

**T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ  
KESİN RAPORU**

**FARELERDE PÜRİFİYE SPESİFİK PROTEİN İMMÜNİZASYONUNUN SEKONDER  
KİST HİDATİK OLUŞUMUNA ETKİSİ**

**EFFECT OF IMMUNIZATION WITH PURIFIED SPECIFIC PROTEIN ON THE  
FORMATION OF SECONDER CYST HIDATID IN MICE**

**Proje Yürütücüsü: Prof.Dr.Ayşe BURGU**

**Proje No: 2003-0810055**

**Proje Başlama Tarihi: 23.06.2003**

**Proje Bitiş Tarihi: 23.01.2005**

**Rapor Tarihi: 23.06.2005**

**Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Ankara - " 2005 "**

## **I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri**

### **Farelerde Pürifiye Spesifik Protein İmmünizasyonunun Sekonder Kist Hidatik Oluşumuna Etkisi**

Kist hidatik için spesifik olduğu belirlenmiş proteinlerden 116, 68 ve 8 kDa'luk proteinlerin parsiyel pürifikasyonları yapılmıştır. Pürifiye proteinler, gruplara ayrılmış farelere ayrı ayrı verilerek immunizasyonları yapılmıştır. Farelerin immunize olup olmadıklarının kontrolü Western blot çalışılarak yapılmıştır. Farelerin immunize oldukları belirlendikten sonra, kontrol grubu olarak ayrılan farelerle paralel olarak bu farelere de protoskoleks verilerek enfekte edilmişlerdir. Enfeksiyondan sonraki 2., 5., 8. ve 10. aylarda otopsi yapılan immunize ve kontrol grubu farelerdeki kist gelişim durumları takip edilmiştir. Çalışma sonucunda her üç proteinin de kist gelişimine etkisinin olduğu belirlenmiştir ( $p<0.001$ ).

### **Effect of Immunization with Purified Specific Protein on the Formation of Seconder Cyst Hidatid in Mice**

In this study, cyst hydatid specific proteins at the size of 116, 68 and 8 kDa were partially purified using Rotofor cell. The purification of these protein molecules was achieved by isoelectric focusing in the Rotofor cell. Sixty Swiss albino mice divided into three experimental and three control groups (N=10). Three mice from the experimental groups were immunized with 8, 68 and 116 kDa purified proteins respectively. After immunization, sera samples of mice from each experimental group were examined to check immunization by Western blotting. After the determination of mice immunization, protoscolices were given to control and immunized groups of mice by intraperitoneal injection. After infection, formation of the cyst hydatid were followed in control and immunized groups by autopsy at the months of 2nd, 5th, 8th and 10th. According to results, three protein molecules were found to be effective on seconder hydatid cyst development in mice ( $p<0.001$ ).

## **II. Amaç ve Kapsam**

Daha önce Anabilim Dalı'mızda tamamlanmış olan VHAG-1343 nolu "Koyun Kökenli Kist Hidatik Sıvılarının SDS-PAGE Metoduyla Analizi ve Western Blot Metoduyla Protein Yapısındaki Spesifik Antijenlerin Saptanması" başlıklı TÜBİTAK projesinde spesifik protein bantlarının koyunlar için 116 kDa, insanlar için ise 68 ve 8 kDa'luk bantlar olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmanın devamı ve pratiğe aktarılacak kısmı olarak düşünölen bu 2. aşama çalışma ile, koyun karaciğer kist hidatik sıvısı antijeninde spesifik olduğu belirlenen proteinler Rotofor cell cihazı ile diğerlerinden ayrıştırılmıştır. Pürifikasyonları yapılan proteinler adjuvant ile beraber 10'arlı 3 deney grubu fareye belirli aralıklarla verilmiştir. Üç farklı spesifik protein verilen deney ve 3 ayrı kontrol grubu (10'ar fare) farelere daha sonra kist hidatik protoskoleksleri verilerek farelerde kist hidatik'in gelişimine pürifiye spesifik proteinlerin engelleme etkisi araştırılmıştır.

### **III. Materyal ve Yöntem**

Farelerin deneysel enfeksiyonu: Deney hayvanı olarak yaklaşık 1 aylık beyaz fareler (*Mus domesticus domesticus*) kullanılmıştır. Denemeler için gerekli *Echinococcus g.granulosus* protoskoleksleri Ankara civarında bulunan mezbahalarda kesilen koyunların karaciğerlerindeki fertil ekinokok kistlerinden elde edilmiştir.

Kistli karaciğerler en kısa sürede laboratuara getirilip, mümkün olduğu kadar steril koşullarda kist sıvıları çekilip protoskoleksler çöktürölerek toplanmıştır. Protoskolekslerin canlılığı morfoloji, hareketlilik, alev hücrelerinin aktiviteleri yanında eozin ile boyanıp boyanmamalarına göre kontrol edilmiştir. Fizyolojik su ile 0.5 cc'de ortalama canlı 3000 protoskoleks olacak şekilde protoskoleks süspansiyonu ayarlandıktan sonra üzerine 1 cc'de 1000 ünite penicilin, 0.001 gr streptomisin bulunacak şekilde antibiyotik eklenmiştir.

Toplam 60 fareden 10'ar farelik 3 enfeksiyon ve 3 kontrol grubu oluşturulmuştur.

Antijen hazırlanması: Koyun karaciğer kist hidatik sıvısı 10000xg de 30 dk. santrifüj edilerek protoskoleksler çöktürölmüş ve elde edilen süpernatant 0.45 µm'lik membran filtreden geçirilmiştir. Filtreden geçirilen solüsyon diyaliz torbasına konularak distile suya karşı +4 °C'de diyaliz edilip total antijen hazır hale getirilmiştir. Pürifiye antijenin hazırlanması için ise aşağıdaki işlemler yapılmıştır.

İmmunreaktif proteinlerin pürifikasyonu: Koyun karaciğer kist sıvısından hazırlanan total antijen ampholyte ile Rotofor cell cihazına yüklenmiştir. Rotofor işlemi sonunda proteinlerin pH derecelerine göre ayrı ayrı tüplere toplanması sağlanmıştır. Pürifikasyonu istenilen 8, 68 ve 116 kDa'luk proteinlerin ürün tüplerden hangisinde olduğunu belirlemek için bu tüplerdeki ürünlerin elektroforezleri yapılarak hedef proteinlerin bulunduğu tüpler belirlenmiştir. Bu tüplerde proteinlerle birlikte bulunan ve daha sonra uygulanacak immunizasyon denemelerinde sonucu etkilememesi için Rotofor cell işlemi öncesinde total antijene ilave edilen ampholyte diyalizle uzaklaştırılmıştır. Tüplere toplanan proteinlerden hangilerinin hedef proteinler (116, 68 ve 8

kDa'luk) olduğunun belirlenmesi için tüplerdeki ürünlerden bir miktar alınarak protein standardı ile birlikte yeniden elektroforezleri yapılmış ve jel boyanarak pürifikasyonu hedeflenen proteinlerin hangi tüp/tüplerde olduğu belirlenmiştir. Yeterli miktarda pürifiye immunreaktif proteinlerin toplanabilmesi için bu işlemler birkaç kez tekrarlanmıştır.

Çalışmada kullanılan solüsyonların hazırlanması ile elektroforez prosedürleri Sambrook ve ark.'a (28) göre yapılmıştır.

Farelerin immunizasyonu: Üç ayrı pürifiye antijen (116, 68 ve 8 kDa) 3 ayrı deney grubu (10'ar fare) olarak oluşturulan farelere 100 µl (0.3 mg/ml) eşit miktarda adjuvant ile karıştırılarak 2 hafta aralıkla 2 kez i.p. olarak verilmiştir. Farelerin immunizasyonunda, ilk i.p. enjeksiyon belirlenen miktarda proteinin olduğu antijene eşit miktarda Freud's complete adjuvantı konularak yapılmıştır. Daha sonra yine eşit miktarda Freud's incomplete adjuvantı ile 2 hafta aralıklarla iki kez i.p. enjeksiyon yapılmıştır. Bu işlemden 2 hafta sonra yapılan son enjeksiyonda ise sadece 20µg pürifiye protein intravenöz olarak verilmiştir (16). Daha sonra 3 ayrı deney grubu ve kontrol grubu olarak oluşturulan fareler 3000 canlı protoskoleks verilerek enfekte edilmiştir. Deney ve kontrol grubu farelerin 2., 5., 8. ve 10. aylarda otopsileri yapılarak enfeksiyonun oluşup oluşmadığı ve enfeksiyon oluşumuna bir çeşit aşı denemesinin etkileri gözlemlenmiştir.

#### **IV. Analiz ve Bulgular**

Koyun karaciğer kist hidatik sıvısından hazırlanan antijenlerin SDS-PAGE ile analizleri sonucunda, çalışmada pürifikasyonu hedeflenen 3 spesifik proteinin (8, 68 ve 116 kDa ) total antijen içinde varlığı tespit edilmiştir. Total antijen içinde farklı molekül büyüklüğünde 23 protein bandı sayılmıştır. Pürifikasyonu hedeflenen protein bantları incelenerek, kist sıvısı antijeni içindeki yoğunluklarının pürifikasyon yapılabilecek yoğunlukta olduğu belirlenmiş ve bu proteinlerin saflaştırılması işlemine geçilmiştir (SDS-PAGE ; % 15'lik separating + % 5 'lik stacking jel 2 mm kalınlığında 20x20 cm cam kullanılarak yapılmıştır).

Rotofor cell cihazında 50 ml antijen kapasiteli ve içinde proteinlerin bölmelerde izoelektrik noktalarına (pI) göre çökmesini sağlayan membran bulduran hazne kullanılmıştır. 50 ml total antijene pH aralığı 3-10 olan ampholyte (Bio-rad cat no: 163-1112) %2 oranında ilave edilerek rotofor çalıştırılmıştır. Rotofor cell cihazının çalıştırılmasında başlangıçta 15 W akım verilmiş, başlangıç Volt ve mA değerleri kaydedilmiştir. Volt'un sabitlendiği noktada da rotofor işlemine son verilmiştir. Genelde rotofor işlemi yaklaşık 5-6 saat sürmüştür. Daha sonra 20 bölmede toplanan proteinler vakum pompası yardımı ile 20 ayrı tüpe toplanmıştır. Rotofor ürünü 20 ayrı

tüpten alınan 40 µl miktarlarındaki örneklerle SDS-PAGE yapılmış ve hangi tüplerde hangi molekül ağırlığında proteinlerin olduğu belirlenmiştir.

Farelerin immunizasyonu için gerekli miktarda protein toplanması amacıyla çalışma süresince 7 kez Rotofor cell cihazına total antijen yüklenerek her tüpün ayrı ayrı elektroforezleri yapılmıştır. Bu işlem sonucunda 8, 68 ve 116 kDa'luk hedef 3 proteinin başka bir proteinle birlikte olmaksızın ayrı ayrı tüplere toplandığı belirlenmiş ve 2. aşama pürifikasyon işlemi olan Gel eluter ile yapılacak uygulamalara gerek duyulmamıştır. Elde edilen proteinlerin ml'deki yoğunlukları ölçülerek 0.3 mg/ml pürifiye protein olacak şekilde "materyal ve yöntem" bölümünde bahsedildiği gibi verilerek farelerin immunizasyonları yapılmıştır. İmmunizasyondan 20-25 gün sonra kalpten alınan 0.5 ml kanlardan serum çıkartılarak Western blot yapılmış ve tüm farelerin verilen proteinlere karşı immunize olduğu belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra da immunize ve kontrol grubu farelere intra peritoneal yoldan 3000'er protoskoleks verilerek enfeksiyonları yapılmıştır.

Farelerin otopsilerine 2. aydan itibaren başlanmıştır. 5. 8. ve 10. aylarda immunize ve kontrol grubu 10'ar farenin otopsileri tamamlanmıştır. Otopsi sonucunda değişik çapta, bazen tek bazen küme halinde kistler gözlenmiştir. Farelerden çıkarılan sekonder kistlerden örnekleme yöntemi ile kist sıvısı alınarak protoskoleks yönünden incelenmiş ve bakısı yapılan hiçbir kiste protoskolekse rastlanmamıştır. İmmunize ve kontrol grubu farelerdeki çıkarılan kist sayısı ve kist büyüklükleri karşılaştırılmıştır. İmmunize edilenlerle, kontrol grubu olarak ayrılan (immunize edilmeden enfekte edilen) farelerdeki kistlerin sayısı ve büyüklükleri arasında farklılık olduğu gözlemlenmiştir.

İstatistik analiz: Ki-kare (Chi-square) analizi ile yapılan karşılaştırmalarda:

I ). İmmunizasyon ve kontrol gruplarında kist gelişen fare sayıları bakımından; 116 kDa immunizasyon ve kontrol grubu arasındaki farklılık önemli bulunmuş ( $p < 0.05$ ) ve kontrol grubundaki farelerde kist gelişiminin immunizasyon grubuna göre 9.3 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. 68 kDa ve 8 kDa'luk gruplarda ise immunizasyon ve kontrol grupları arasında önemli bir farklılığın olmadığı ( $p > 0.05$ ), ancak kontrol gruplarındaki farelerde kist gelişimlerinin immunizasyon gruplarına oranla sırasıyla 2.3 ve 1.4 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

II ). 116, 68 ve 8 kDa'luk immunizasyon grupları arasında gelişen kistlerin sayıları bakımından karşılaştırma yapıldığında; gruplar arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). 8 kDa'luk

immunizasyon grubunda kist sayısının diğer gruplardan yüksek olduğu, 116 kDa ve 68 kDa immunizasyon gruplarında ise kist sayıları bakımından benzerlik bulunduğu belirlenmiştir.

III ). Farelerdeki kistlerin sayıları bakımından; İmmunizasyon gruplarının (116 kDa, 68 kDa, 8 kDa) kontrol grupları ile yapılan karşılaştırmalarında; farklılığın hepsinde önemli olduğu ( $p<0.001$ ) belirlenmiştir. 116, 68 ve 8 kDa'luk immunizasyon grubu farelere göre kontrol gruplarında sırasıyla %10.61, %4.36 ve %9.8 kat daha fazla kist bulunmuştur.

IV ). Gruplar arası fark (Bağımlı gruplarda Ki-kare) önemli bulunmuştur ( $p<0.001$ ). İmmunize grupların kist sayılarındaki azalma oranları 116 kDa ile 8 kDa arası önemli bulunmaz iken (sırasıyla %10.61 ve %9.8), 68 kDa diğer gruplara göre daha düşük bulunmuştur (%4.36).

Tablo1A. 8 kDa ile immunize farelerde enfeksiyon sonrası kist gelişim durumu.

Fare no	İmmunizasyon sonrası protoskoleks verilmiş tarihi	Otopsi tarihi	Enfeksiyon-otopsi arası (~)	Kist sayısı	Kist çapları (mm)
1	24.05.2004	26.07.2004	2 ay	-	-
2	24.05.2004	26.07.2004	2 ay	12	0.2 -1
3	24.05.2004	25.10.2004	5 ay	32	1-2
4	24.05.2004	25.10.2004	5 ay	42	0.3 - 6
5	24.05.2004	24.01.2005	8 ay	-	-
6	24.05.2004	24.01.2005	8 ay	12	1.5 -10
7	24.05.2004	24.01.2005	8 ay	9	1 -7
8	24.05.2004	28.03.2005	10 ay	5	1.2 -6
9	24.05.2004	28.03.2005	10 ay	-	-
10	24.05.2004	28.03.2005	10 ay	7	1-3

Tablo 1B. 8 kDa ile immunize farelerle aynı gün enfekte edilen kontrol grubu farelerde kist gelişim durumu.

Fare no	Protoskoleks verilmiş tarihi	Otopsi tarihi	Enfeksiyon-otopsi arası (~)	Kist sayısı	Kist çapları (mm)
1	24.05.2004	26.07.2004	2 ay	182	1-2
2	24.05.2004	26.07.2004	2 ay	133	1-2
3	24.05.2004	25.10.2004	5 ay	127	1- 8
4	24.05.2004	25.10.2004	5 ay	53	2 - 21
5	24.05.2004	24.01.2005	8 ay	201	0.5- 16
6	24.05.2004	24.01.2005	8 ay	191	0.3- 14
7	24.05.2004	24.01.2005	8 ay	114	0.5 -10
8	24.05.2004	28.03.2005	10 ay	43	0.7 -19
9	24.05.2004	28.03.2005	10 ay	51	3-24
10	24.05.2004	28.03.2005	10 ay	77	0.3-18

Tablo2A. 68 kDa ile immunize farelerde enfeksiyon sonrası kist gelişim durumu.

Fare no	İmmünizasyon sonrası protoskoleks verilmiş tarihi	Otopsi Tarihi	Enfeksiyon-otopsi arası (~)	Kist sayısı	Kist çapları (mm)
1	03.08.2004	05.10.2004	2 ay	-	-
2	03.08.2004	05.10.2004	2 ay	13	0.5 –0.7
3	03.08.2004	10.01.2005	5 ay	-	-
4	03.08.2004	10.01.2005	5 ay	-	-
5	03.08.2004	08.04.2005	8 ay	3	2 -6
6	03.08.2004	08.04.2005	8 ay	6	1- 4
7	03.08.2004	08.04.2005	8 ay	-	-
8	03.08.2004	28.05.2005	10 ay	-	-
9	03.08.2004	28.05.2005	10 ay	7	0.5 –10
10	03.08.2004	28.05.2005	10 ay	9	0.5 –1

Tablo 2B. 68 kDa ile immunize farelerle aynı gün enfekte edilen kontrol grubu farelerde kist gelişim durumu.

Fare no	Protoskoleks verilmiş tarihi	Otopsi tarihi	Enfeksiy.-otopsi arası (~)	Kist sayısı	Kist çapları (mm)
1	03.08.2004	05.10.2004	2 ay	-	-
2	03.08.2004	05.10.2004	2 ay	13	1 –15
5	03.08.2004	10.01.2005	5 ay	33	0.3 –9
6	03.08.2004	10.01.2005	5 ay	-	-
9	03.08.2004	08.04.2005	8 ay	39	0.7 –11
10	03.08.2004	08.04.2005	8 ay	-	-
13	03.08.2004	08.04.2005	8 ay	36	1 –6
14	03.08.2004	28.05.2005	10 ay	7	1 –7
17	03.08.2004	28.05.2005	10 ay	36	2 – 10
18	03.08.2004	28.05.2005	10 ay	2	5 –8

Tablo 3A. 116 kDa ile immunize farelerde enfeksiyon sonrası kist gelişim durumu.

Fare no	İmmünizasyon sonrası protoskoleks verilmiş tarihi	Otopsi tarihi	Enfeksiyon-otopsi arası (~)	Kist sayısı	Kist çapları (mm)
1	03.08.2004	05.10.2004	2 ay	-	-
2	03.08.2004	05.10.2004	2 ay	-	-
3	03.08.2004	10.01.2005	5 ay	6	0.5 –1
4	03.08.2004	10.01.2005	5 ay	13	0.8 -1.5
5	03.08.2004	08.04.2005	8 ay	-	-
6	03.08.2004	08.04.2005	8 ay	15	1 –13
7	03.08.2004	08.04.2005	8 ay	-	-
8	03.08.2004	28.05.2005	10 ay	-	-
9	03.08.2004	28.05.2005	10 ay	-	-
10	03.08.2004	28.05.2005	10 ay	-	-

Tablo 3B. 116 kDa ile immunize farelerle aynı gün enfekte edilen kontrol grubu farelerde kist gelişim durumu.

Fare no	Protoskoleks verilmiş tarihi	Otopsi tarihi	Enfeksiyon-otopsi arası (~)	Kist sayısı	Kist çapları (mm)
3	03.08.2004	05.10.2004	2 ay	60	0.5 –3
4	03.08.2004	05.10.2004	2 ay	21	2 – 5
7	03.08.2004	10.01.2005	5 ay	-	-
8	03.08.2004	10.01.2005	5 ay	-	-
11	03.08.2004	08.04.2005	8 ay	76	-
12	03.08.2004	08.04.2005	8 ay	83	0.5 –10
15	03.08.2004	08.04.2005	8 ay	46	0.5 – 10
16	03.08.2004	28.05.2005	10 ay	42	1 – 10
19	03.08.2004	28.05.2005	10 ay	25	1 – 10
20	03.08.2004	28.05.2005	10 ay	8	0.2 – 1

## V. Sonuç ve Öneriler

Çalışma sonucunda tablolardan (1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B) da görüleceği gibi, daha önceki çalışmalarımızla spesifik olduğu belirlenen ve pürifikasyonu yapılarak farelerde immunizasyon da kullanılan 116, 68 ve 8 kDa’luk proteinlerin kist sayısı ve kist büyüklüğünde mutlak etkisinin olduğu belirlenmiştir ( $p<0.001$ ). Tabloların (1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B) incelenmesinden ve yapılan istatistik analizlerden (Ki-kare) anlaşılacağı üzere, 116 kDa immunizasyon grubu ile kontrol grubu arasındaki kist gelişen fare sayıları bakımından farklılık önemli bulunmuş ( $p<0.05$ ) ve kontrol grubundaki farelerde kist gelişiminin immunizasyon grubuna göre 9.3 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. 68 kDa ve 8 kDa’luk gruplarda ise immunizasyon ve kontrol grupları arasında kist gelişen fare sayıları bakımından önemli bir farklılığın olmadığı ( $p>0.05$ ),

ancak kontrol gruplarındaki farelerde kist gelişimlerinin immunizasyon grublarına oranla sırasıyla 2.3 ve 1.4 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında farelerdeki kistlerin sayıları bakımından immunizasyon gruplarının kontrol grupları ile yapılan karşılaştırmalarında farklılığın hepsinde önemli olduğu belirlenmiştir ( $p<0.001$ ).

Çalışma süresince immünize farelerin fizik görünüşleri ve kondüsyonlarının immünize edilmeden doğrudan enfekte edilen kontrol grubu farelere göre daha kötü olduğu, özellikle 8. aydan sonraki dönemlerde ölümlerin sıklaştığı gözlenmiştir. Sanitasyona dikkat edilmesine ve en son protoskoleks verilmesi sırasında daha önce oluşabilecek muhtemel enfeksiyonların da tedavisi amacı ile antibiyotikle beraber enjeksiyon yapılmasına rağmen ölümler tamamen engellenememiştir. Bunda manipülasyon işlemlerinin etken olduğu düşünülmektedir. Çünkü, farelere immünizasyon sırasında 3, enfeksiyon sırasında 1 defa i.p., olmak üzere toplam 4 defa i.p., yine immünizasyon sırasında 1 defa da i.v. enjeksiyon yapılmıştır.

Çalışma sonuçları, elde edilen bulgular değerlendirildiğinde aşı çalışmalarına ışık tutabilecek nitelikte ve değerinde bulunmuştur. Bu çalışmanın daha ileri aşama çalışmalarda; biyokimyasal ve immunolojik bazı detayların saptanması, proteinlerin karakterizasyonlarının yapılması ve immunizasyon tekniklerinin daha ayrıntılı değerlendirilmesinin yapılması gibi çalışmanın geliştirilmesi amacına ulaşmada önemli katkı sağlayacağı kanısına varılmıştır.

## VI. Kaynaklar

1. **Altıntaş, N.** (1991). SDS-Polyacrylamide gel elektroforezi ile proteinlerin seperasyonu, T. Parazitol. Derg., 2:119-129.
2. **Ayala, A., Parrado, J., Machado, A.** (1998). Use of Rotofor preparative isoelectrofocusing cell in protein purification procedure. Appl. Biochem. Biotechnol., 69:11-16.
3. **Aykol, F.** (1986). Tabii Enfekte Koyunlarda Kist Hidatiğin Counterimmuno-elektroforesis (CIEP) ve Çift Diffüzyon Testlerle Karşılaştırmalı Teşhisi, Ankara Üniv. Sağlık Bilim. Enst., Doktora Tezi.
4. **Bono, J.L., Legendre, A.M., Scalarone, G.M.** (1995). Detection of antibodies and delayed hypersensitivity with Rotofor preparative IEF fraction of *Blastomyces dermatidis* yeast phase lysate antigen. J. Med. Vet. Mycol., 33:209-214.
5. **Burgu, A., Doğanay, A., Gönenç, B., Sarımehtemtoğlu, H.O., Kalınbacak, F.** (2000). Analysis of hydatid cysts from sheep by SDS-PAGE, and determination of spesifik antigens in protein structure by Western blotting. Türk. J. Vet. Anim. Sci., 24:493-500.

6. **Barış, İ., Şahin, A., Bilir, N., Kalyoncu, A.F., Emri, A.S., Akhan, O., Barış, B., Çopur, A.S., Selçuk, Z.T.** (1989). Hidatik Kist Hastalığı ve Türkiye'deki Konumu, Türkiye Akciğer Hastalıkları Vakfı Yayını No:1, Ankara.
7. **Chamekh, M., Facon, B., Dissous, C., Haque, A., Capron, A.,** (1990). Use of a monoclonal antibody specific for a protein epitope of *Echinococcus granulosus* antigen 5 in a competitive antibody radioimmunoassay for diagnosis of hydatid disease. J. Immunol. Methods., 134:129-137.
8. **Doğanay, A., Burgu, A., Gönenç, B., Sarımehmetoğlu, O.** (2000). Koyun kist hidatik protoskolekslerinin protein yapısının analizi ve spesifik antijenlerin saptanması. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 47:63-71.
9. **Facon, B., Chamekh, M., Dissous, C., Capron, A.** (1991). Molecular cloning of an *Echinococcus granulosus* protein expressing an immunogenic epitope of antigen 5. Mol. Biochem. Parasitol., 45:233-240.
10. **Fadwa, M.A., Knobloch, J.** (1989). Isolation and partial characterization of species-specific and cross-reaktive antigens of *Echinococcus granulosus* cyst fluid. Mol. Biochem. Parasitol., 37:101-108.
11. **Furster, C., Zhang, J., Toll, A.** (1996). Purification of a 3 beta-hydroxy-delta 5-C27-steroid dehydrogenase from pig liver microsomes active in major and alternative pathways of bile acid biosynthesis. J. Biol. Chem., 271:20903-7.
12. **Genc, S.** (1976). İnsan hidatidosisin tanısında pasif hemaglutinasyon ve Weinberg reaksiyonlarının değeri. Mikrobiyoloji Bülteni., 10:215-231.
13. **Güralp, N.** (1981). Helmintoloji. Ankara Üniv. Vet. Fak. Yayınları, 368. II. Baskı.
14. **Heath, D.D., Lawrence, S.B.** (1996). Antigenic polypeptides of *Echinococcus granulosus* oncospheres and definition of protective molecules. Parasite Immunol., 18,347-357.
15. **Hira, P.R., Hahr, G.M., Shweiki, H.M. Behbehani, K.** (1990). An enzyme-linked immunosorbent assay using an 5 antigen for the diagnosis of cystic hidatik disease. Ann. Trop. Med. Parasitol., 2:157-162.
16. **Kanwar, J.R., Kaushik, S.P., Sawhney, I.M.S., Kamboj, M.S., Mehta, S.K., Vımayak, V.K.** (1992). Specific antibodies in serum of patients with hydatidosis recognised by immunoblotting. J. Med. Microbiol., 36:46-51.
17. **Köksal, F., Serin, M.S., Kekeç, Y., Sadr, Y.E.** (1995). İnsan ve hayvan kökenli kist hidatik sıvılarının SDS-PAGE metoduyla analizi ve Western blot metodunun klinik önemi, T. Parazitol. Derg., 19:221-229.

18. Lee, H.J., Lee, C.S., Kim, B.S., Joo, K.H., Lee, J.S., Kim, T.S., Kim, H.R. (2002). Purification and characterization of a 7 kDa protein from *Clonorchis sinensis* adult worms. *J. Parasitol.*, 88:499-504.
19. Leggatt, G.R., McManus, D.P. (1994). Identification and diagnostic value of a major antibody epitope on the 12 kDa antigen from *Echinococcus granulosus* (hydatid disease) cyst fluid. *Parasite Immunol.*, 16:87-96.
20. Maddison, S.E., Slemenda, S.B., Schantz, P.M., Fried, J.A., Wilson, M., Tsang, V. (1989). A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. *Am. J. Med. Hyg.*, 40:377-383.
21. March, F., Enrich, C., Mercader, M., Sanchez, F., Munoz, C., Coll, P., Prats, G. (1991). *Echinococcus granulosus*: Antigen characterization by chemical treatment and enzymatic deglycosylation. *Exp. Parasitol.*, 73:433-439.
22. Morris, D.L., Richards, K.S. (1992). Hydatid Disease. Butterworth-Heinemann Ltd. Linacre House, Jordan Hill, Oxford OX2 8DP.
23. Njeruh, F.M., Okela, G.B.A., Gathuma, J.M. (1989). Usefulness of indirect haemagglutination (IHA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the diagnosis of human hydatidosis. *E. Afr. Med. J.*, 66:310-314.
24. Nore, B.F., Harrison, M.A., Keen, J.N., Allen, J.F. (1994). Partial purification of a cyanobacterial membrane protein with amino terminal sequence similarity to the N-methylphenylamine pilins. *Acta Chem. Scand.*, 48:578-581.
25. Park, Y.H., Lee, S.S. (1994). Identification and characterization of capsaicin-hydrolyzing enzymes purified from rat liver microsomes. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 34:351-360.
26. Peritt, D., Flechner, I., Okunev, E., Yawai, P., Halperin, T., Treves, A.J., Barak, V. (1992). The M20 IL-1 inhibitor. I. Purification by preparative isoelectric focusing in free solution. *J. Immun. Methods.*, 155:159-165.
27. Profumo, E., Ortana, E., Rigano, R., Gioia, I., Notargiacomo, S., Ioppolo, S., Siracusano, A. (1994). Cellular and humoral responses to antigenic subunits of *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients. *Parasite Immunol.*, 16:393-398.
28. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 15 section, p. 18.47-18.76. Cold Spring Harbor, New York.
29. Sanchez, F., March, F., Mercader, M., Coll, P., Munoz, C., Prats, G. (1991). Immunochemical localization of major hydatid fluid antigens in protoscolices and cyst of *Echinococcus granulosus* from human origin. *Parasite Immunol.*, 13:583-592.

30. Sarımeahmetoğlu, H.O., Kubar, A., Tanyüksel, M., Gün, H. (1998). Koyun karaciğer kist sıvısından 8 kDa'luk antijenin pürifikasyonu. T. Parazitol. Derg., 22:137-141.
31. Sharma, S.D., Mullenax, J., Araujo, F.G. (1987). Western blott analysis of the antigens of *T.gondii* recognized by human IgM antibodies. J. Immunol., 131:977-978.
32. Su, X. and Prestwood, A.K. (1991). Dot ELISA minicry western blott test for the detection of swine trichinellosis. J. Parasitol., 77:76-82.
33. Şaşmaz, Z, E., Hashemphoor, G.R., Bahiar, İ.H., Yuluđ, N. (1995). *Echinococcus granulosus*'un karşılaştırmalı antijenik analizi. T. Parazitol. Derg., 20:83-87.
34. Şenlik, B. (1998). Bursa Yöresi Koyunlarında İndirekt Floresan Antikor (IFA) ve İndirekt Hemaglutinasyon (IHA) Testleriyle Hidatidoz'un Sero-Prevalansı Üzerine Araştırmalar. Uludađ Üniv. Sağlık Bilim. Enst., Doktora tezi.
35. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci., 76:4350.
36. Yalçıntaş, İ., Çolakođlu, S. (1973). Kist hidatik teşhisinde indirekt hemaglutinasyon testinin değeri. Çukurova Üniv. Tıp Fak. Derg., 3:152-155.
37. Yazıcıoğlu, A., Dinçer, H. (1971). Kist hidatik ve Weinberg reaksiyonu. Mikrobiyoloji Bülteni, 5:273-281.

## VII. Ekler

### a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

Proje bedeli olan 44 470 000 000 TL'lik alımların tamamı tek kalemde yapılmıştır. Bu miktardan tasarruf edilen 2 600 000 000 TL'lik paranın, gereksinim duyulan bazı sarf malzemelerinin satın alınmasında kullanılması için, gerekçeli olarak BAP'a başvurulmuştur. Başvurunun kabul edilmesinden sonra bu miktar para ile ilave fare yemi ve laboratuvarımızda tükenen diyaliz torbası satın alınmıştır.

### b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar (BAP Demirbaş numaraları dahil )

Proje ile alınan makine ve teçhizatın kullanımı şunda bölümümüzde sürdürülen ve BAP tarafından desteklenen "Hydatidosisin Serodiagnozunda Kist Sıvısı Antejenlerinin SDS-PAGE ve Western Blotting Yöntemleri ile Karşılaştırmalı Analizi" konulu projede kullanılmaktadır.

Ayrıca Anabilim Dalı'mızda gelecek dönemlerde yapılması planlanan çalışma, doktora çalışması ve projeli diğer çalışmalarda da bu cihazlardan yararlanılacaktır.

**c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)**

**d) Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar)**

Bu projenin çalışmaları ve elde edilen bulguları, İzmir'de 18-25 Eylül 2005 tarihinde yapılacak olan 14. Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde sunulmak üzere hazırlanmaktadır.

**e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler**