değerlendirilir. Yukarıda da belirtildiği gibi serolojik testler çeşitli amaçlarla kullanılabilir. Bu amaçları şöyle sıralayabiliriz;

- İnfeksiyöz hastalıkların tanısı,
- Aşı programlarının düzenlenmesi amacı ile aşılama öncesi **maternal antikor** düzeyinin belirlenmesi ve aşı uygulamalarından sonra koruyucu bağışıklığın saptanması,
- Humoral immun yetmezliklerin belirlenmesi,
- Vucut dokularında veya kan, lenf vb. vucut sıvılarında antijen varlığının saptanması,
- Antijen ve antikor moleküllerinin tiplendirilmesi.

İnfeksiyöz hastalık: Bir mikroorganizma (bakteri, virus) tarafından oluşturulan hastalık.

Spesifik: Özgün, özel.

Antiserum: Aranan antijene karşı spesifik antikor içeren serum.

Maternal Antikor: Anneden yavruya aktarılan antikor.

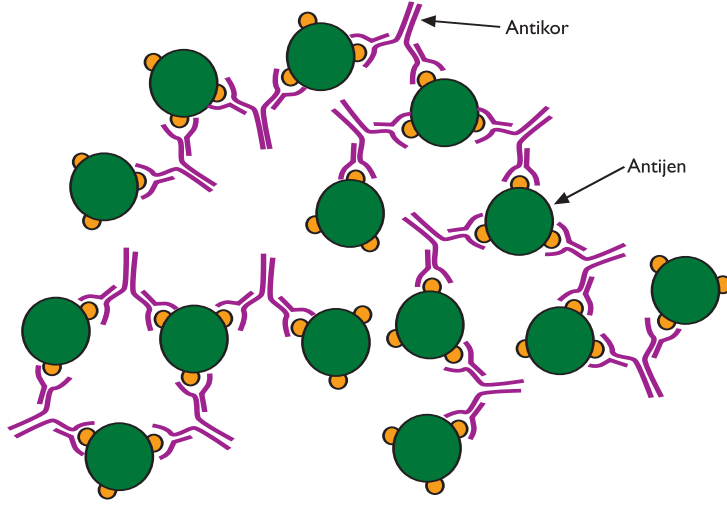
Serolojik Reaksiyonların İki Basamağı

Serolojik reaksiyonlarda antikor ve antijen molekülü arasındaki bağlanma iki aşamalıdır. İlk aşamada antijen ve spesifik antikor molekülü birbirlerine uygun reseptörler aracılığı ile bağlanırlar. Bu aşama hızlı oluşur, ısıya bağımlı değildir ve geriye dönüşebilir özelliktedir. Çıplak gözle görülemeyen bu döneme “birincil bağlanma aşaması” denir. İkinci aşamada ise, birbiri ile spesifik olarak bağlanmış olan antijen-antikor molekülüleri bir araya gelerek kümelenir ve bir kompleks oluşturur. Antijen antikor molekülünün oluşturdukları bu yapıya lattis (örgü) formasyonu denir. Bu aşama daha yavaş gelişir, ortamda elektrolit bulunması gerekir ve düşük ıslarda daha etkin bir birleşme olur. Oluşan antijen-antikor kompleksi bu aşamada kendi ağırlıkları ve elektrolitin etkisi ile çöker. “İkincil bağlanma aşaması” olarak tanımlanan bu dönemde antijen antikor molekülünün birbirinden ayrılması mümkün değildir, diğer bir ifade ile bu dönem geriye dönüşebilir (reversible) özellikte değildir. Gözle görülebilir olan bu dönemde, antijen ve **bivalan** yapıdaki antikor molekülüleri birden fazla reseptörleri aracılığı ile bağlanarak güçlü ve ağ benzeri bir yapı oluştururlar (Şekil 10.1).

Bivalan: Bir antikor molekülünün iki antijenik molekül ile birleşmesini sağlayan yapısal özelliği.

Şekil 10.1

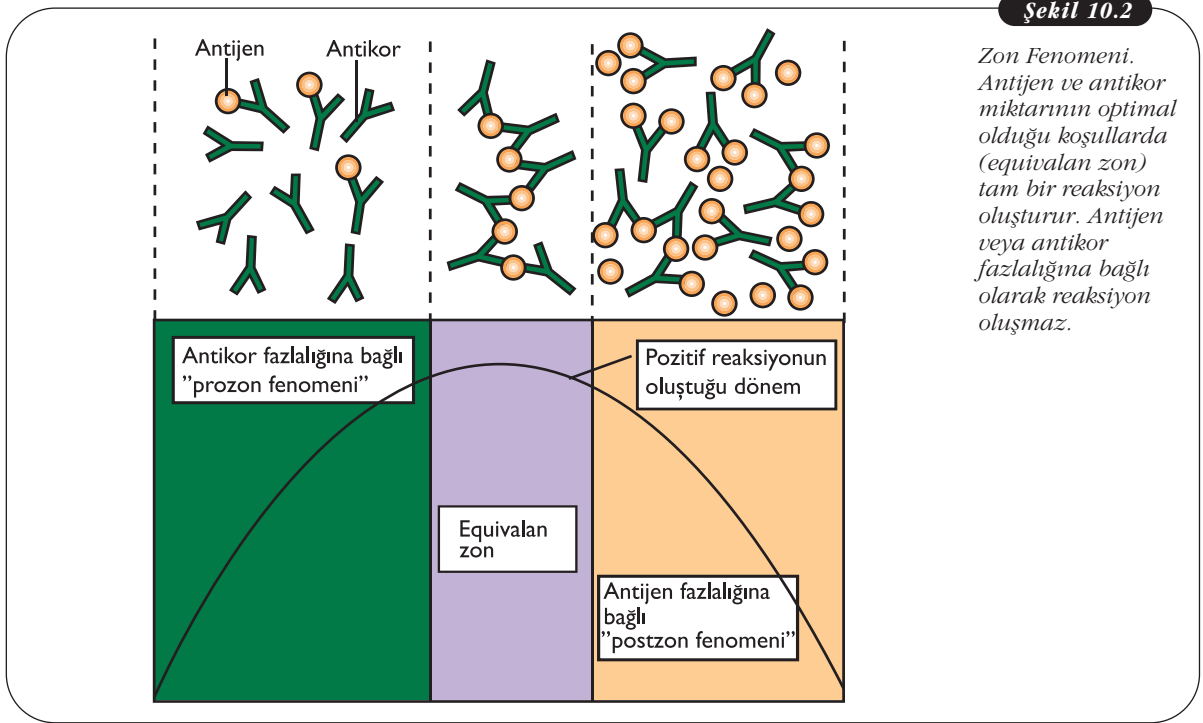
Antijen ve Antikor Molekülleri Arasındaki Spesifik Reaksiyon (Lattis Örgü Formasyonu)



Zon Fenomeni

Serolojik testlerde amaca bağlı olarak önce antijen veya antikor sulandırması yapılır, ardından da her bir sulandırma üzerine eşit miktarda standart antijen veya antikor eklenir. Örneğin bir kan serumu örneğinde antikor düzeyinin belirlenmesi hedeflenmiş olsun. Bu durumda önce serumun uygun oranlarda sulandırılması yapılır ve daha sonra ise standart antijen solusyonundan her birinin üzerine eşit miktarda eklenir. Uygun ısı ve sürede inkübe edildikten sonra oluşan reaksiyon değerlendirilir. İnkübasyon süresi sonunda, ilk tüplerde reaksiyonun olduğu ve son tüplere doğru azalan antikor miktarına bağlı olarak reaksiyonun zayıfladığı ve daha sonra oluşmadığı gözlenir. Bir sulandırma serisinde antijen ve antikor miktarlarının en uygun (optimal) olduğu tüplerde bu antikor ve antijen molekülünün hemen hemen tamamı birleşir ve tam bir reaksiyon oluşur. Ortamda çok az miktarda birleşmemiş antijen veya antikor molekülü vardır veya hiç yoktur. Antikor ve antijen molekülünün tam olarak reaksiyona girdiği bu optimal düzeye “equivalan

zon" adı verilir. İlk tüplerde antikor düzeyinin fazlalığına bağlı olarak negatif reaksiyon gözlenebilir ve ortamda reaksiyona girmemiş antikor molekülleri bulunur. Bu durum "prozon fenomeni" olarak bilinir. Sulandırma serisinin son tüplerinde ise gittikçe azalan antikor miktarına bağlı olarak negatif reaksiyon gözlenir ve bu durumda açıkta bağlanmamış antijen molekülleri bulunur. Normal koşullarda oluşması beklenen bu duruma "postzon fenomeni" denir (Şekil 10.2).



BAĞLANMA AŞAMALARINA GÖRE SEROLOJİK TESTLER

Birincil Bağlanma Testleri

Bu testler antijen antikor reaksiyonlarının birinci bağlanma aşamasını saptar. Diğer bir ifade ile bu aşamada antijen ve antikor molekülleri uygun reseptörleri ile sadece bağlanmışlardır ve henüz kümelenme ve çökme olmamıştır. Bu nedenle birincil bağlanma testlerindeki reaksiyonlar gözle görülemez ve bu reaksiyonların gözle görülebilir hale gelmesi için **konjugat** kullanılması gerekir. Birincil bağlanma testleri çok düşük konsantrasyonlardaki antijen veya antikorları saptama özelliğine sahip oldukları için duyarlılıkları yüksek testlerdir. Birincil bağlanma testlerinin önemli özelliklerinden bir diğeri ise kullanılan yöntemle göre antijen veya antikor moleküllerinin katı yüzeylere yapıştırılması ve reaksiyonların bu katı yüzeylerde oluşturulması, ardından reaksiyona girmeyen fazla antijen ve antikor moleküllerinin yıkanarak uzaklaştırılabilmesidir. Bu testlerin değerlendirilebilmesi için ELISA okuyucusu (spektrofotometre), floresan mikroskop vb. alet ve ekipmana gereksinim vardır. Bu testlere örnek olarak ELISA, İmmunofluoresan, Radioimmunoasay verilebilir.

Konjugat: Enzim, radioizotop, floresan boya gibi çeşitli moleküllerle işaretlenmiş antijen veya antikor.

Substrat: Enzimlerle kimyasal reaksiyonlara girerek çeşitli ürünler açığa çıkaran maddelerdir.

Enzim İmmunoassay (EIA)

Enzim immunoassay genel bir tanım olup, bu tanım içinde antijen veya antikor moleküllerinin enzim ile işaretlenmesi esasına dayanan ve enzim-**substrat** ilişkisi ile açığa çıkan reaksiyonların (renk değişikliği) değerlendirildiği testler bulunur. Veteriner hekimlik alanında bu kapsamda kullanılan en önemli ölçüm tekniklerinin başında ELISA (**E**nzyme **L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay) gelir. ELISA'da antikor veya antijen moleküllerini işaretlemek için en fazla kullanılan enzimler horseradish peroksidaz, alkalın fosfotaz ve β -galaktosidaz'dır. ELISA ile diğer birincil bağlanma testlerinde olduğu gibi antijen veya antikor varlığı veya düzeyi saptanabilir ve bu amaçla farklı teknikler uygulanır.

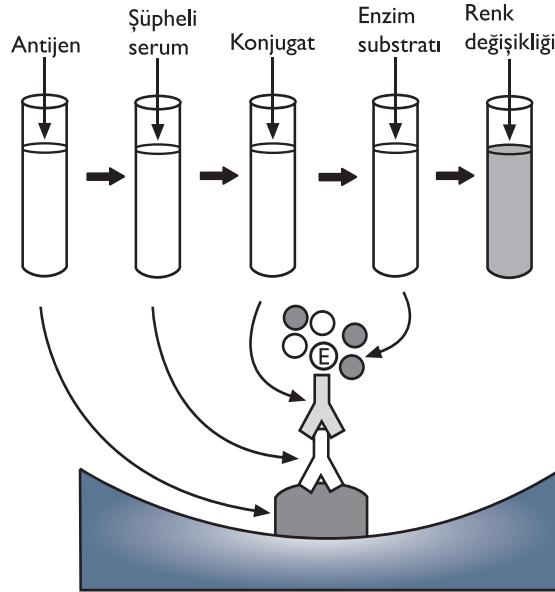
Antikor Saptamaya Yönelik ELISA

İndirekt ELISA: Bu yöntemde; ilk aşamada aranan antikora spesifik bilinen antijenin polistiren yüzeylere bağlanması sağlanır. Bağlanmamış antijenler yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Ardından şüpheli serum eklenir ve uygun bir süre inkübe edilir. Bu dönemde eğer şüpheli serumda antikor varsa antijen ile spesifik olarak bağlanacaktır. Yıkama işlemi tekrar uygulanır, antijenle bağlanmış antikorlar ortamda kalırken bağlanmamış antikorlar uzaklaştırılır. Bu aşamada antijen antikor bağlanmasını ortaya koymak için ortama enzim ile işaretlenmiş **anti-immunglobulin** (konjugat) eklenir. Eklenen anti immun-globulin, serumu incelenen havyan türüne özgüdür ve bu aşamada şüpheli serumda bulunan antikorlara bağlanır. İnkübasyondan sonra tekrar yıkama işlemi uygulanarak bağlanmamış maddeler uzaklaştırılır. Son olarak uygun enzim substratı katılarak oluşan reaksiyonun görülebilir olması sağlanır. Burada beklenen; katı yüzeye bağlanmış enzim işaretli anti-immunglobuline substratın etki ederek renk değişikliği ile reaksiyonu ortaya çıkarmasıdır. Eğer şüpheli serumda antikor yoksa, ilk aşamadaki antijenle bağlanmayacak ve yıkama işlemleri ile daha sonraki aşamada katılan maddeler de ortamdaki uzaklaştırılacağı için substrat katıldıktan sonra renk değişikliği olmayacaktır (Şekil 10.3).

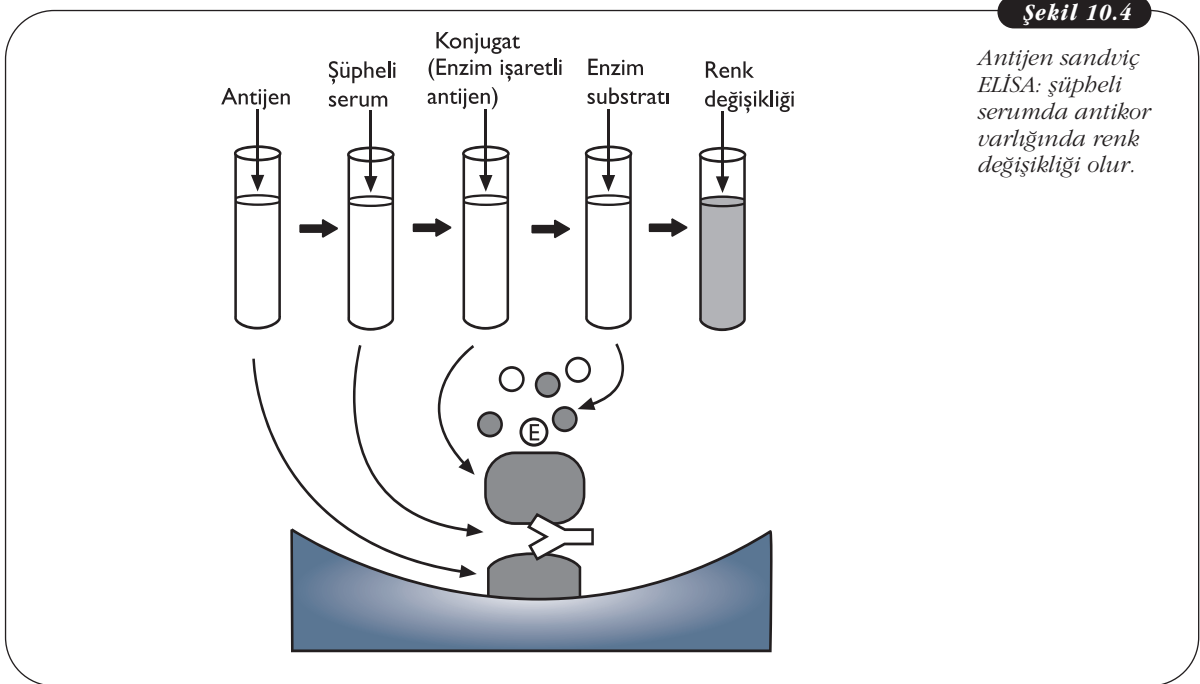
Anti-immunglobulin: Bir hayvan türüne ait immunglobulin (antikor) molekülünün başka bir hayvan türüne injekte edilmesi ile elde edilen immunglobulin molekülleridir.

Şekil 10.3

İndirekt ELISA: şüpheli serumda antikor varlığında renk değişikliği olur.



Antijen-Sandviç ELISA: İlk aşamada indirekt ELISA tekniğinde olduğu gibi, aranan antikora spesifik bilinen antijen polisteren yüzeylere bağlanır. Bağlanmamış antijenler yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Ardından ikinci aşamada, şüpheli serum eklenir ve uygun bir süre inkübe edilerek yıkama işlemi tekrar uygulanır. Üçüncü aşamada ise enzim işaretli spesifik antijen (konjugat) eklenir. İnkübasyon ve yıkama işleminin ardından substrat katılarak reaksiyon görülebilir hale getirilir. Bu durumda şüpheli serumda antikor varsa önce katı yüzeye bağlı spesifik antijen ile bağlanacak ardından enzim işaretli antijen ile bağlanarak substratın katılması ile renk değişikliği oluşacaktır. Şüpheli serumda spesifik antikor yokluğunda ise; ikinci aşama sonrası uygulanan yıkama işlemi ile ortamda antikor bulunmayacağı için sonraki aşamalarda katılan maddeler ile bir reaksiyon oluşmayacak ve renk değişikliği meydana gelmeyecektir (Şekil 10.4).

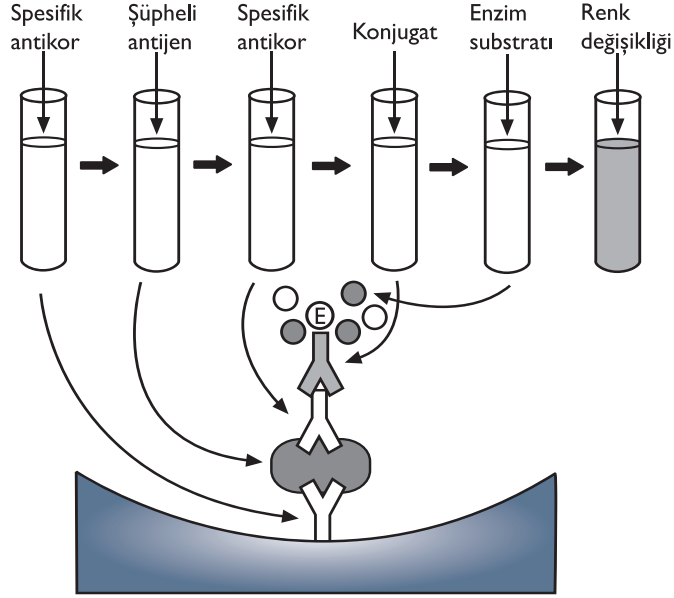


Antijen Saptamaya Yönelik ELISA

Antikor-Sandviç ELISA: Bu yöntemde antijen arandığı için ilk aşamada polisteren yüzeylere aranan antijene spesifik antikor kaplanır. Ardından antijen şüpheli test örneği (vucut sıvıları vb.) ortama eklenir. İnkübasyon periyodu ve yıkama işleminin ardından üçüncü aşamada aranan antijene spesifik antikor katılır, inkübasyon ve yıkama işlemi uygulanır. Dördüncü aşamada spesifik antikora karşı oluşturulmuş enzimle işaretli anti-immunglobulin (konjugat) eklenir. İnkübasyon ve yıkama işlemlerinin ardından son aşamada substrat katılarak test tamamlanır. Şüpheli test materyalinde antijen varsa, katı yüzeye bağlı olan spesifik antikor ile bağlanacağından ardından katılan diğer maddelerde aynı ilke ile birbirleri ile reaksiyona girerek katı yüzeye tutunacaktır ve son aşamada substratın katılması ile renk değişikliği görülecektir (Şekil 10.5)

Şekil 10.5

Antikor Sandviç ELISA: şüpheli test örneğinde antijen varlığında renk değişikliği olur.



SIRA SİZDE



ELISA'da farklı test yöntemleri var mıdır?

SIRA SİZDE



ELISA'dan başka enzim ile işaretleme tekniğine dayalı testler var mıdır?

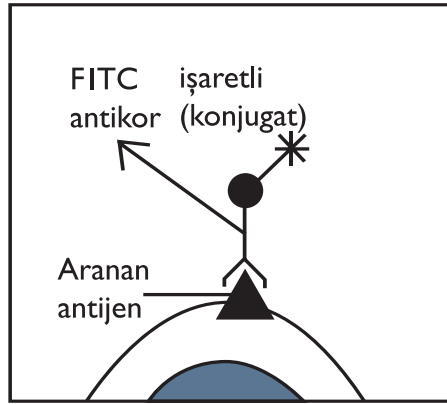
İmmunofluoresan Teknikleri

İmmunofluoresan (IF) teknikleri, antijen veya antikor moleküllerinin fluoresan boyalar ile işaretlenmesi ve oluşan spesifik antijen-antikor reaksiyonlarının ultraviyole (UV) ışığı altında fluoresan parlamalar ile gösterilmesi esasına dayanır. IF tekniklerinde fluoresein izotiyosiyanat (FITC) en sık kullanılan florokrom boyalardır ve reaksiyonlar fluoresan mikroskop altında görülmektedir. IF teknikleri de ELISA'da olduğu gibi antijen veya antikor aramak için farklı yöntemlerle uygulanabilmektedir.

Direkt Fluoresan Antikor Testi (FA): Bu teknik ile şüpheli materyaldeki antijen varlığı ortaya konur. Bu amaçla şüpheli doku kesiti veya sıvı örnekler bir lam üzerine fikze edilir. Üzerine aranan antijene spesifik ve FITC ile işaretlenmiş antikor (konjugat) eklenerek inkube edilir ve ardından bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak için yıkama işlemi uygulanır. Fluoresan mikroskopta yapılan incelemede, şüpheli örnekte antijen varsa fluoresan ışımalar gözlenir. Bu teknikle virus/bakteri gibi antijenik moleküllerin dokulardaki varlığı ve yerleşimi ortaya konulabilir. Ayrıca dışkı örneklerinde çeşitli bakterilerin varlığı veya doku kültürlerinde virus üremeleri bu teknikle saptanabilmektedir (Şekil 10.6).

Şekil 10.6

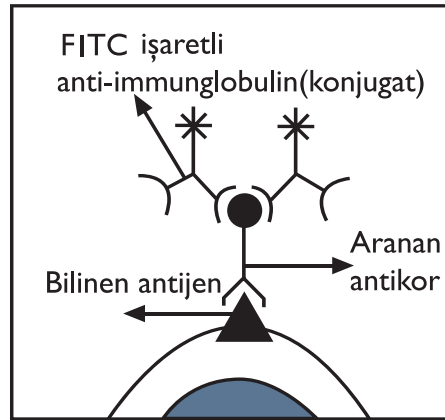
Direkt Fluoresan Antikor Testi



İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFA): IFA testi serumdaki antikor varlığını ortaya koymak veya doku ve hücre kültürlerindeki antijenleri (virus/bakteri) tanımlamak amacıyla uygulanır. Serumda antikor aramak için uygulanan IFA testinde; bir lam üzerine fikze edilmiş bilinen antijen içeren doku kesiti, smear veya hücre kültürü üzerine şüpheli serum örneği eklenir. İnkübe edilir ve yıkama işlemi uygulanarak sadece antijene spesifik olarak bağlanan antikorların ortamda kalması sağlanır ve spesifik olmayan antikorlar uzaklaştırılır. Üzerine FITC işaretli anti-immunglobulin (konjugat) eklenir ve inkübasyona bırakılır. Yıkama işlemi tekrarlanarak bağlanmamış konjugat ortamdan uzaklaştırılır. Preparat fluoresan mikroskop altında incelenir ve spesifik ışımaların gözlenmesi şüpheli serumda antikor varlığını ortaya koyar (Şekil 10.7).

Şekil 10.7

İndirekt Fluoresan Antikor Testi



Antijen aranması durumunda ise; şüpheli doku kesiti vb. materyal lama fikze edilir. Üzerine aranan antijene spesifik bilinen antiserum (antikor) eklenerek inkübe edilir ve yıkanır. Ardından üzerine FITC işaretli anti-immunglobulin (konjugat) eklenir ve inkübasyona bırakılır. Yıkama işlemi tekrarlanarak bağlanmamış konjugat ortamdan uzaklaştırılır. Sonuç aynı şekilde değerlendirilir.

Radyoimmunoassay (RIA)

RIA, antijen veya antikor moleküllerinin radyoizotoplarla işaretlenmesi ve oluşan spesifik antijen-antikor reaksiyonlarının açığa çıkardığı radyoaktivitenin özel cihazlarla (gama-counter) ölçülmesi esasına dayanan teknikleri içerir. Antijen veya antikor moleküllerini işaretlemek için genellikle iyot-125, karbon-14 gibi radyoizotoplar kullanılır. RIA antijen veya antikor saptamak amacı ile kullanılmaktadır. Bu tekniklerin başlıca kullanım alanları; vucut sıvılarında düşük düzeylerde bulunan ilaç, hormon, enzim aranması, allerjik bireylerde allerjene spesifik IgE saptanmasıdır. ELISA ve IFA tekniklerine benzer şekilde uygulanan farklı yöntemleri vardır. Diğer primer bağlanma testlerine göre çok daha duyarlı olmasına rağmen, RIA uygulayanlar için radyoaktivite nedeni ile sağlık riskleri taşıması, özel cihazlara gereksinim göstermesi ve maliyetlerinin yüksek olması nedeni ile günümüzde özel araştırma laboratuvarları dışında fazla tercih edilmemektedir.

SIRA SİZDE



Primer bağlanma testlerinde kullanılan reagentler nasıl hazırlanır veya nasıl temin edilir?

Reagent: Özellikle ELISA, IFA gibi serolojik testlerde reaksiyona katılan maddelerdir.

İkincil Bağlanma Testleri

İkincil bağlanma testleri, antijen-antikor reaksiyonlarının ikinci bağlanma aşamasını ortaya koyan testlerdir. Daha önce de bildirildiği gibi, bu aşamada birbirine spesifik olarak bağlanmış antijen ve antikor molekülü ağ veya örgü tarzında birleşerek erimeyen immün kompleksler oluştururlar. İkinci aşamanın oluşabilmesi için antijen ve antikor konsantrasyonunun da uygun (optimal) olması gerekir. Bu nedenle ikincil bağlanma testleri birincil bağlanma testlerine oranla daha az duyarlıdır. Buna karşın oluşan reaksiyonların çıplak gözle görülebilmesi, işaretleme teknikleri gibi özel uygulamalara gereksinim göstermemesi nedeni ile laboratuvarlarda daha kolaylıkla uygulanabilmektedirler. Bu testlere örnek olarak aglutinasyon, presipitasyon, komplement fiksasyon vb. verilebilir.

Presipitasyon

İkincil bağlanma testlerinde, eriyebilir özellikte olan antijenler ile homolog antiserumun bir araya gelmesi ile oluşan reaksiyonlara "presipitasyon" adı verilir. Eriyebilir özellikteki antijenlere "presipitinojen ve bunlar ile reaksiyona giren spesifik antikorlara ise "presipitin" denir. IgG, IgM ve IgA presipitasyon reaksiyonlarına katılan immünglobulinlerdir. Ancak IgG en güçlü presipitindir. Serum proteinleri ve bakteriyel polisakkarit yapılar en önemli presipitinojenlerdir. Presipitin ve presipitinojen uygun koşullarda bir araya getirildiğinde ilk birkaç dakika içinde bir bulanıklık oluşur, bu birleşme dönemidir. Birkaç saat içinde ise antijen-antikor kompleksi oluşur ve tüpün dibine çöker. Antijen-antikor kompleksine "presipitat" denir. Presipitasyon testleri sıvı veya yarı katı ortamlarda uygulanır. Bu ortamlar antijen ve antikor moleküllerinin rahatlıkla hareket edebildiği ve spesifik moleküllerin birbirleri ile reaksiyona girebildiği ortamlardır. Sıvı ortamlarda gerçekleştirilen presipitasyon testlerinde, reaksiyonun olduğu tüplerde bulanıklık meydana gelir, presipitasyon oluşmayan tüpler ise berrak görünümündedir. Presipitasyon testlerinde sulandırma yapılarak zon fenomeni gözlemek mümkündür. Yarı katı ortamlarda yapılan presipitasyon testlerinde ise antijen ve antikor jel içinde ilerleyerek karşılaştıkları yerde reaksiyona girerler ve reaksiyon çizgi halinde gözlenir. Yarı katı or-

tamlarda uygulanan presipitasyon testlerinin laboratuarlarda en fazla kullanılanları immunodiffuzyon teknikleri ve immunoelktroforezdir.

İmmunodiffuzyon Teknikleri

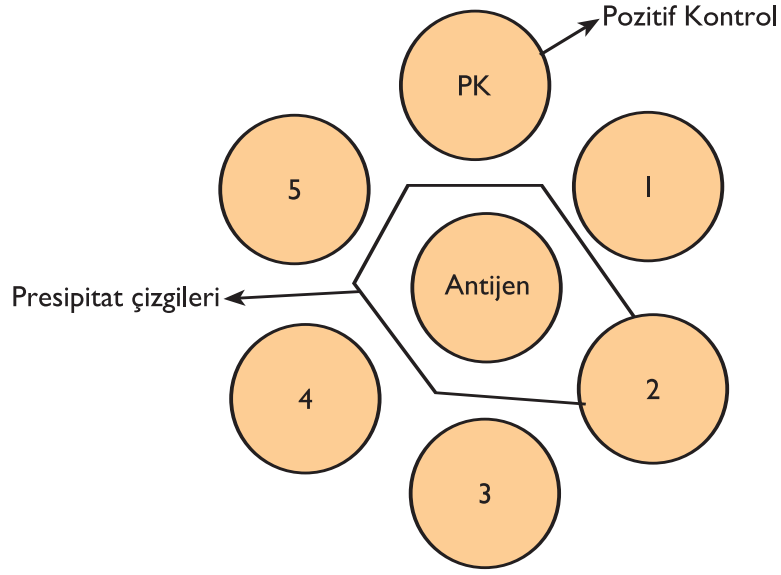
Antijen ve antikor molekülleri arasındaki presipitasyon reaksiyonunu yarı katı ortamlarda ortaya koyan teknikleri içerir. Uygun koşullarda inkube edilen antijen ve antikor moleküllerinin yarı katı agar içinde diffuzyonla ilerleyerek karşılaştıkları yerlerde reaksiyona girmesi ve beyaz, opak presipitat bantları oluşturması esasına dayanır. İmmunodiffuzyon teknikleri tek yönlü veya çift yönlü immunodiffuzyon tekniği olarak uygulanmaktadır.

Tek Yönlü İmmunodiffuzyon Tekniği: “Oudin Yöntemi” olarak da bilinir. Bu yöntemde, şüpheli serum sıvı haldeki agaroz jele karıştırılarak agar tüpte soğuma-ya ve katılaşmaya bırakılır. Agar katılaştıktan sonra sıvı haldeki antijen tüpün yüzeyine ince bir katman olarak eklenir. Antijen yarı katı agarın yüzeyinden tüpün dibine doğru diffuzyon ile yayılır ve agar içinde bulunan şüpheli serumda eğer antikor varsa antijen ile karşılaştığı yerde presipitat çizgileri oluşturur. Bu teknik ile sadece bir antijen antikor reaksiyonu incelenebilir.

Çift Yönlü İmmunodiffuzyon Tekniği: “Ouchterlony Yöntemi” olarak da bilinen bu yöntem ile aynı test ortamında birden fazla sayıdaki şüpheli serumu veya antijeni immunodiffuzyon tekniği ile incelemek mümkündür. Bu yöntem pratikte Agar Jel Presipitasyon (AGP) testi olarak da bilinir. AGP testi ile çeşitli hastalıkların tanısı konulabildiği gibi antijen moleküllerinin arasındaki ilişki de tanımlanabilir. AGP testi ile hastalıktan şüpheli hayvanların kan serumlarında antikor varlığı incelenir, ayrıca çeşitli vucut sıvıları veya doku vb. örneklerinde antijen varlığı da ortaya konabilir. Bu durumda incelenecek antikor veya antijene spesifik bilinen antiserum veya antijen kullanılması gerekir. Bu testte kullanılan agar bazı farklı ve özgün özellikler taşır. Test ortamında spesifik antijen ve antikor moleküllerinin diffuzyon ile ilerlemesi ve karşılaştıkları yerde presipitat bantı oluşturabilmesi için agarın elektrolit dengesinin sağlanması önemlidir. Bu amaçla kullanılan yönteme göre agar içine çeşitli elementlerden hazırlanmış çözeltiler katılabilir. Ayrıca hazırlanan agarın yarı katı özellikte olması önemlidir. Bu nedenle test ortamı genellikle % 0.1- 0.8 oranında agar içerir. Test mikroskop lamı veya petri kutularına dökülmüş agar ortamında uygulanır. Plastik veya cam petri kaplarında ya da lamda bulunan jelin kalınlığı, açılacak çukur sayısı, çukurların çapı ve çukurların birbirinden uzaklıkları da farklılık göstermektedir. Agar üzerinde genellikle merkezde bir, çevresinde 6 olmak üzere toplam 7 adet çukur açılır. Testte şüpheli serumlarda antikor varlığının incelendiği durumlarda; ortadaki çukura bilinen spesifik antijen konur. Çevresindeki kuyucuklara ise incelenen serum örnekleri yerleştirilir. Oluşan reaksiyonun net olarak değerlendirilebilmesi, nonspesifik bantların ayırt edilebilmesi için çevredeki kuyucuklardan birine pozitif kontrol serum örneğinin konulması yararlıdır. Böylece bilinen antijen ve antikor arasında oluşan presipitat çizgisinin diğer örneklerde oluşacak presipitat çizgileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi açısından önemlidir. Nemli ortamda, birkaç günlük inkubasyon süresi sonunda sonuçlar incelenir (Şekil 10.8).

Şekil 10.8

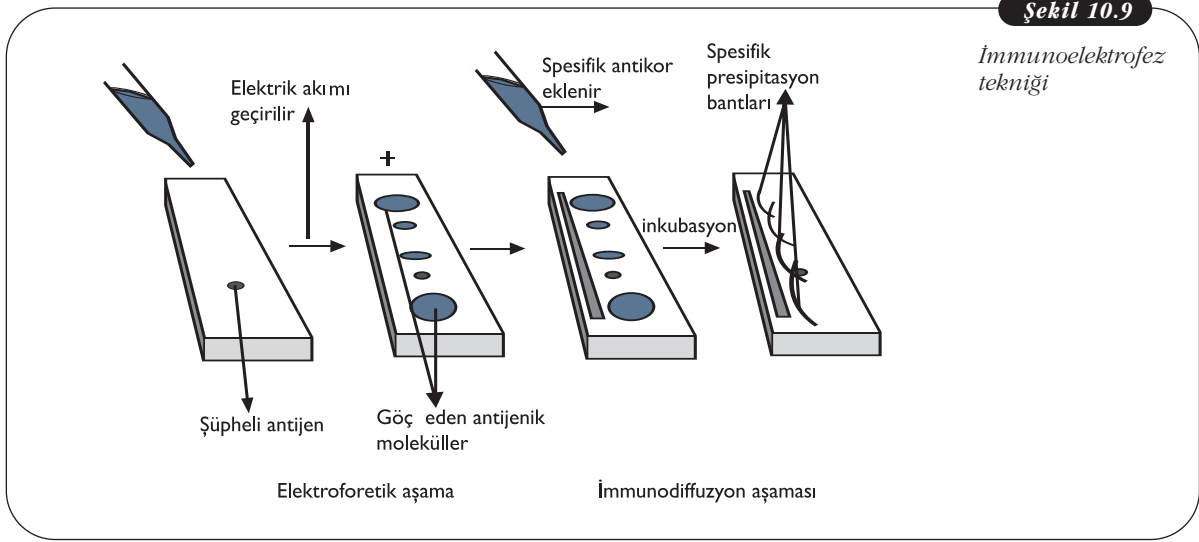
Çift Yönlü İmmunodiffüzyon Tekniği: 1, 3, 4 ve 5 nolu örnekler pozitif, 2 nolu örnek negatif.



Radial İmmunodiffüzyon Tekniği: Jel ortamında immunodiffüzyon tekniğinin uygulandığı diğer bir yöntemdir ve “Mancini Yöntemi” olarak da bilinmektedir. Radial immunodiffüzyonun en önemli avantajı aynı zamanda miktar tayini yapılabilirliğidir. Bu teknikte agar içine antiserum karıştırılır ve petri kabına dökülerek katılaşması sağlanır. Ortasına açılan kuyucuk içine incelenecek antijen konur ve inkubasyona bırakılır. İnkubasyon süresi sonunda antijen kuyucuğunun çevresinde dairesel presipitasyon bantı oluşur. Antijenin agar içinde diffüzyon ile yayılması sonucu oluşan presipitasyon halkasının çapı antijenin konsantrasyonu ile direkt olarak ilişkilidir. Bu tekniğin en yaygın kullanım alanı, serum proteinlerinin miktarlarının saptanmasıdır. Örneğin kan serumundaki IgG, IgM, lizozim, kompleman vb. proteinler bu yöntem ile saptanır.

İmmunoelektroforez Teknikleri

Kompleks yapılu antijenik moleküller ile yapılan jel diffüzyon tekniklerinde, presipitat bantlarının tam olarak oluşmadığı durumlarda karşılaşılabılır. Bu durumlarda immunoelektroforezis yöntemi daha net sonuçlar vermektedir. İmmunoelektroforezis, önce ortama elektrik verilerek sağlanan elektroforetik aşama ile daha sonra uygulanan immunodiffüzyon aşamasından oluşur. Bu yöntemde uygun koşulları taşıyan agar ince bir katman halinde dökülerek dondurulur. Ortasına bir kuyucuk açılarak incelenecek antijen örneği konur ve elektrik akımı geçirilerek elektroforeze tabi tutulur. Bu aşamada incelenen örnek içindeki antijenik moleküller elektrik yüklerine göre farklı alanlara göç ederler. İkinci aşamada kuyucuğun ön kısmına ve elektroforez yönüne paralel olarak ince bir kanal açılır ve bu kanala incelenen örneğe spesifik antiserum eklenir ve inkübe edilerek diffüzyonu sağlanır. İnkubasyon süresi sonunda antiserum içindeki antikorlar diffüzyon ile ilerleyerek agar içinde farklı yerlere göç etmiş antijen molekülleri ile karşılaştıkları yerlerde presipitasyon bantları oluştururlar (Şekil 10.9).



İmmunoelektroforezis tekniği diğer immunodiffuzyon tekniklerine göre bazı avantajlara sahiptir. Öncelikle elektriksel alanda göç ettirilen protein molekülleri çok daha net birbirlerinden ayrılır ve farklı alanlara göç ederler. Böylece antikorların agar içinde diffuzyon ile yayılmasından sonra oluşan presipitasyon bantları diğer tekniklere göre daha açık ve temiz bir görüntü verir. İmmunodiffuzyon teknikleri birkaç günlük inkübasyon süresine ihtiyaç duyarken elektroforez ile daha kısa sürede sonuç alınabilmektedir. İmmunoelektroforezis tekniği ile serum proteinlerinin içerikleri incelenerek herhangi bir anomali (kongenital eksiklikler veya myelomaya bağlı yüksek protein düzeyi gibi) olup olmadığı saptanır. Ayrıca vücut sıvılarında çeşitli antijenik moleküllerin varlığı da bu yöntem ile incelenmektedir.

Aglutinasyon

Aglutinasyon, partiküler yapıdaki antijen ile homolog antiserumun bir araya gelmesi sonucu oluşan reaksiyonlara verilen isimdir. Aglutinasyon reaksiyonunda antijen partikül halindedir ve bivalan yapıdaki spesifik antikorlar ile reaksiyona girdiklerinde kümelenirler. Aglutinasyon reaksiyonlarına katılan antijenlere aglutinojen, antikorlara ise aglutinin adı verilir. Aglutinojenlere örnek olarak bakteriler, kan hücreleri verilebilir. IgG ve IgM'ler güçlü aglutininlerdir. Aglutinasyonun mekanizması diğer sekonder bağlanma testlerinde olduğu gibi iki basamaklıdır. İlk basamakta aglutinojen ve spesifik aglutinin bir araya gelerek spesifik determinantları ile bağlanırlar. Bu dönem reversible (geriye dönebilir)'dir ve ısı, pH, elektrolit dengesi gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. İkinci basamakta ise antijen - antikor moleküllerinin determinantları arasındaki bağ oluşan köprüler ile güçlenir ve irreversible (geri dönmeyen) immunkompleks oluştururlar. Bir araya gelen antijen-antikor moleküllerinin bu kompleks yapıyı oluşturmalarına lattice (örgü) kuramı adı verilir. Oluşan bu kompleks yapı daha sonra kendi ağırlığı ile dibe doğru çöker ve gözle görülebilir bir çökelti oluşturur, bu çökeltiye "aglutinat" adı verilir. Aglutinasyon testleri başlıca; kan serumunda spesifik antikor saptanması veya vücut sıvılarında antijen saptanması, kan grubu belirlenmesi amaçları ile uygulanan ve kısa sürede sonuç veren testlerdir.

Laboratuarlarda farklı tekniklerle uygulanan çeşitli aglutinasyon testleri bulunmaktadır.

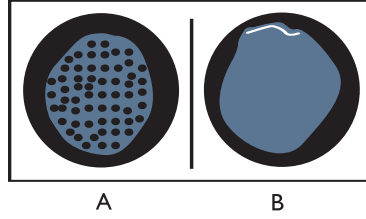
Çabuk Lam Aglutinasyon Testi: Lam üzerinde uygulanan ve birkaç dakika gibi kısa sürede yanıt veren testlerdir. Bu teknikte bir öze dolusu yoğun bakteri suspansiyonu bir öze dolusu yoğun antiserum ile bir lam üzerinde bir araya getirilerek karıştırılır ve homojenize edilir. Pozitif reaksiyon aglutinasyon sonucu birkaç dakika içinde oluşan tipik granüllerin gözlenmesi ile saptanır. Negatif reaksiyonda

ise antijen-antikor karışımı homojen bir yapıda gözlenir (Şekil 10.10).

Bu test şüpheli kan serumunda antikor varlığını ortaya koymak veya bakterilerin identifikasyonu amaçları ile uygulanmaktadır. Lam aglutinasyon testinde incelenen örnekte antijen veya antikorun titresinin saptanması mümkün olmayıp sadece var veya yok şeklinde sonuç elde edilir.

Şekil 10.10

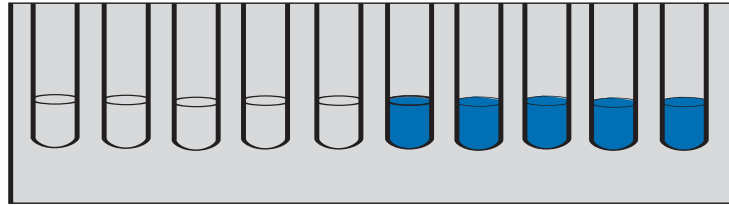
Çabuk lam aglutinasyon testi
A: pozitif
B: negatif



Tüp Aglutinasyon Testi: Tüp aglutinasyon testleri antijen veya antikor titresinin belirlenmesi amacı ile uygulanır. Çoğunlukla şüpheli hayvanlara ait kan serumlarında antikor titresinin belirlenmesi amacı ile uygulanan bu testlerde; serumun bir seri sulandırması yapılarak üzerine bilinen antijenden eşit miktarda eklenir. İnkubasyon süresi sonunda pozitif reaksiyonda; antijen antikor kompleksi tüpün dibinde dantela şeklinde bir çökelti oluşturur ve tüpün üst kısmı berrak bir görüntü alır. Negatif reaksiyonda ise tüpün üst kısmı bulanık yapıda olup, tüpün dibinde birleşmemiş antijen moleküllerinin kendi ağırlıkları ile çökmesi sonucu oluşmuş düğme şeklinde bir görüntü vardır (Şekil 10.11).

Şekil 10.11

Tüp aglutinasyon testi.



SIRA SİZDE



Titre nedir? Nasıl belirlenir?

Diğer Aglutinasyon Testleri: Yukarıda açıklanan lam ve tüp aglutinasyon testleri laboratuarlarda en sık kullanılan testlerdir. Bu testler dışında süt halka (ring) testi, vaginal mukus ile aglutinasyon, seminal plazma ile aglutinasyon, pasif aglutinasyon testi, antiglobulin (Coombs) testi gibi farklı amaçlarla ve farklı koşullarda uygulanan aglutinasyon testleri bulunmaktadır.

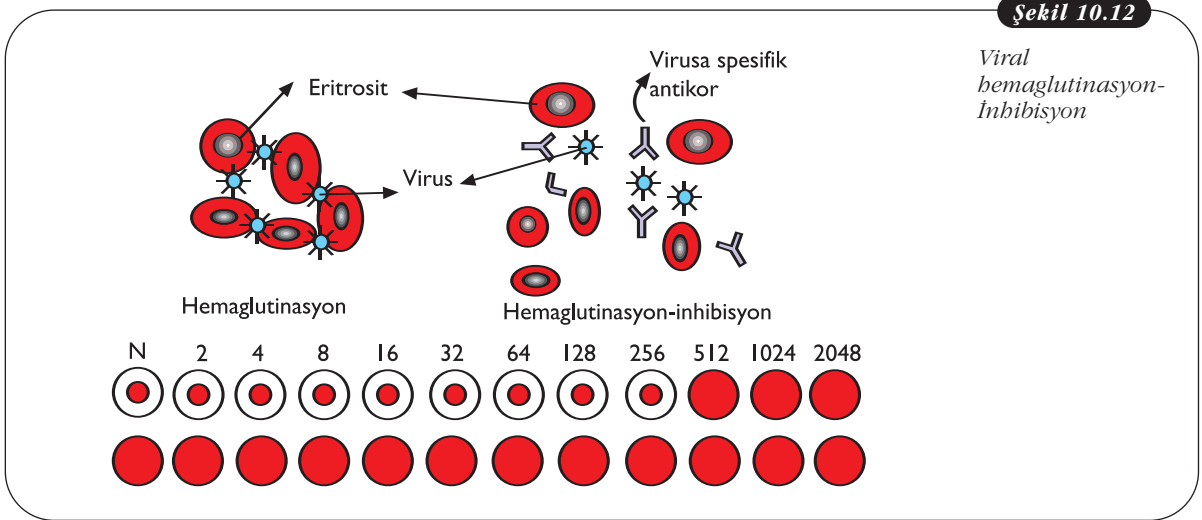
K İ T A P



Aglutinasyon testlerinin diğer uygulama yöntemlerine K.Serdar DİKER'e ait İmmunoloji (Medisan Yayın Serisi:37, İkinci Baskı 2005) kitabından ulaşabilirsiniz.

Viral Hemaglutinasyon ve İnhibisyonu

Bazı viruslar memeli veya kanatlı eritrositlerine bağlanarak kümelenme ve aglutine etme özelliğine sahiptir. Hemaglutinasyon (HA) olarak tanımlanan bu özellik serolojik bir reaksiyon değildir ve sadece bu özelliğe sahip virusların karakterizasyonu amacı ile kullanılır. Hemaglutinasyon inhibisyon ise; HA özelliğine sahip viruslara karşı oluşan spesifik antikorlar aracılığı ile bu virusların HA özelliklerinin ortadan kaldırılması, diğer bir ifade ile inhibe edilmesidir. Bu reaksiyon temel alınarak geliştirilen hemaglutinasyon-inhibisyon (HI) testi ile HA özelliğine sahip virusların oluşturduğu hastalıkların tanısı konulmakta veya bu virusların identifikasyonu yapılmaktadır. HI testinin mekanizması; HA özelliğine sahip antijen (virus) ile spesifik antikorunun bir araya gelerek reaksiyona girmesi ve ardından ortama eklenen eritrositlerin bu viruslar tarafından aglutine edilememesidir (Şekil 10.12).



Reaksiyona ikinci aşamada eklenen eritrositler oluşan HI reaksiyonunun görülebilir olmasını sağlayan indikatör hücrelerdir. HA özelliğine sahip viruslar arasında orthomyxoviruslar, paramyxoviruslar, flaviviruslar, bunyaviruslar, coronaviruslar, adenoviruslar, reoviruslar, parvoviruslar bulunmaktadır. Ayrıca mycoplasmalar gibi bazı bakterilerde de HA özelliği bulunmaktadır.

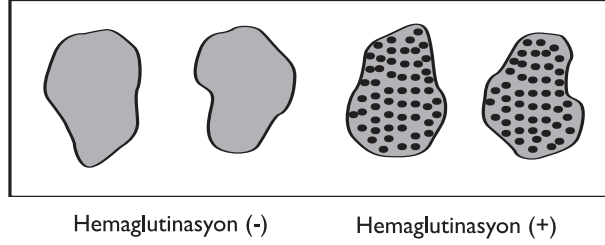
Viral Hemaglutinasyon Testi

Viral HA testi; virusların tanımlanması ve HI testinde kullanılacak virusun (antijenin) HA titresini saptanması olmak üzere başlıca iki amaçla uygulanır. HA testi virus ile eritrositler arasında gerçekleşen bir reaksiyondur ve reaksiyona antikor molekülü katılmadığı için serolojik bir test değildir. HA testleri lamda veya tüpte olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmaktadır.

Çabuk Lam HA Testi: Virusların identifikasyonu amacı ile uygulanan bu testte, temiz bir lam üzerine bir damla %2'lik eritrosit konur ve üzerine bir damla antijen eklenir. Birkaç saniye içinde gözlenen kümeleşmeler pozitif olarak değerlendirilir (Şekil 10.13)

Şekil 10.13

Çabuk lam
hemaglutinasyon
testi



Yavaş Tüp HA Testi: Antijenin iki katlı dilusyonları yapılarak ardından bütün tüp-
lere eşit miktarlarda %1-2'lik eritrosit suspansiyonundan eklenir. Oda sıcaklığında
30-45 d. inkubasyona bırakılır. Pozitif reaksiyonda tüpün dibinde dantela şeklinde
bir çökelti oluşur. Pozitif reaksiyonun gözlemlendiği en yüksek antijen sulandırması
belirlenir ve incelenen infeksiyonun özelliğine göre standart HA ünitesi de dikka-
te alınarak antijenin (virusun) HA titresi hesaplanır. Bu test, HI testi öncesinde an-
tijenin HA titresinin belirlenmesi amacı ile uygulanır. Günümüzde pratik olması
açısından HA ve HI testleri **mikropleytlere** uygulanmaktadır (Şekil 10.14)

Mikropleyt: Mikrolitre
düzeyinde küçük miktar
sıvılarla çalışma olanağı
sağlayan, üzerinde 6-96
adet göz bulunan sert
malzemelerden yapılmış
laboratuvar gereçleridir.

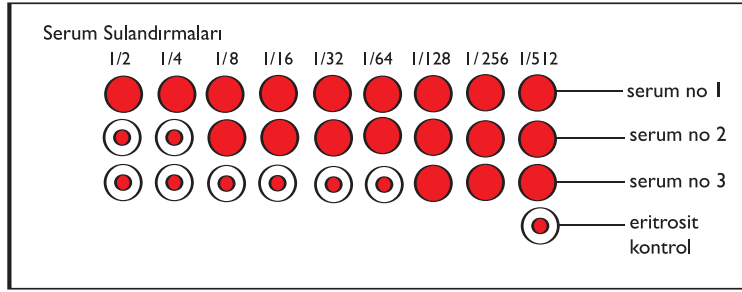
Şekil 10.14

Mikropleytle
hemaglutinasyon
testi

Serum No	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Pos.	Neg.	Titre
1	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	●	○	64
2	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	●	○	8
3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	○	512
4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	<2
5	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	●	○	32
6	○	○	●	●	●	●	●	○	○	○	●	○	128
7	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	●	○	32
8	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	4

Viral Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi: Antikor aranması amacı ile uygulanan
HI testinde, ilk aşamada şüpheli serumun iki katlı dilusyonları yapılır ve ardından
HA titresi daha önce belirlenmiş bilinen antijen tüm dilusyonların üzerine eşit mik-
tarda eklenir. Uygun ısıda ve sürede inkübe edilen karışımın üzerine %1-2'lik erit-
rosit suspansiyonundan eklenir ve tekrar uygun ısıda ve sürede inkübe edilir. Şüp-
heli serumda antikor varlığında antijen ve antikor ilk aşamada reaksiyona girer ve
ikinci aşamada ilave edilen eritrositler açıkta kalarak kendi ağırlıkları ile çökerler.
Sonuçta pozitif reaksiyonlarda dipte düğme şeklinde eritrosit kümelenmesi gözle-
nir. Şüpheli serumda antikor bulunmadığı durumda ise, ilk aşamada bilinen anti-
jen antikor ile reaksiyona girmeyeceği için ikinci aşamada eklenen eritrositler ile
reaksiyona girer ve aglutine eder. Sonuçta negatif reaksiyonlarda dipte aglutine ol-
muş eritrositler dantela şeklinde gözlenir (Şekil 10.15).

Şekil 10.15



Viral hemaglutinasyon İnbibisyon Testi:
 1 nolu serum: negatif
 2 nolu serum: 1/4
 3 nolu serum: 1/64

Pozitif reaksiyonun (hemaglutinasyon inhibisyonun) gözleendiği en yüksek serum sulandırması belirlenir ve incelenen hastalığın özelliğine göre standart HA ünitesi de dikkate alınarak serumun HI titresi hesaplanır. Veteriner hekimlikte özellikle kanatlı hayvanların infeksiyonlarının tanısı amacı ile sıklıkla kullanılan testlerden biridir.

Viral hemaglutinasyon ve inhibisyon testlerinde HA üniteleri ile birlikte titre hesaplanmasına Aysin ŞEN'e ait İmmunoloji-Seroloji Dersi Uygulama Notları (U.Ü. Veteriner Fakültesi, 2010) ders notundan ulaşabilirsiniz.



Komplement Fikzasyon

Komplement antijen-antikor reaksiyonlarına katılarak hücre lizisine neden olan bir serum proteindir. Örneğin bir eritrosit hücresi ile spesifik antikor bir araya getirilirse ve ortamda komplement varsa antijen(eritrosit)-antikor kompleksine bağlanan komplement eritrositi lize eder. Komplement fikzasyon (CF) testi komplemanın bu özelliğinden yararlanarak serumdaki antikor varlığını ortaya koyan ikincil bağlanma testidir. Test iki aşamalı olarak uygulanır:

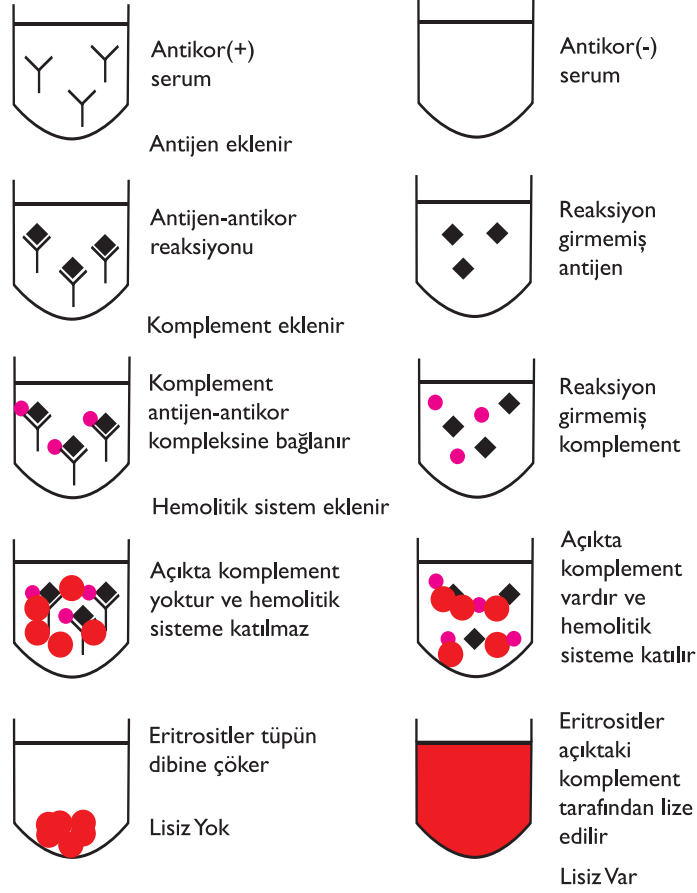
- İlk aşamada; şüpheli serum-bilinen antijen ve komplement kaynağı olarak kobay serumu bir araya getirilir ve inkübe edilir. Testte komplement kaynağı olarak kobay serumunun kullanılmasının nedeni, içerdiği komplemanın koyun eritrositlerini lize etme özelliğidir. Kullanılan kobay serumu taze ve önceden titre edilmiş olmalıdır.
- İkinci aşamada; inkubasyon süresi sonunda ortama "hemolitik sistem" olarak koyun eritrositi (antijen) ve tavşanda koyun eritrositlerine karşı elde edilmiş antikor (amboseptör) eklenir ve tekrar inkübe edilir.

Testin yorumlanması: Şüpheli serumda antikor varsa; ilk aşamada bilinen antijen ile şüpheli serumdaki antikorlar reaksiyona girecek ve ortamdaki komplement de bu reaksiyona katılarak kullanılacaktır. İkinci aşamada ortama katılan hemolitik sistemde komplement etkili olamayacağından **hemoliz** görülmeyecektir. Diğer bir ifade ile hemolizin görülmemesi sonucun pozitif olduğunun (serumda antikor bulunduğunun) göstergesidir. Şüpheli serumda antikor yok ise; ilk aşamada bilinen antijen ile reaksiyona girecek antikor olmayacağından ortamdaki komplement de kullanılmayacaktır. İkinci aşamada ortama katılan hemolitik sisteme ilk aşamada kullanılmamış olan komplement de katılarak koyun eritrositlerini lize edecektir. Sonuçta hemolizin görülmesi sonucun negatif olduğunun (serumda antikor bulunmadığının) göstergesidir (Şekil 10.16).

Hemoliz: Eritrositlerin hücre zarının parçalanması sonucu hemoglobin molekülünün açığa çıkması.

Şekil 10.16

Komplement fikzasyon testinin mekanizması



CF testinde incelenen serumun sulandırılmaları yapılarak titresi de saptanabilir. CF testi güvenilirliği yüksek bir test olmakla birlikte, kullanılan antijen, komplement ve amboseptörün sürekli titre edilme gerekliliği, taze kobay serumu kullanma zorunluluğu gibi nedenlerle genellikle araştırma ve referans laboratuvarlarında kullanılmaktadır.

Üçüncül Bağlanma Testleri

Üçüncül bağlanma testleri birincil ve ikincil bağlanma testlerinden farklı olarak test sonuçlarının canlı ortamlarda (deney hayvanı, hücre kültürü, embriyolu yumurta) ölçüldüğü testlerdir. Bazı mikroorganizmalar veya antijenik moleküller çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptirler. Bu biyolojik aktivitelere örnek olarak; hayvanlarda hastalık veya ölüme neden olmak, bazı bakterilerin toksin sentezlemesi, bazı virusların çekirdekli hücreleri lize etmesi verilebilir. Mikroorganizmalar veya antijenik moleküller spesifik antikorları ile bir araya getirilirse bu biyolojik aktivitelerini kaybederler. Diğer bir ifade ile spesifik antikorlar tarafından bu biyolojik aktiviteler nötralize edilir. Ancak canlı ortamlarda uygulanan bu testlerin değişken faktörleri oldukça fazla olduğundan ve dış koşullardan fazla etkilendiğinden elde edilen sonuçların standardize edilmesi büyük önem taşır. Bu nedenle üçüncül bağlanma testlerinde sonuçlar; test edilen grubun %50'sini infekte eden (ID50) doz veya test edilen grubun %50'sini öldüren (LD50) doz vb. olarak ifade edilir. Üçüncül bağlanma testleri temel olarak iki farklı şekilde uygulanır;

Nötralizasyon Testleri: Nötralizasyon testlerinin temeli antijenlerin biyolojik aktivitelerinin spesifik antikorlar tarafından nötralize edilmesine dayanır. Test iki aşamada uygulanır. İlk aşamada bilinen antijen ile şüpheli serum **in vitro** koşullarda bir araya getirilerek inkübe edilir. İkinci aşama **in vivo** koşullarda gerçekleşir. Bu amaçla ilk aşamada reaksiyona giren karışım deney hayvanı, embriyolu yumurta, hücre kültürü gibi canlı bir ortama verilir ve inkübe edilir. Sonuçta canlı ortamlarda bir değişiklik gözlenmemesi şüpheli serumda antikor bulunduğunu ortaya koyar. Ancak şüpheli serumda antikor yoksa antijen antikor ile reaksiyona girmeyeceği için nötralize olmaz ve sonuçta deney hayvanlarında hastalık veya ölüm, embriyolu yumurta ve hücre kültürlerinde de antijene özgü değişiklikler gözlenir. Nötralizasyon testleri ile bilinmeyen bir virusun identifikasyonu yapılır veya şüpheli serumda antikor varlığı ya da titresi saptanır. **Spesifitesi** ve **sensitivitesi** yüksek testler olmakla birlikte donanımlı ve gelişmiş laboratuarlarda uygulanabilirler.

Koruma (Proteksiyon) Testleri: Koruma testleri nötralizasyon testleri ile aynı temele dayanır ancak tamamen canlı ortamda uygulanması yönü ile farklılık taşır. Koruma testlerinde deney hayvanlarına önce koruma özelliği saptanacak olan spesifik antiserum farklı dilasyonlarda verilir. Ardından hayvanlar standart dozda bilinen **patojenik mikroorganizma** veya toksin ile **eprüve edilir**. Gözlem altında tutulan hayvanlarda ölüm veya hastalık oluşup oluşmadığı incelenir. Şüpheli serumdaki antikor varlığı ve düzeyine bağlı olarak deneme gruplarında yer alan hayvanlarda ölüm/hastalık gibi değişiklikler gözlenir. Koruma testlerinde kullanılan deney hayvanlarında infeksiyonlara duyarlılık, antiserum emilimi gibi çeşitli faktörler bireysel değişkenlik gösterebilir. Bu durum testlerin duyarlılığını olumsuz etkileyen faktörlerdir. Bu olumsuzlukları gidermek için lisanslı deney hayvanları ünitelerinden mümkün olduğunca çok sayıda hayvan temin edilmesi ve testlerde kullanılacak mikroorganizma veya toksinlerin eprüve edilen dozlarının iyi standardize edilmesi gereklidir

in vitro: Laboratuvar ortamı veya yapay olarak oluşturulan ortam.

in vivo: Deney hayvanı, hücre kültürü veya embriyolu yumurta gibi canlı ortam.

Spesifite: Bir serolojik testin gerçek negatif sonuçları verme yeteneğinin ölçüsü.

Sensitivite: Bir serolojik testin gerçek pozitif sonuçları verme yeteneğinin ölçüsü.

Patojenik mikroorganizma: Hastalık yapma yeteneği olan mikroorganizma.

Eprüve etmek: Bir deneme grubuna standardize edilmiş dozda bilinen patojenik mikroorganizma veya toksin verilmesi.

Antijen-antikor reaksiyonları soyut kavramları içermektedir. Ayrıca serolojik testlerin öğrenilmesinde uygulamanın büyük önemi vardır. Bu nedenle konuların anlaşılır olmasında farklı ve çeşitli görsel unsurların mutlaka kullanılması gereklidir. Farklı kaynaklardan (kitap, internet vb.) resim, video görüntüleri ile konuların pekiştirilmesi yararlı olacaktır.



DİKKAT

Serolojik reaksiyonları şekiller eşliğinde genel olarak tekrar gözden geçirmek için <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/ab-ag-rx.htm> sayfasını inceleyebilirsiniz.



İNTERNET

Özet



Antijen-antikor reaksiyonlarının temel mekanizmasını tanımlamak.

Antijenik moleküller canlı vücuduna girdiğinde kendilerine karşı spesifik antikor oluşumuna neden olurlar. Antijen ve spesifik antikor molekülleri canlı vucudunda (in vivo) veya uygun koşullardaki laboratuvar ortamında (in vitro) bir araya gelerek çeşitli yöntemlerle saptanabilen reaksiyonlar oluştururlar. Antijen antikor reaksiyonları lattice (örgü) kuramı ile açıklanmaktadır. Bu kurama göre; bivalan yapıya sahip bir antikor molekülü iki antijenik moleküle bağlanarak bir reaksiyon oluşturur. Ortamda birden fazla sayıda antijen ve antikor molekülü olduğunda moleküller arasında iki aşamalı olarak meydana gelen spesifik birleşme sonucu çözünmeyen bir immun kompleks yapı oluşur.



Tanı amaçlı kullanılan serolojik testleri ilişkilendirerek karşılaştırmak.

Antijen-antikor reaksiyonları temel alınarak geliştirilen serolojik testler, antijen-antikor reaksiyonlarının iki aşamalı olmasına paralel olarak iki farklı temele dayanmaktadır. Birincil bağlanma testleri olarak tanımlanan grup antijen-antikor reaksiyonunun birinci aşamasını ortaya koyan testleri kapsar. Bu aşamada antijen ve antikor molekülleri uygun reseptörleri ile bağlanmış ve henüz gözle görülebilir kümelenme ve çökme oluşmamıştır. Bu nedenle bu gruptaki testlerin sonuçlarının görülebilir şekilde dönüştürülmesi için özel işaretleme teknikleri ile hazırlanmış konjugatların kullanılması ve reaksiyonların özel cihazlarla okunması gereklidir. Bu testlerin spesifikite ve sensitiviteyi yüksek olduğu için güvenilir testlerdir. ELISA, immunofluoresan tekniği, radyoimmunoassay bu testlere örnek olarak verilebilir. İkincil bağlanma testleri ise antijen-antikor reaksiyonlarının ikinci aşamasını saptayan testleri içerir. Bu aşamada spesifik antijen ve antikor molekülleri bir araya gelerek örgü tarzında kümelenir ve oluşan immun kompleksler çöker. Bu aşama gözle görülebilir özelliindedir. Bu nedenle sonuçların değerlendirilmesi için konjugat ve özel cihazların kullanımına gereksinim göstermezler. Tanı laboratuvarlarında kolaylıkla uygulanabilen bu testlere örnek olarak aglutinasyon ve

presipitasyon testleri verilebilir. Bu iki gruptan ayrı olarak, üçüncül bağlanma testleri olarak tanımlanan grupta ise nötralizasyon ve koruma testleri yer alır. Bu testlerde antijen- antikor reaksiyonlarının sonucu deney hayvanı, embriyolu yumurta, hücre kültürü gibi canlı ortamlarda izlenir. Doğal koşullardaki sonucu yansıtan testler olmakla birlikte kullanılan canlı materyaldeki bireysel farklılıklara dayalı dezavantajlara da sahiptir.



Serolojik testlerin uygulama alanlarını ayırt etmek.

Serolojik testler en basit ifade ile antijen veya antikor saptanması amacı ile uygulanmaktadır. Diğer bir ifade ile serolojik testlerde şüpheli materyalde antijen veya antikor aranır. Bilindiği gibi antikor en fazla kan serumunda bulunur ve bu nedenle antikor aranması için şüpheli materyal olarak kan serumu kullanılır. Antijen aranmasına yönelik serolojik testlerde ise kan, vücut sıvıları, hücre kültürü sıvıları vb. şüpheli materyal kullanılır. Bazı durumlarda besiyerinde üretilmiş bakterilerin veya hücre kültürlerinde üretilmiş virusların identifikasyonu amacı ile de antijen arama dayalı serolojik testler kullanılmaktadır. Serolojik testler ile antijen ve antikor titreleri de saptanır. Özellikle yenidoğanların maternal bağışıklığını, aşılama öncesi ve sonrası koruyucu bağışıklığı, hastalıklar sonucu oluşan spesifik antikor yanıtını saptamak için serum antikor titrelerinin saptanması gereklidir.

Kendimizi Sınayalım

1. Antijen-antikor reaksiyonlarının iki aşamalı olduğu dikkate alındığında aşağıdakilerden hangisi birincil bağlanma aşamasının özelliklerinden biri **değildir**?
 - a. Hızlı oluşması
 - b. Geriye dönüşebilir olması
 - c. Çıplak gözle görülebilmesi
 - d. Isıya bağımlı olmaması
 - e. Antijen ve antikor molekülünün uygun reseptörlerle birbirine bağlanması
2. Aşağıdakilerden hangisi ikincil bağlanma testlerinden biridir?
 - a. ELISA
 - b. Komplement fikzasyon
 - c. Radyoimmunoassay
 - d. İmmunofluoresan
 - e. İmmunperoksidaz
3. İmmunofluoresan teknikleri ile ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi **yanlıştır**?
 - a. Birincil bağlanma testidir.
 - b. Konjugat fluoresan boyalarla işaretlenir.
 - c. Sonuçlar fluoresan mikroskop altında incelenir.
 - d. İn vivo uygulanır.
 - e. Antijen veya antikor saptanır.
4. Presipitasyon testi ile ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi **yanlıştır**?
 - a. Eriyebilir antijen ile spesifik antikorun reaksiyonudur.
 - b. Sıvı veya yarı katı ortamlarda uygulanır.
 - c. Sonuçların gözlenmesi için özel alet ve ekipman gereklidir.
 - d. Serum veya antijenin titresi saptanabilir.
 - e. Antijen-antikor kompleksine presipitat adı verilir.
5. Aglutinasyon ile presipitasyon testleri arasındaki temel fark aşağıdakilerden hangisidir?
 - a. Reaksiyona katılan antijenin yapısı
 - b. Reaksiyona katılan antikorun yapısı
 - c. Uygulama amaçları
 - d. Konjugat kullanımı
 - e. Uygulama ortamları
6. Aşağıdaki testlerden hangisinde eritrosit hücreleri indikatör olarak kullanılır?
 - a. Yavaş tüp aglutinasyon
 - b. Direkt immunofluoresan
 - c. Radial immunodiffuzyon
 - d. ELISA
 - e. Hemaglutinasyon-inhibisyon
7. Üçüncül bağlanma testlerini diğerlerinden ayıran temel özellik aşağıdakilerden hangisidir?
 - a. Uygulama amacı
 - b. Uygulama ortamı
 - c. İnkubasyon süresi
 - d. İnkubasyon ısısı
 - e. İncelenen şüpheli materyal türü
8. Aşağıdakilerden hangisi komplement fikzasyon testine katılan reagentlerden biri **değildir**?
 - a. Amboseptör
 - b. Antijen
 - c. Antikor
 - d. Kobay serumu
 - e. Konjugat
9. Radyoimmunoassay tekniklerinin rutin tanı laboratuvarlarında uygulanan testlerden biri olmamasının sebebi aşağıdakilerden hangisidir?
 - a. İnkubasyon süresinin uzun olması
 - b. Canlı materyal kullanımı gerektirmesi
 - c. Radyoaktivite riski olması
 - d. Yeterli duyarlılıkta olmaması
 - e. Standardizasyonunun zor olması
10. Viral hemaglutinasyon ile ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi **yanlıştır**?
 - a. Eritrosit kullanılır.
 - b. Kolay uygulanır.
 - c. Serolojik bir testtir.
 - d. Antijenin titresi saptanır.
 - e. Lamda, tüpte veya mikropleytlerde uygulanır.

Kendimizi Sınavalım Yanıt Anahtarı

1. c Yanıtınız yanlış ise “Serolojik reaksiyonların iki basamağı” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
2. b Yanıtınız yanlış ise “İkincil bağlanma testleri” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
3. d Yanıtınız yanlış ise “İmmunofluoresan teknikleri” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
4. c Yanıtınız yanlış ise “Presipitasyon” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
5. a Yanıtınız yanlış ise “İkincil bağlanma testleri” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
6. e Yanıtınız yanlış ise “Viral hemaglutinasyon ve inhibisyonu” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
7. b Yanıtınız yanlış ise “Üçüncül bağlanma testleri” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
8. e Yanıtınız yanlış ise “Komplement fizyasyon” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
9. c Yanıtınız yanlış ise “Radyoimmunoassay” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
- 10.c Yanıtınız yanlış ise “Viral hemaglutinasyon ve inhibisyonu” konusunu tekrar gözden geçiriniz.

Sıra Sizde Yanıt Anahtarı

Sıra Sizde 1

Tabii ki burada bildirilen ELISA teknikleri dışında başka teknikler de bulunmaktadır. Örneğin, yarışmacı (kompetitif) ELISA tekniği hem antijen hem de antikor aranması amacı ile farklı olarak uygulanabilen bir tekniktir. Bu teknikte bilinen antijen ile kaplı test ortamına antijene spesifik bilinen antikorlar ile şüpheli serum birlikte eklenir ve böylece antijene bağlanmak üzere antikorlar arasında bir yarışma ortamı oluşturulur. Bunun dışında da farklı ELISA teknikleri bulunmaktadır. Laboratuvarlarda amaca uygun seçilen ELISA teknikleri ile hastalık tanıları yapılır.

Sıra Sizde 2

Enzim İmmunoassay olarak bilinen ve enzim ile işaretleme esasına dayanan başka birincil bağlanma testleri bulunmaktadır. Bunlar arasında immunoperoksidaz (IP) ve immunoblot teknikleri yer almaktadır. IP tekniği özellikle dokulardaki antijen varlığını işaretli antikorlar aracılığı ile ortaya koyan immunohistokimyasal tekniklerdir. İmmunoblot teknikleri içinde en bilineni Western blotting yöntemidir. Bu yöntem özellikle bir karışım içinde yer alan protein yapılı antijenleri veya bu antijenlere spesifik antikorları ayırt etmek amacı ile kullanılır. Son yıllarda özellikle kliniklerde geniş kullanım alanı bulan “strip testler” de enzim işaretli testlerdendir ve kolay uygulanabilir olması, kısa sürede yanıt vermesi nedeni ile oldukça pratik testlerdir.

Sıra Sizde 3

Serolojik testlerde özellikle ELISA, IF gibi primer bağlanma testlerinde kullanılan reagentler araştırma laboratuvarlarında araştırmacılar tarafından bizzat hazırlanır. Örneğin; ELISA’da ilk basamakta kullanılan antijen veya antikor kaplı polisteren yüzeyler (pleyt vb.) ya da IFA’da kullanılan üzerine antijen fikze edilmiş lamalar testleri uygulayanlar tarafından uygun yöntemlerle hazırlanır. Rutin tanı laboratuvarlarında ise genellikle hazır kitler kullanılmakta ve bu kitler içinde testlerde kullanılan tüm reagentler kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

Sıra Sizde 4

Serolojik testlerde antijen veya antikor varlığının ortaya konulması önemli olmakla birlikte, bazı durumlarda bu yeterli olmayıp amaca göre antijen veya antikorun düzeyinin diğer bir ifade ile titresinin belirlenmesi de gerekir. Örneğin serum titresinin belirlenmesi için; bir seri serum sulandırması yapılarak her bir sulandırma üzerine eşit miktarda bilinen antijen eklenir. Pozitif reaksiyonun görüldüğü en yüksek serum sulandırmasının karşılığı serum titresi olarak ifade edilir. Eğer antijen sulandırması yapılmış ise; bu kez spesifik antikor ile reaksiyon veren en yüksek antijen sulandırması antijen titresi olarak ifade edilir.

Yararlanılan Kaynaklar

- Crowther, J.R. (2009). **Methods in Molecular Biology 516, The ELISA Guidebook**, NY, Humana.
- Diker, K.S. (2005). **İmmunoloji**, Ankara: Medisan Yayınevi.
- Hudson, L., Hay, F.C. (1991). **Practical Immunology**, Oxford: Blackwell.
- Özbal, Y. (1994). **Temel İmmunoloji**, İstanbul, Nobel Yayınevi.
- Tizard, I.R. (2000). **Veterinary Immunology An Introduction**, USA: W.B. Saunders Company.
- Todd, I., Spickett, G. (2005). **Immunology Lecture Notes**, USA, Blackwell.
- Anonim. <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/ab-ag-rx.htm>
- Anonim: <http://sumanasinc.com/webcontent/animation/content/ELISA.htm>