

KİLİS 7 ARALIK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ATTENÜE *BRUCELLA MELITENSIS* (REV-1) AŞISININ FARKLI
STABİLİZATÖRLERLE LİYOFİLİZASYONU

Yusuf AVCIOĞLU

DANIŞMAN: Prof. Dr. İsmet HASENEKOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2013

KİLİS

KABUL VE ONAY SAYFASI

Prof. Dr. İsmet HASENEKOĞLU danışmanlığında, Yusuf AVCIOĞLU tarafından hazırlanan “*Attenüe Brucella melitensis (Rev-1) Aşısının Farklı Stabilizatörlerle Liyofilizasyonu*” adlı tez çalışması 24/07/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oybirliği** ile Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmza
Başkan	: Prof. Dr. İsmet HASENEKOĞLU (Danışman)	Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	
Üye	: Prof. Dr. Nazım ŞEKEROĞLU	Kilis 7 Aralık Üniversitesi M.Y.O	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Adem İMALI	Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../201... tarih ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Tez No:

Doç. Dr. Şükrü ÇAKMAKTEPE
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ATTENÜE *BRUCELLA MELITENSIS* (REV-1) AŞISININ FARKLI STABİLİZATÖRLERLE LİYOFİLİZASYONU

Yusuf AVCIOĞLU

Kilis 7 Aralık Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsmet HASENEKOĞLU

YIL: 2013

Sayfa: 33

Bu çalışmada attenüe *Brucella melitensis* Rev-1 aşısının farklı stabilizatörler ile liyofilizasyonu ve bunun liyofilizasyon işlemine ve hızlı stabilite testi yapılarak raf ömrüne etkileri araştırılmıştır. Bu amaç ile Dollvet Veteriner Aşı İlaç Biyolojik Madde Üretim A.Ş bakteriyoloji laboratuvarında attenüe *Brucella melitensis* rev-1 aşı kültürü üretilmiştir. Üretilen kültürün birisi kontrol olmak üzere 4 farklı stabilizatör ile liyofilizasyonu yapılmıştır. Bütün gruplar için liyofilizasyon öncesi ve liyofilizasyon sonrası canlılık sayımları yapılarak aradaki kayıp oranı belirlenmiştir. Son olarak da hızlı stabilite testi yapılarak liyofilizasyondan sonra hangi stabilizatör ortamın canlılık oranını daha stabil tuttuğu belirlenmiştir. Liyofilizasyonu yapılan aşı gruplarından liyofilizasyon esnasında en yüksek korumayı % 2,5 proteose peptone , % 5 sukroz , % 0,5 gelatine ile hazırlanan aşı grubu gösterirken hızlı stabilite testinde en stabil ortam ise kontrol grubu olan % 2,5 Bacto casitone , % 5 sukroz, %1 sodium L- glutamate monohydrate ile hazırlanan aşı grubu olmuştur. % 2.5 tryptone, %0,5 sukroz, %0,1 sodyum L-glutamate içeren stabilizatör ortamı ise hem liyofilizasyon stresine karşı dayanıksızlığı hem de hızlı stabilite testinde büyük kayıp vermesi ile bu amaca uygun olmadığı anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Brucella melitensis*, Rev-1, Liyofilizasyon, Aşı, Stabilizatör

ABSTRACT

Msc. Thesis

ATTENUATED *BRUCELLA MELITENSIS* (REV-1) VACCINE IN DIFFERENT STABILIZERS LYOPHILIZATION

Kilis 7 Aralık University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. İsmet HASENEKOĞLU

Year: 2013

Page: 33

In this study, effects of lyophilizing processes with different stabilizers on viability and shelf-life of attenuated *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine were investigated by using rapid stability tests. With this purpose, attenuated *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine cultures were produced in bacteriology laboratory at Dollvet Veterinary Vaccine Production and Marketing Company. Cultures were lyophilized with 4 different stabilizers. Before and after lyophilization, counts for vitality were made for all groups and losses of vitality rates was determined. Finally fast stability tests made after the lyophilizing to determine which of the stabilizers ensure more stable environment for the rate of viability. Among lyophilized vaccine groups, the vaccine prepared with % 2,5 Proteose Peptone, % 5 Sukroz, % 0,5 Gelatin was showed maximum protection for viability during lyophilization. However fast stability tests showed that the % 2,5 Bacto Casitone, % 5 Sukroz, % 1 Sodium L-glutamate monohydrate was the most stable environment for shelf-life in vaccine preparation.

Keywords: *Brucella melitensis*, REV-1, lyophilization, vaccine, stabilizers.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının konusunun belirlenmesinde, deneysel ve teorik aşamalarında ve yazımı esnasında yardım, öneri ve desteğini gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. İsmet HASENEKOĞLU' na

Tez çalışmasında ve yüksek lisans dönemi boyunca yardımını esirgemeyen biyoloji bölümü Arş. Görevlisi Muhittin KULAK' a

Tez yazımı esnasında, İngilizce makalelerin anlaşılmasında ve tercümesinde bana yardımcı olan biyolog Mehmet ÇELİK ve biyolog İbrahim YAŞAR arkadaşlarıma

Tez çalışmamın başından sonuna kadar bana her konuda destek olan Dicle üniversitesi moleküler biyoloji doktora öğrencisi olan saygıdeğer ve kıymetli arkadaşım Süleyman ÖZAKIN'a

Tez çalışması için gerekli olan tüm laboratuvar olanaklarını sunan Dollvet Veteriner Aşı İlaç Biyolojik Madde Üretimi Sanayi ve Ticaret A.Ş yetkililerine

Deneysel uygulamalarda bana yardımcı olan Dollvet Veteriner Aşı İlaç Biyolojik Madde Üretimi Sanayi ve Ticaret A.Ş Bakteriyel aşılar laboratuvarında çalışan bütün mesai arkadaşlarıma

Tez için herkesten daha fazla sabır gösteren ve her şekilde bana destek olan AİLEM'e teşekkür ederim.

Yusuf AVCIOĞLU
Kilis, Temmuz 2013

ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
RESİMLER DİZİNİ	IX
1.GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM	12
2.1. Materyal.....	12
2.1.1. <i>Brucella Melitensis</i> Rev-1 Aşı Kültürü.....	12
2.1.2. Kullanılan kimyasal malzemeler.....	12
2.1.3. Kullanılan laboratuvar malzemeleri.....	12
2.1.4. Bioreaktör.....	13
2.1.5. Liyofilizasyon cihazı.....	13
2.1.6. Vakum Cihazı.....	13
2.1.7. Nem ölçer.....	13
2.2. YÖNTEM	14
2.2.1. <i>Brucella melitensis</i> Rev-1 üretimi.....	14
2.2.2. Farklı Stabilizatörlerin (koruyucu ortam) hazırlanması.....	15
2.2.3. Stabilizatörler ile <i>Brucella melitensis</i> Rev-1 aşı kültürünün seyreltmesi	15
2.2.4. Liyofilizasyon öncesi canlılık sayımı	15
2.2.5. Liyofilizasyon işlemi.....	16
2.2.6. Liyofilizasyon sonrası canlılık sayımı	18
2.2.7. Liyofilizasyon kayıplarını belirleme	19
2.2.8. Hızlı stabilite testi	19
3.BULGULAR VE TARTIŞMA	20
3.1. Sterilite	20
3.2. Vakum.....	20
3.3. Nem.....	20
3.4. Liyofilizasyon öncesi ve liyofilizasyon sonrası canlılık farkları	21
3.5. Hızlı stabilite testi	21
4. SONUÇ	25

5. KAYNAKLAR	27
7. ÖZGEÇMİŞ	33

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

1. Simgeler

ml	mililitre
cm	Santimetre
gr	Gram
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
g	Gram

2. Kısaltmalar

Na	Sodyum
Lyf	Liyofilizasyon
Cfu	Koloni oluşturan birim
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge1.1. <i>Brucella</i> bakteri türleri.....	3
Çizelge 3.4. Liyofilizasyon öncesi ve sonrası canlılık değerleri.....	21
Çizelge 3.5. Liyofilizasyon sonrası ile hızlı stabilite testi arasındaki canlılık farkları ...	22

RESİMLER DİZİNİ

Resim 2.2.1. <i>Brucella</i> bakterisi üretiminde kullanılan bioreaktör	14
Resim 2.2.4. Denemelerde kullanılan koloni sayacı	16
Resim 2.2.5. Denemelerde kullanılan liyofilizasyon cihazı.....	17
Resim 2.2.6. Kültürel sayım yöntemlerinden dilüsyon yöntemi.....	18

1.GİRİŞ

Ülkemizde yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda koyun ve keçilerde görülen bakteriyel kaynaklı yavru atmasının başlıca nedeni olarak *Brucella* cinsi bakterilerin neden olduğu brusellozis hastalığı tespit edilmiştir [1].

Brusellozis hastalığı evcil hayvanlarda düşüklerin yanı sıra süt veriminide azaltarak ekonomik anlamda kayıplarada neden olmaktadır [2].

Gıda tarım ve hayvancılık bakanlığının hayvanlardaki brusellozisle mücadele programına rağmen hastalık artmakta hem hayvan endüstrisini hemde insan sağlığını etkilemesiyle ülke ekonomisine ciddi zararlar vermektedir [3].

Brusellozis hastalığıyla mücadele kapsamında hayvanların aşılması çalışması son derece önemlidir [3]. Genellikle enfeksiyon hastalıkları hayvanların düzenli aşılma-sıyla kontrol altına alınabilmektedir [4].

Bu çalışmada koyun ve keçilerde brusellozis hastalığına neden olan *Brucella melitensis* bakterisine karşı laboratuvar ortamında üretilen canlı *Brucella melitensis* Rev-1 aşısının liyofilizasyonunda kullanılan farklı stabilizatörler konu olarak alınmıştır.

Liyofilizasyon işlemi esnasında meydana gelen canlılık ve aktivite kayıplarının nedeni bugüne kadar kesin olarak belirtilememiştir. Bu nedenle kayıpları azaltmaya yönelik çalışmalarda araştırmacıların kişisel görüşlerini yansıtmaktan öteye gidememektedir. Do-layısı ile canlılık ve aktivitenin korunmasında en önemli faktör olduğu pek çok araştı-rmacı tarafından bildirilen stabilizatör maddelerin liyofilizasyon esnasında liyofilizasyon stresine karşı bir koruma gösterdiği ve canlılık kayıp oranını büyük ölçüde etkilediği bildirilmektedir [5-6].

Bunun için üretimi yapılan attenüe (zayıflatılmış) *Brucella melitensis* Rev-1 aşı kültü-rünün 4 farklı koruyucu ortam ile liyofilizasyonu yapılarak hangi koruyucu ortamın liyofilizasyon stresine karşı canlı bakteriyi daha iyi koruduğu tespit edilmesi ve liyofilizasyondan sonra hızlı stabilize testi yapılarak farklı stabilizatörlerle

liyofilizasyonu yapılmış aşı gruplarının 1 yıllık raf ömründe mikroorganizmayı hangi stabilizatörle hazırlanmış aşı grubunun stabil tutacağı belirlenmeye çalışılmıştır.

Enfeksiyon hastalıkları alanında yüz yıl öncesine göre daha çok gelişmiş tanı ve tedavi imkânlarına sahip olmamıza rağmen halen salgınlar büyük insan topluluklarını etkilemektedir. Toplum kaynaklı enfeksiyonların % 60'ını zoonotik enfeksiyonlar oluşturmaktadır. Günümüzde hayvan kaynaklı hastalıklar insan sağlığına yönelik ciddi tehdit oluşturmaktadır. Özellikle Kırım Kongo Kanamalı Ateşi hastalığı, şarbon, kuduz ve brusellozis başta olmak üzere birçok zoonotik hastalık ülkemizde önemli bir halk sağlığı problemi olma eğilimini sürdürmektedir. Zoonotik hastalıklar; halk sağlığına olumsuz etkileri yanında, hayvanlardaki verim kayıpları ve ölümler dolayısıyla ekonomik kayıplara da neden olmaktadır [7].

Brusellozis, *Brucella* bakterilerince oluşturulan, primer olarak otçul hayvanlarda görülen bir hastalıktır. Hayvanlardan insanlara bulaşma, genellikle infekte hayvanın sekresyonlarının bütünlüğü bozulmuş deri ile direkt teması, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin kullanımı, infekte aerosollerin inhalasyonu ve konjunktival temas şeklinde olmaktadır. Türkiye gibi hastalığın endemik özellik taşıdığı ülkelerde bulaşma sıklıkla pastörize edilmemiş süt ürünlerinin tüketimiyle olmaktadır [8, 9-10-11].

Ancak yapılan kitle aşılması çalışmaları ve hastalıkla mücadele sonucunda 2002 yılında 100.000 insanda 27,2 kişide görülen brusellozis 2010 yılına gelindiğinde 100.000 kişiden 4 e düşmüştür [12]. Brusellozisin insandan insana bulaşması oldukça nadir görülmektedir. Bu şekildeki bulaşma genellikle kan veya doku transferi yolları ile gerçekleşmektedir [13].

Zoonozlar hayvanlardan insana bulaşan bakteriyel, viral ve paraziter patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlardır. Günümüzde 175'in üzerinde iyi tanımlanmış zoonotik hastalık mevcuttur. Toplumumuz açısından en önemli olan zoonotik hastalıklardan bir kaç; brusellozis, şarbon, kuduz, toksoplazmozis ve kist hidatiktir. Ülkemizde brusellozis hastalığı morbiditesi oldukça yüksek olmasına karşın mortalitesi düşük bir zoonotik hastalıktır. Her yıl binlerce insan bu hastalığa yakalanmakta ve hastalık insanlarda fizik yetersizliğe ve iş gücü kaybına neden olmaktadır. Brusellozis bir yandan da hastalığın

esas kaynağını oluşturan evcil hayvanlarda süt verimini azaltırken, hayvan düşüklüğü ile ekonomik kayba da yol açmaktadır [2].

Brusellozis dünyanın sığır koyun keçi ve domuz gibi evcil hayvan yetiştiriliği yapılan hemen her ülkede sıklıkla görülen kronik seyirli bulaşıcı ve nekrotik yangısal enfeksiyonlarla ortaya çıkan zoonotik bir hastalıktır [14-15].

Brucella bakterisi pH, sıcaklık, ışık koşulları uygun olduğunda su da ve biyolojik sıvılarda birkaç ay infektivitelerini koruyabilmekte ve 0°C altındaki düşük sıcaklıklarda canlı kalabilmektedir [16].

Brucella cinsi bakteriler gram(-), aerobik, fakültatif patojen organizmalardır. proteobakteri sınıfına dâhildirler. *B.abortus*, *B.melitensis*, *B.suis*, *B.canis*, *B.ovis*, *B.neotoma* ve *B.maris* olmak üzere 7 türü vardır [17, 18-19].

Brucella bakterisinin türleri ve bu türlere ait biyotipler Çizelge 1' de belirtilmiştir [12].

Çizelge 1.1. *Brucella* bakteri türleri

Tür	Biyotip	Rezervuar	İnsanda patojen özelliği
<i>B. melitensis</i>	1-3	Koyun, keçi	Var
<i>B. abortus</i>	1-6, 9	Sığır	Var
<i>B. suis</i>	1-5	Sığır, Domuz, ren geyiği	Var
<i>B. ovis</i>	Yok	Koyun	Yok
<i>B. canis</i>	Yok	Köpek	Var
<i>B.neotoma</i>	Yok	Ağaç ratları	Yok
<i>B.maris</i>	-	Deniz memelisi	-

Brusellozis (*B.melitensis*) ülkemizde ilk kez 1915 yılında Kuleli Hastanesinde bir erde H. Kural ve S. Akalın tarafından tanımlanmış, 1931’de sığırlardan Z. Berke, koyun ve keçilerden 1943’de Golem, 1944’de ise Köylüoğlu ve Aktan *Brucella* cinsi bakterileri bulmuşlardır [20].

Türkiye’de yapılmış çalışmalarda, koyun ve keçilerde görülen bakteriyel kaynaklı yavru atmalarının başlıca sebebinin brusellozis olduğu bildirilmektedir [1]. Türkiye’nin farklı bölgelerinde yapılan araştırmalarda koyunlardaki brusellozis oranının yaklaşık %14 ile %31 arasında değiştiği tespit edilmiştir [21].

Hayvanlardaki brusellozisle mücadele programına rağmen olgu sayısı giderek artmakta, hem hayvan endüstrisini hem de insan sağlığını etkileyerek ülke ekonomisine ciddi zararlar vermektedir. Brusellozisle savaşında halkın bilgilendirilmesi, süt ve süt ürünlerinin pastörize edilmesi ve hayvanların aşılama çalışması son derece önemlidir. 2011 yılında *Brucella*’nın yaygınlığı konusunda tarım ve hayvancılık bakanlığı çalışmalar yapmıştır. Yaptığı çalışmalar sonucunda, hastalığın eradikasyonunu sağlamış ülkelerin mücadele stratejileri çerçevesi uzmanlar tarafından incelenerek ülkemizde *Brucella* ile mücadelede kitle aşılması yapılmasının en etkili yöntem olduğuna, kitle aşılmasının ise her yaştaki hayvana güvenilir olarak uygulanabilecek konjunktival aşılama ile yapılmasına karar verilmiştir [3]. Çoğu enfeksiyon hastalıkları hayvanların düzenli aşılması ile kontrol altına alınabilmektedir [4].

İnsan ve hayvanlarda hastalık yapma yeteneğinde olan virüs, bakteri gibi mikroorganizmaların hastalık yapma güçlerinden arındırılarak ya da bazı mikroorganizmaların salgıladığı toksinlerin etkisinin ortadan kaldırılarak sağlam canlılara verilmesi için geliştirilen biyolojik maddelere aşı denilmektedir [22].

Brucella melitensis Rev-1 aşısı koyun ve keçilerin brusellozisinden korunmasında geniş çapta kullanılan aşılarından biridir [23]. Rev-1 aşısı 1957 yılında Kaliforniya üniversitesinde Elberg tarafından keşfedilmiş koyun ve keçilerin brusellozisinde ilk kez kullanılmıştır [24]. WHO, FAO, OIE gibi uluslar arası kuruluşlar koyun ve keçilerin brusellozisinde korumayı sağlayan Rev-1 in en iyi ve en uygun korumayı sağlayan aşı-

lardan biri olduğunu belirtmişlerdir [25]. Birçok araştırmalar sonucunda bu aşının kullanımını WHO, FAO gibi uluslar arası teşkilatlar önermiştir [26, 27-28].

Brusellanın kontrol ve eradikasyonu için Ülkemizde yapılan ilk çalışmalar sığırdada "*Brucella Abortus*" için 1930 yılında başlatılmıştır. Bu kapsamda 1951 yılında Ankara Etlik Veterinerlik Bakteriyoloji ve Seroloji Enstitüsü bünyesinde kurulmuş olan laboratuvar, daha sonra İstanbul Pendik Veterinerlik Bakteriyoloji ve Seroloji Enstitüsü'ne taşınmıştır. *Brucella melitensis* laboratuvarı ise 1965 yılında kurulmuş, *Brucella melitensis* Rev. 1 aşısının geniş kapsamlı üretimi 1969 yılında başlamıştır.

“Ulusal Brusella Kontrol ve Eradikasyon Projesi” 1984 yılında uygulanmaya başlanmış ve dişi sığır yavruları ile koyun ve keçi yavrularının aşılanacağı projenin 26 yılda tamamlanması hedeflenmiştir. Hastalığın yaygınlığının tespiti amacıyla 1998 yılında yapılan çalışmada *Brucella* fert prevalansı, sığırlarda % 1,43, koyunlarda ise % 1,97, sürü prevalansı ise sığırlarda % 11,4, koyunlarda % 15 olarak tespit edilmiştir. Bakanlıkca uygulanan “Ulusal Brusella Kontrol ve Eradikasyon Projesi” sonrasında hastalığın sığır ve koyunlarda yaygınlığının tespiti amacıyla 2011 yılında yapılan çalışmanın ilk değerlendirmelerine göre sığırlarda brusella sürü prevalansı %7,8 (fert prevalansı %2,7) ve koyunlarda *Brucella* sürü prevalansı %22,5 (fert prevalansı %3,4) olarak tespit edilmiştir. Ülkemizde son olarak 2012 yılında “Brusellanın Konjunktival Aşı İle Kontrol ve Eradikasyonu Projesi” başlatılmış olup bu kapsamda sığırlarda 10 yıl, koyun ve keçilerde 6 yıl sürdürülmesi öngörülmüştür [3].

Brucella melitensis 50 ülkede yaklaşık 1,8 trilyon *Brucella abortus* 101 ülkede 1,3 trilyon sığırdada *Brucella suis* ise 33 ülkede yaklaşık 0,9 trilyon domuzda görüldüğü rapor edilmiştir [29].

Brusellozis dünya çapında endemik zoonotik hastalıklardan biridir. Bu hastalığın kontrol altında tutulması ve etkilerinin azaltılması için 1995 yılında Irak'da brusellozis kontrol programı kurulmuştur. Bu programın temel amaçlarından biri küçükbaş hayvanlarda brusellozis görülme sıklığını %2nin altında büyük baş hayvanlarda ise %0,2 nin altına düşürmektir [12]. İranda koyun ve keçilerin brusellosizinde uygulanan rev-1 aşısı epidemik salgıların oranını % 45 den % 1,8 düşürdüğü görülmüştür [30].

Koyun ve keçilerde brusellozis hastalığından korunması için laboratuvar ortamında üretilen *Brucella melitensis* Rev-1 aşısının uzun süreli muhafazası için liyofilizasyon işlemi kullanılmaktadır.

Bugün gerek kültür koleksiyonlarında, gerek kültür kullanan endüstrilerde dondurarak kurutulmuş kültürler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların dışında başta çeşitli aşılar, sperma, eritrosit, plazma, serum, organ naklinde kullanılacak çeşitli dokular, enzimler, proteinler gibi pek çok biyolojik materyal bu yöntemle korunabildiği gibi gıda sanayisinde pek çok ürün bu yöntem ile elde edilmektedir. Bunların dışında çeşitli biyolojik çalışmalarda özellikle hastalıklı dokuların saklanması, küçük bitki ve hayvanların müzelerde sergilenmesi gibi uygulamalarda da dondurarak kurutma yönteminden yararlanılmaktadır. Bu geniş kullanım alanı yöntemin başarısını kanıtlamaktadır [31].

Liyofilizasyon yöntemi aşılar gibi önemli biyolojik ürünlerin hem depolanması hemde taşınımı aşamalarında stabilitesinin bozulmaması için kullanılan yöntemlerden biridir [32]. 19. yüzyıl sonlarında Altman ve Shackel liyofilizasyonun bilimsel temelini tanımlamışlardır. Ayrıca 1913 yılında Vansteenberg bu yöntemi kuduz virus kurutmasında kullanmıştır [33]. 1930 lardan sonra liyofilizasyon gıda, eczacılık gibi endüstriyel alanlarda sık kullanılmaya başlanmıştır [34].

Gelişen teknolojiye bağlı olarak bugün pek çok biyolojik materyal çeşitli amaçlarla liyofilize edilmektedir. Mikroorganizmalardan birçok bakteri, maya, küf, virüs, bazı algler ve birkaç protozoa cinsi yanında basta BCG olmak üzere pek çok aşı, enzimler ve proteinler, eritrosit, spermatozoa, organ naklinde kullanılmak üzere kornea, serum plazma, gibi birçok biyolojik materyal ve gıdalar liyofilizasyon tekniği ile korunabilmektedir [35, 36-37-38].

Liyofilizasyon bakteri kültürlerinin canlılığını sürdürülmesi için kullanılan genel bir yöntem olmasına rağmen bu yöntem ile bakteri kültürlerinin korunması bütün türler için geçerli değildir [39-40]. Mikrobiyolojik kültürlerin korunması ve uzun süreli saklanması için kullanılan liyofilizasyon işlemi, basit olarak çok düşük sıcaklıkta dondurulmuş

materyalden sublimasyon (katı halden gaz haline geçme) yöntemiyle su buharının dışarı atılması olayıdır. Gelişen bilim ve teknoloji süreci içinde kültürleri korumaya yönelik liyofilizasyonla ilgili pek çok yöntem bugün başarı ile uygulanmaktadır. Ancak tüm mikroorganizmalar için aynı yüksek başarı düzeyi ile kullanılacak tek bir yöntem yoktur. Kültürleri korumanın temel prensibi varyasyon veya mutasyona uğratmadan mikroorganizmayı saf halde ve uzun süre canlı tutmaktır [31]. Yapılan araştırmalar sonucunda dondurarak kurutma olarak bilinen liyofilizasyon işlemi bakterilerin korunması açısından en iyi yöntemlerden biri olduğu belirtilmektedir [41-42].

Bilimsel araştırma ve endüstriyel amaçlı biyolojik örneklerin uzun süreli depolanmasında ve kullanımlarında son derece kolaylık sağlaması gibi birçok avantaja sahip olduğu için liyofilizasyon işlemi hemen her yerde yaygın olarak kullanılmaktadır [41-42]. Liyofilizasyon basit olarak materyali önce dondurmak sonra süblimasyon ile su buharını dışarı çekerek materyali kurutmak olarak tanımlanabilir. Ancak liyofilizasyon işlemi dehidrasyon (suyun uzaklaştırılması) işlemi esnasında sitoplazma zarında meydana gelebilecek zararlar nedeniyle canlılar için ölümcül olabilmektedir [43]. Bu zararlı etkileri azaltmak için çeşitli şekerler (sukroz, laktoz, maltoz, trehaloz), şeker alkoller (inositol, sorbitol) ve aminoasitler (sodyum glutamat) gibi organizmayı uygun ortamda tutacak stabilizatörler kullanılmaktadır [44, 45-46].

Yoğurt bakterilerinin liyofilizasyonu üzerine yapılan çeşitli araştırmalarda liyofilizasyondan hemen sonra % 100 canlılık elde edilmesine karşılık liyofilizasyondan sonraki depolama süresi uzadıkça ölümlerin artması olayı stabilizatörler ve bunların amaca uygun olarak seçimi ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır [47].

Bakteri kültürlerinin düşük sıcaklıklarda dondurulması ve dondurulup kurutulması işlemleri uzun süreden beri kullanılmaktadır. Her iki yöntemde farklı bakteri kültürlerinin korunmasında başarılı olmaktadır. Fakat hiçbir yöntemde %100 verim elde edilememektedir. Liyofilizasyon dondurulmuş materyalin sublimasyonu ile kurutulması prensibine dayanmaktadır [48].

Mikroorganizmaların dondurularak kurutulması sonucu elde edilecek canlılık ve aktivite oranları üzerindeki en önemli etkinin koruyucu ortamların seçiminden ve kimyasal özelliklerinden kaynaklandığı yapılan araştırmalarda önemle vurgulanmaktadır. Durum böyle olunca araştırmacılar liyofilizasyon sonucu depolama sırasında mikroorganizmaların canlılığının ve aktivitelerinin yüksek oranlarda kalmasını sağlayacak farklı özelliklerde ve formüllerde stabilizer katkıları önermektedirler [49].

Bu çalışmada *Brucella melitensis* Rev-1 aşı kültürünün farklı oranlarda bileşenler içeren stabilizatörler kullanılarak liyofilizasyon işlemindeki canlılık ve aktivite kaybının azaltılması ve hızlı stabilite testi yapılarak kullanılan farklı stabilizatörlerin raf ömrüne etkileri araştırılması amaçlanmıştır.

Pınarkara (2008), liyofilizasyon işlemi esnasında bazı laktik asit bakterilerinin canlılıkları üzerine kriyojenik koruyucu maddelerin etkileri adlı çalışmada kriyojenik koruyucu madde ilavesinin kültür canlılığı üzerinde olumlu etkisi olduğunu göstermiştir. Çalışmasında farklı kriyojeniklerin farklı konsantrasyonlarının kültürler üzerine spesifik etkilerde bulunduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca askorbik asitin %5 ve %10'luk oranı çalışmada kullanılan tüm bakteri suşları üzerinde canlılığı inhibe edici özellik göstermiş ve bu kadar yüksek konsantrasyonda askorbik asit oranının bakterilerde koruma ortamı olarak kullanılmayacağı gözlemlenmiştir. Laktik asit bakterilerinin canlılıkları üzerine kriyojenik koruyucu madde ilavesinin farklı bakteri türlerinde canlılık üzerine değişik sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç olarak 20 haftalık depolama süresi sonunda en yüksek canlılığı *S. thermophilus* için % 5 pepton, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. casei*, *L. bulgaricus* ve *L. plantarum* için % 10 trisodyum sitrat, *L. delbrueckii* ssp. *lactis* için % 0,1 askorbik asit, *L. helveticus* için % 5 maya ekstraktı ortamlarının sağladığı tespit edilmiştir [49].

Thomas (1997), liyofilizasyon işleminde koruyucuların içerisindeki bileşiklerin fonksiyonel önemini keşfetmiştir [50].

Heckly ve ark. (1959), *Brucella melitensis* Rev-1 bakterisinin liyofilizasyonu ile yapılan çalışmada koruyucu madde olarak glukoz, sukroz ve laktoz şekeri kullanıldığında liyofilizasyon işleminin dondurma ve kurutma aşamalarında organizmaların korunmasında hemen hemen eşit etki gösterdiği belirtilmiştir. Liyofilizasyon sonrası organizma-

ların yaklaşık %50 sinin canlı kaldığı görülmüştür. Glukoz şekeri sukroz ve laktoz ile karşılaştırıldığında ise oda sıcaklığında 125 günlük depolama süresiyle diğerlerine göre daha az etkili olmaktadır [40].

Alexander ve van Drimmelen yaptıkları çalışma sonucu *Brucella abortus* S-19 aşısının canlılığının liyofilizasyon ile korunduğunu tespit etmişlerdir [51].

Behroozikhah ve arkadaşları İranda *Brucella melitensis* Rev-1 bakterisinin 9 farklı koruyucu ortam ile liyofilizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışma sonucunda %5 sukroz,%2,5 bacto casitone ve %1 L-glutamik asit sodyum tuzu içerikli stabilizatör ile %2,5 bacto casitone, %10 sukroz ve %1 sodyum L-glutamat stabilizatöründe liyofilizasyondan sonra liyofilizasyon kaybının enaz olduğu tespit edilmiştir. Fakat en iyi koruyucu ortamın ise %5 sucrose, %2,5 bacto casitone,%1 sodyum L-glutamat ile diğer koruyucu ortam olan %5 sucrose, %2,5 bacto casitone,%1 L-glutamic asit sodyum salt olduğu bildirilmiştir [25].

Liyofilizasyon biyolojik materyallerin stabilitesi ve korunmasında kullanılan önemli ve etkin bir yöntemdir. Son yıllarda liyofilizasyon ile ilgili çalışmalar artmıştır. Özellikle zaman, basınç ve sıcaklık parametreleri ile ilgili optimizasyonlar *Brucella* aşısının stabilitesinin artmasında önemli rol oynamaktadır [52, 48-50]. *Brucella* cinsi bakterilerin liyofilizasyonunda koruyucu olarak farklı ortamlar kullanılır. Bu koruyucu ortamlardan en iyi olanı % 2,5 bacto casitone,% 5 sakkaroz,% 1 sodyum L glutamat içeren ortamdır. Kurutma sırasında bacto casitone ile alınan sonuçlar, ürünün stabilitesinde tatmin edici bir istikrarın olduğunu göstermiştir [52].

Greaves yaptığı çalışmalar sonucunda stabilitede kullanılan en iyi şekerin sukroz olduğunu bildirmiştir. Fakat bu oranın %10-20 arasında olduğu zaman stabilitede zaman ile azalma olduğu belirtilmektedir [53].

Ferry adlı araştırmacı yaptığı deneysel çalışmalar sonucunda %5 ile %10 arası şeker konsantrasyonunun en ideal olduğunu tespit etmiştir. Şeker materyaline ek olarak protein bileşenleri eklendiğinde stabilitede artış olduğunu belirtmiştir [52].

van Drimmelen ve Steyn *Brucella abortus* S-19 aşısının liyofilizasyonu üzerine yaptıkları araştırmada yüksek ve düşük konsantrasyonda askorbik asit ve thiourea gibi antioksidant içeriğinin konsantre ve daha az konsantre aşıda canlılık kaybı üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda düşük oranda antioksidant içeriğe sahip konsantre aşının daha az olan konsantre aşıya göre daha yüksek oranda canlılık gösterdiği buna karşın antioksidant içeriği yüksek olan konsantre ve daha az konsantre olan aşılardaki kayıpların ise birbirine çok yakın değerlerde olduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir [54].

Halkman ve arkadaşlarının yoğurt bakterilerinin liyofilizasyonu üzerine yaptıkları çeşitli araştırmalarda liyofilizasyondan hemen sonra %100 canlılık elde edilmesine karşılık ölümlerin depolama süresi uzadıkça artması sonucu stabilizatörler üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır [47].

Fry yaptığı liyofilizasyon çalışmaları sonucunda bazı şekerlerin %5-10 arasındaki konsantrasyonlarının bakterilerin liyofilizasyon işleminde canlılık oranını önemli oranda arttırdığını rapor etmiştir [55].

Naylor ve Smith *Serratia marcescens* ile yaptıkları çalışmalarında thioüreanın liyofilizasyon esnasında hayatta kalma oranını arttırdığını tespit etmişlerdir [56].

Flasdorf yaptığı liyofilizasyon çalışmalarında serum, plazma ve süt proteinlerini koruyucu ortam olarak kullanmıştır [5].

Proom ise jelatin ve metilselülozu liyofilizasyon işleminde kullanmıştır. Sonuç olarak jelatin ve metilselülozun liyofilizasyon işleminin dondurma işlemi esnasında yaşayabilir hücrelerin kaybını azalttığını belirtmiştir [6].

Çeşitli araştırmacılar yaptıkları liyofilizasyon çalışmalarında farklı koruyucu bileşiklerin bir arada kullanılmasıyla *Brucella abortus* S-19 aşısının liyofilizasyonunda yaklaşık olarak %50 canlılık oranı sağladığını bulmuşlardır [57, 58-59].

Scheer adlı araştırmacı *Brucella abortus* S -19 ile yapılan liyofilizasyon çalışmalarında % 2 tryptose, % 0,5 askorbik asit ve % 0,5 thioüre kullanıldığında %56 oranında verim elde ettiğini belirtmiştir. Buna ek olarak orta thioüre konsantrasyonlarında verimin arttı-

đını, buna karşılık askorbik asit orta konsantrasyonlarında önemli bir değişikliğin olmadığını tespit etmiştir [60].

Carvalho ve Arkadaşları 5 farklı türdeki laktik asit bakterisinin liyofilizasyonunda kullanılmak üzere yağsız süt ortamına %1.25 oranında ilave edilen sorbitol ve mono sodyum glutamatı koruyucu ortam olarak denemişler ve liyofilizasyondan sonra sodyum glutamat ilave edilen ortamda yüksek oranda canlılık elde etmişlerdir [61].

Güngör ve arkadaşları attenuue mavidil serotip-4 aşısının halihazırda kullanılmakta olan embriyo ekstraktı ve yumurta sarısından oluşan stabilizatörünün yerine farklı stabilizatörlerin kullanılması bunların liyofilizasyon ve raf ömrüne etkileri üzerine yapılan araştırmada 5 farklı stabilizatör ortam denenmiş ve deneme sonucu bütün stabilizatör ortamlarda oluşan kayıp kabul edilebilir düzeyde bulunmuştur. Fakat yapılan raf ömrü çalışmalarında en iyi performansı Lactalbumin hydrolysate %5, sucrose %10 (LH) ile hazırlanan aşı göstermiştir. Araştırmanın sonucu olarak attenüe Mavidil Serotip-4 liyofilize aşısının geleneksel stabilizatörü olan embriyo ekstraktı ve yumurta sarısının yerine, Lactalbumin hydrolysate %5, sucrose %10 (LH) karışımından oluşturulmuş stabilizatörün güvenle kullanılabilceği bildirilmiştir [62].

Çekoslovakya ulusal tip kültürler koleksiyonu, patojenik bakterilerin muhafazası için dondurularak kurutmanınbu organizmalar için orta seviyede birincil öneme sahip bir faktör olduğu sonucuna varmıştır. Basit ve bileşik koruyucu ortamlar ile elli cinse ait ağırlıklı olarak patojen bakteri kültürleri üzerindeki koruyucu etkiler incelenmiştir. Farklı patojen bakterilerin liyofilizasyonunda kullanılan koruyucu ortamlar dondurularak kurutulmuş kültürlerin korunmasında ve biyolojik aktivitesini korumada en önemli faktör olduğu belirtilmiştir [63].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. *Brucella Melitensis* Rev-1 Aşı Kültürü

Dollvet Veteriner Aşı İlaç Biyolojik Madde Üretimi ve Sanayi Ticaret Anonim Şirketi bakteriyel aşı üretim laboratuvarında üretimi yapılan attenüe *Brucella melitensis* Rev-1 aşı kültürü çalışmamızın ana materyalini oluşturmaktadır.

2.1.2. Kullanılan kimyasal malzemeler

Bacto casitone

Sukroz

Sodium L- glutamat monohydrate

Tryptone

Bacto tryptose

Proteose peptone

Gelatine

L-Ascorbic acid

Thiourea

2.1.3. Kullanılan laboratuvar malzemeleri

Manyetik karıştırıcı

1000 ml cam damacana

Otoklav

Laminar flove kabin

Koloni sayım cihazı

Pipetör

Disposable plastik Petri

Disposable plastik öze

Pipet

Cam şişe

Plastik tıpa

Aluminyum kapak

2.1.4. Bioreaktör

Sartorius marka biostat c plus model bioreaktör cihazı kullanılmıştır.

2.1.5. Liyofilizasyon cihazı

Christ marka liyofilizasyon cihazı kullanılmıştır.

2.1.6. Vakum cihazı

Electro Technic Products, Inc. Bd-10 Av Marka vakum cihazı kullanılmıştır.

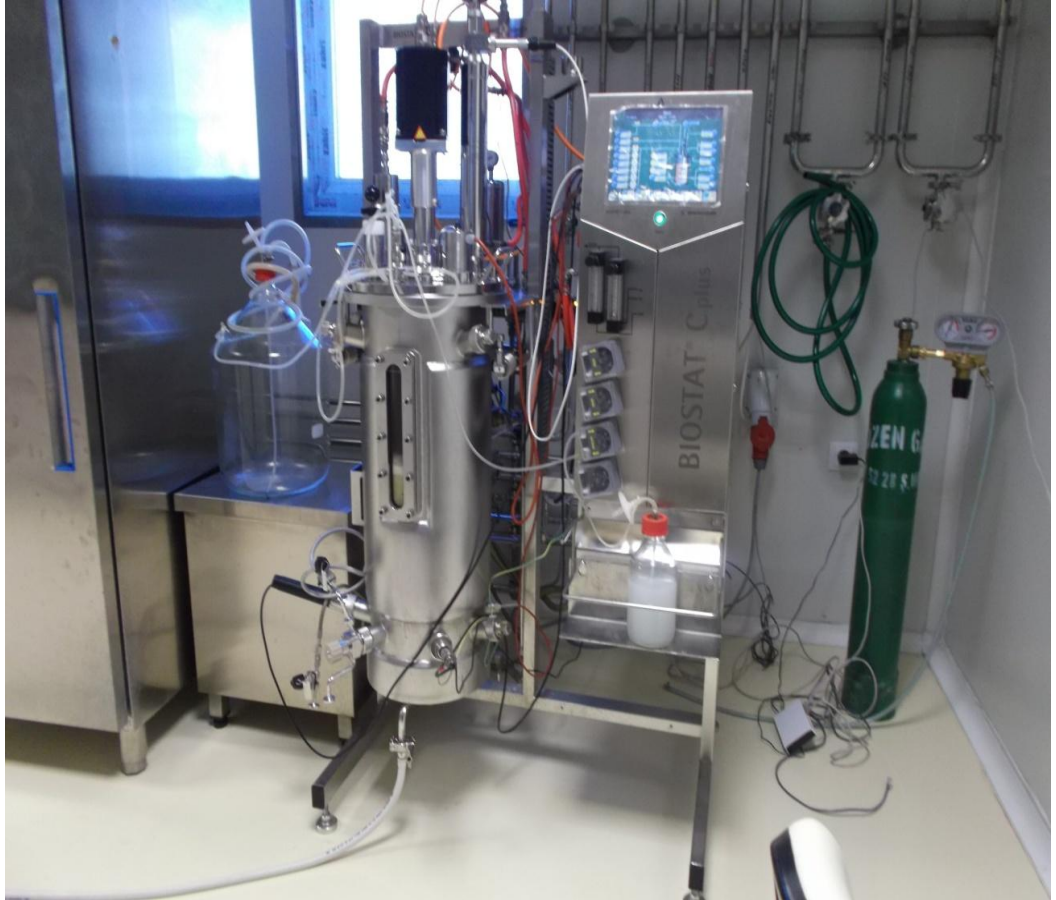
2.1.7. Nem ölçer

Sartorius MA 100 marka nem ölçme cihazı kullanılmıştır.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. *Brucella melitensis* Rev-1 üretimi

Dollvet Veteriner Aşıları Üretim Tesisi bakteriyel aşılar üretim laboratuvarında çalışma tohum suşu olarak kurumun stokta bulunan *Brucella melitensis* rev-1 aşı suşu tryptic soy agar içeren 5 adet Petriye azaltma tekniği ile saf koloni eldesi için ekilmiş ve + 37 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Seri pasajlar sonucu *Brucella melitensis* rev-1 bakterisi önceden steril edilmiş ve içerisinde sıvı besiyeri bulunan bioreaktöre pasajlanmıştır. Bioreaktörde 72 saat boyunca uygun oksijen miktarı ve PH 7’de inkübe edilmiştir [64]. İnkübasyon sonucu üremesi tamamlanmış olan kültür aseptik şartlar altında bioreaktörden damacanaya aktarılmıştır. Damacanadaki kültür, çöktürme işlemine tabi tutularak bulk ürün elde edilmiştir. Bulk ürün liyofilizasyon işleminde kullanılmak amacı ile +4°C de muhafaza edilmiştir.



Resim 2.2.1. *Brucella* bakterisi üretiminde kullanılan bioreaktör

2.2.2. Farklı Stabilizatörlerin (koruyucu ortam) hazırlanması

Genellikle protein, aminoasit ve şekerden oluşan koruyucu maddelerden değişik oranlar kullanılarak 4 farklı stabilizatör ortam hazırlanmıştır.

1 numaralı stabilizatör: % 2,5 Bacto Casitone , % 5 Sukroz, %1 Sodium L- glutamat monohydrate.

2 numaralı stabilizatör: % 2,5 Tryptone , % 0,5 Sukroz , % 0,1 Sodium L-glutamat monohydrate.

3 numaralı stabilizatör: % 2,5 Proteose peptone , % 5 Sukroz , % 0,5 Gelatine

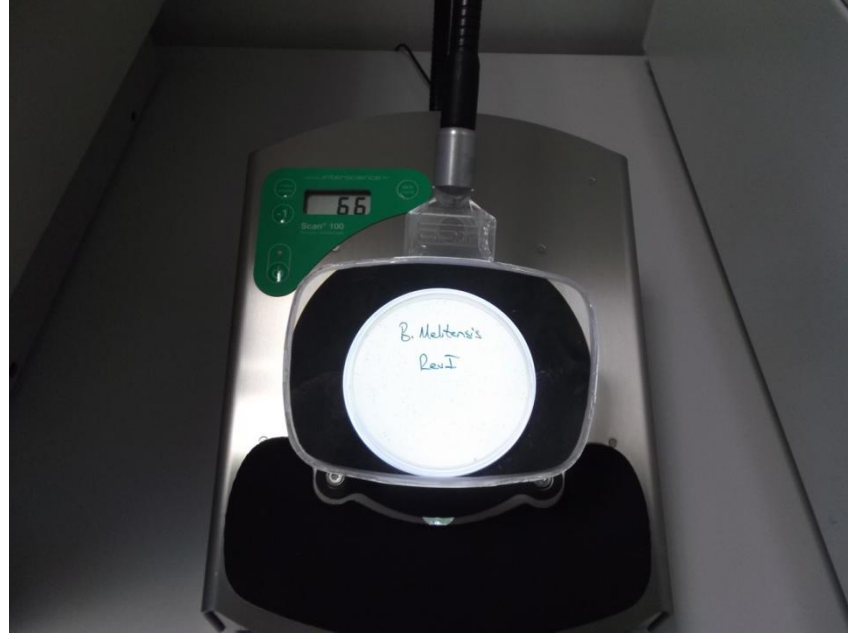
4 numaralı stabilizatör: % 2 Bacto tryptose , % 0,5 L-Ascorbic acid , % 0,75 Thioürea

2.2.3. Stabilizatörler ile *Brucella melitensis* Rev-1 aşısı kültürünün seyreltmesi

4 farklı stabilizatör ortam içerisine +4⁰C de bekleyen ve önceden üretimi yapılmış olan attenüe *Brucella melitensis* bulk aşısı ürününden ilave edilerek 4 farklı aşısı grubu serisi oluşturulmuştur.

2.2.4. Liyofilizasyon öncesi canlılık sayımı

Brucella melitensis Rev-1 aşısı kültürü ile homojen halde karışmış olan stabilizatörlerden numune alınarak liyofilizasyon öncesi canlılık sayısı tespiti için kültürel sayım yöntemlerinden dilüsyon (seyreltme) yöntemiyle canlılık sayımı yapılmıştır [65].



Resim 2.2.4. Denemelerde kullanılan koloni sayacı

2.2.5. Liyofilizasyon işlemi

Liyofilizasyon tepsilerine aşı şişeleri dizilmiş ve özel liyofilizasyon tıparları ile birlikte otoklavlanarak liyofilizasyon işleminde kullanılmak üzere tıpa ve liyofilizasyon şişeleri steril edilmiştir. Laminar flow kabin altında her aşı grubu serisinden tepsi içerisindeki şişelere 2 ml. olacak şekilde dolun işlemi gerçekleştirilmiştir. 4 aşı grubu serisi için aynı işlem tekrarlanmıştır.

Dolumu yapılan tüm şişeler özel liyofilizasyon tıpası ile yarım kapatılarak liyofilizasyon içerisindeki raflara yerleştirilmiştir. Liyofilizasyon işlemi genel olarak 3 basamakta gerçekleştirilmiştir.

1. Freezing (donma) evresi. Ürünün sublimasyon öncesi dondurulduğu evredir.
2. Primer kurutma evresi. Donmuş halde bulunan ürüne düşük basınç ve yüksek vakum altında sublimasyon işlemi uygulanarak ürün içerisindeki fazla suyun uzaklaştırılması sağlanır.
3. Sekonder kurutma evresi. Liyofilizasyon işleminin son basamağıdır. Ürün içerisindeki bağıl su miktarı optimum seviyeye gelene kadar ısı ile üründen uzaklaştırılır.



Resim 2.2.5. Denemelerde kullanılan liyofilizasyon cihazı

Birinci basamak olan donma işleminde aşı şişelerinin konulduğu liyofilizasyon tablası sıcaklığı -60°C de 4 saat tutularak ürünün liyofilizasyon cihazı içerisinde tam olarak donması gerçekleştirilmiştir.

İkinci basamak olan primer kurutma evresi ise düşük basınç ve yüksek vakum altında 24 saat içerisinde kademeli olarak şişe iç sıcaklığı -40°C den $+22^{\circ}\text{C}$ ye gelene kadar ısıtılarak 1 gün boyunca sublimasyon işlemine maruz bırakılmıştır. Böylelikle ürün içerisindeki su miktarı liyofilizasyon cihazı içerisindeki soğuk bölge olan kondensatörlere yapışarak üründen uzaklaştırılmıştır.

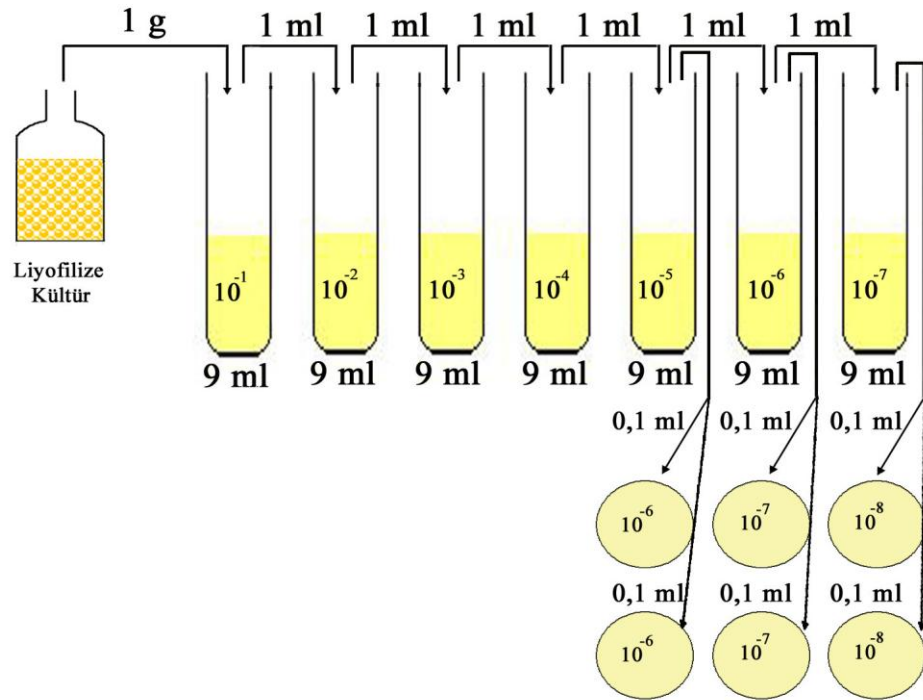
Son basamak olan sekonder kurutma evresinde ise 25°C de 2 saat tutularak ürün içerisindeki bağıl su miktarı uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. Liyofilizasyon süresi toplamda 30 saat olarak alınmıştır. Liyofilizasyon işlemi bittikten sonra cihaz otomatik olarak vakum

altında tıparakı kapatarak liyofilizasyon işlemi sona ermiştir. Liyofilizasyon işlemi bitikten sonra çıkarılan aşı Şişeleri +4  C de muhafaza edilmiştir.

2.2.6. Liyofilizasyon sonrası canlılık sayımı

Liyofilizasyondan ıkan *Brucella melitensis* Rev-1 aşı grubu serilerinden alınan  rneker ile dilasyon (seyreltme) yöntemiyle liyofilizasyon sonrası canlılık sayımları yapılmıştır. Oluşan canlı koloniler koloni sayım cihazı ile sayılmıştır.

Kültürel sayım yöntemlerinden dilasyon (seyreltme) yöntemi Resim 2.2.6.'da belirtilmiştir [65].



Resim 2.2.6. Kültürel sayım yöntemlerinden dilasyon yöntemi

2.2.7. Liyofilizasyon kayıplarını belirleme

Denemesi yapılan aşı grubu serilerinin önceden belirlenmiş olan liyofilizasyon öncesi canlılık sayısı ile liyofilizasyon sonrası canlılık sayısı arasındaki kayıp oranı belirlenmiştir. Kullanılan farklı koruyucu ortamların liyofilizasyon esnasında liyofilizasyon stresine karşı bakteri canlılığını koruma etkisi bu 2 sayım arasındaki farklılık olarak düşünülmüş ve az kayıp veren koruyucu ortam iyi koruma yapmış, liyofilizasyon esnasında çok kayıp veren ortam ise daha az koruma yapmış olarak belirlenmiştir.

2.2.8. Hızlı stabilite testi

Liyofilize olmuş şişelerin +37°C de 7 gün boyunca bekletilmesiyle elde edilen canlılık sonucu şişelerin 1 yıllık raf ömründe beklemesiyle eşdeğer sonuç verdiği bildirilmektedir [66].

Bu veriden faydalanarak kullanılan koruyucu ortamların bakterinin raf ömrü süresince canlı kalması üzerine etkilerini belirlemek için hızlı stabilite testi yapılmıştır. Liyofilize olmuş *Brucella melitensis* Rev-1 aşı grubu serilerinden her gruptan 2 adet aşı şişesi +37°C de 7 gün boyunca bekletilmiş ve bu sürenin sonunda kültürel sayım yöntemlerinden dilüsyon (seyreltme) yöntemi kullanılarak canlılık sayımı yapılmıştır.

Oluşan canlı koloniler koloni sayım cihazı ile sayılmıştır. Elde edilen sonuç ile liyofilizasyondan hemen sonra yapılan canlılık sayımlarından elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak hangi grubun 1 yıllık raf ömründe daha az kayıp verdiği belirlenmiştir.

3.BULGULAR VE TARTIŞMA

4 farklı stabilizatör ile yapılan *Brucella melitensis* Rev-1 aşısı liyofilizasyon çalışmalarında liyofilize olmuş final ürünün yabancı ürün kontaminasyonunu belirlemek amacıyla sterilite ekimi ve liyofilize ürünlerin depolama esnasındaki kalitesiyle ilişkisi olduğu için şişelere vakum kontrolü ve nem ölçümü yapılmıştır.

Denemesi yapılan grupların liyofilizasyon öncesi ve liyofilizasyon sonrası canlılık sayısı belirlenerek hangi koruyucu ortamın liyofilizasyon stresine karşı dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Hızlı stabilite testi yapılarak liyofilizasyon sonrası canlılık sayısı ile hızlı stabilite testi sonucunda belirlenen canlılık sayısı arasındaki kaybın yüzdeler olarak belirlenmesine çalışılmıştır.

3.1. Sterilite

Liyofilizasyondan sonra bütün aşı grubu yapılan sterilite testi sonucunda steril bulunmuştur.

3.2. Vakum

Liyofilizasyondan sonra her aşı grubundan 3 örnek alınarak vakum testi yapılmıştır. Liyofilizasyon sonrası 4 aşı grubunda vakum oranı % 100 bulunmuştur.

3.3. Nem

Her aşı grubundan 3 adet liyofilize aşı alınarak nem oranlarına bakılmış ve grupların ortalama nem oranları belirlenmiştir.

1 numaralı aşı grubu nem oranı: % 3,4

2 numaralı aşı grubu nem oranı: % 7,39

3 numaralı aşı grubu nem oranı: % 4,1

4 numaralı aşı grubu nem oranı: % 7,23

3.4. Liyofilizasyon öncesi ve liyofilizasyon sonrası canlılık farkları

Kullanılan 4 farklı stabilizatörün liyofilizasyon öncesi ve liyofilizasyon sonrası canlılık üzerine yaptığı etkiler Çizelge 3. 4.'te belirtilmiştir.

Çizelge 3. 4. Liyofilizasyon öncesi ve sonrası canlılık değerleri

Aşı grubu serileri	Lyf. öncesi canlılık	Lyf. sonrası canlılık	Kayıp oranı
1. grup	35,5x10 ⁹ cfu/ml	38,5x10 ⁹ cfu/şişe	% 45
2.grup	32x10 ⁹ cfu/ml	14,5x10 ⁹ cfu/şişe	%77
3.grup	33x10 ⁹ cfu/ml	57,5x10 ⁹ cfu/şişe	%13
4.grup	41x10 ⁹ cfu/ml	54x10 ⁹ cfu/şişe	%34

Çizelgedan anlaşıldığı gibi liyofilizasyon esnasında en iyi korumayı %13 kayıp ile 3. Grup yapmıştır sırasıyla 4.grup, 1. grup ve son olarak en zayıf korumayı ise 2. Grup yapmıştır.

3.5. Hızlı stabilite testi

Denemesi yapılan aşı grubu serilerinden liyofilize aşı şişeleri alınarak +37°C de 1 hafta bekletmek suretiyle hızlı stabilite testi yapılmıştır. Çalışma sonucunda yapılan stabilite testlerinden elde edilen sonuçlara göre liyofilizasyondan sonra en istikrarlı ortam 1. grup olmuştur daha sonra sırası ile 3.grup, 4.grup ve en istikrarsız olan ortam ise 2. grup olmuştur.

Çizelge 3. 5. Liyofilizasyon sonrası ile hızlı stabilite testi arasındaki canlılık farkları

Aşı grupları	Lyf. Sonrası canlılık sonuçları	37°C de 7. Gün sonundaki canlılık sonuçları	37°C de 7. Gün sonundaki kayıp oranları
1. grup	38,5x10 ⁹ cfu/şişe	9,35x10 ⁹ cfu/şişe	%75,7
2.grup	14,5x10 ⁹ cfu/şişe	7,5x10 ⁷ cfu/şişe	%99,4
3.grup	57,5x10 ⁹ cfu/şişe	6,05x10 ⁹ cfu/şişe	%89,4
4.grup	54x10 ⁹ cfu/şişe	4,5x10 ⁹ cfu/şişe	%91,6

4 farklı aşı grubu serilerinin liyofilizasyon sonrası canlılık sonuçları ile hızlı stabilite testi sonucunda bütün aşı gruplarında yapılan canlılık sayım sonuçları ve liyofilizasyon sonrası canlılık sonucu ile hızlı stabilite testi canlılık sonucu arasındaki kayıp oranları Çizelge 3. 5.' te verilmiştir.

Farklı zamanlarda yapılan araştırmalar sonucu liyofilizasyon ortamında koruyucu madde olarak kullanılan şeker konsantrasyonunun %5 ile %10 arasındaki konsantrasyonlarının en ideal olduğu belirtilmiştir [52-55].

Yapılan bu çalışmada ise liyofilizasyon kayıp oranı en düşük olan 3 numaralı aşı grubu serisi ile hızlı stabilite testinde en az kayıp gösteren 1 numaralı aşı grubu serisi %5 oranında şeker konsantrasyonu içermesiyle yapılan çalışmalarda elde edilen %5 ile %10 arasındaki ideal şeker konsantrasyonu sonucu ile paralellik göstermiştir. Nitekim şeker konsantrasyonu %0,5 olan 2 numaralı aşı grubu serisi liyofilizasyon esnasında yapılan canlılık sayım sonucu ile hızlı stabilite testi sonucu yapılan canlılık sayım sonucunda en fazla kayıp veren stabilizatör ortam olarak düşük şeker konsantrasyonunun canlılık oranını olumsuz yönde etkilediğini desteklemiştir.

Behroozikhah ve arkadaşları İranda *Brucella melitensis* Rev-1 bakterisinin 9 farklı koruyucu ortam ile liyofilizasyon çalışması yapmıştır. Çalışma sonucunda %5

sukroz,%2,5 bacto casitone ve %1 l-glutamik asit sodyum salt içerikli stabilizatör ile %2,5 bacto casitone, %10 sukroz ve %1 sodyum L-glutamat stabilizatöründe liyofilizasyondan sonra liyofilizasyon kaybının en az olduğunu tespit edilmiştir. Fakat araştırmacılar liyofilizasyondan sonra en iyi koruyucu ortam olarak %5 sucrose, %2,5 bactocasitone,%1 sodyum L-glutamat ile diğer koruyucu ortam olan %5 sucrose, %2,5 bactocasitone,%1 L-glutamic asid sodyum salt olduğunu bildirmektedirler [25].

Ferry adlı araştırmacı *Brucella* cinsi bakterilerin liyofilizasyonunda koruyucu olarak farklı ortamlar kullanıldığını bildirmiştir. Bu koruyucu ortamlardan en iyi olanı % 2,5 bactocasitone,% 5 sakkaroz,% 1 sodyum L-glutamat içeren ortamdır. Kurutma sırasında bactocasitone ile alınan sonuçlar ise ürünün stabilitesinde tatmin edici bir istikrarın olduğunu belirtmiştir [52].

Yapılan bu çalışmalara paralel olarak *Brucella* cinsi bakterilerin liyofilizasyonunda önerilen %5 sukroz, %2,5 bactocasitone ve %1 lik Na L-glutamat stabilizatörü bu çalışmada liyofilizasyon esnasında diğer stabilizatörlere oran ile daha az koruma göstermiştir. Fakat yapılan hızlı stabilite testi çalışmasında ise en az kayıp vererek liyofilize olmuş canlı *Brucella* bakterilerini en istikrarlı şekilde muhafaza eden ortam olmuştur.

Scheer adlı araştırmacı ise *Brucella abortus* S-19 ile yaptığı liyofilizasyon çalışmalarında % 2 tryptose,% 0,5 askorbik asit ve % 0,5 thioüre kullanıldığında %56 verim elde ettiğini belirtmiştir. Buna ek olarak orta thioüre konsantrasyonlarında verimin arttığı, buna karşılık askorbik asit orta konsantrasyonlarında önemli bir değişim olmadığını tespit etmiştir [60]. Yapılan bu çalışmada ise thioüreanın orta konsantrasyonu olarak % 2 bacto tryptose,% 0,5 L- askorbik asit ve % 0,75 thioüre içeren 4 numaralı aşı grubu serisi oluşturulmuş elde edilen liyofilizasyon verimi ise Scheer (1955)'in elde ettiği verimden yüksek çıkmıştır. Bunun nedeni olarak Scheer (1955)'in belirttiği orta thioürea konsantrasyonunda verim artması gösterilebilir.

Sparkes ve arkadaşları liyofilize aşılarda ölçülen %6 ve üzerindeki nem oranının aşının stabilitesi üzerine olumsuz bir etkisi olduğunu belirtmişlerdir [67]. Liyofilizasyon sonucunda oluşan liyofilize ürünün nem miktarı çok yüksek olduğunda (yaklaşık % 10) uy-

güçlenen liyofilizasyon programının son basamağı olan ve ürün içerisindeki bağıl su miktarını çeken sekonder kurutma safhası biraz daha uzatılarak üründeki nem oranı düşürölür [24].

Yapılan bu çalışmada genel olarak nem oranları yüksek bulunmuştur. Bu nedenle literatür bilgilerine göre uygulanan liyofilizasyon programının sekonder kurutma safhası biraz daha uzatılarak nem oranları düşürölürse liyofilize olmuş aşı şişelerinin raf ömrü üzerine olumlu etki yapabilmesi muhtemeldir.

4. SONUÇ

Bu araştırmada attenüe *Brucella melitensis* Rev-1 aşı suşu kullanılarak değişik stabilizatörlerle hazırlanan liyofilize *Brucella melitensis* Rev-1 aşısının liyofilizasyon öncesi ve liyofilizasyon sonrası canlılık sayımı yapılarak liyofilizasyon sürecindeki kaybı belirlenmiştir. Daha sonra hızlı stabilite çalışması yapılarak depolama esnasındaki kayıpların belirlenmesi ve liyofilizasyon sonrası yapılan canlılık sayımı ile hızlı stabilite testi sonucu yapılan canlılık sayımı karşılaştırılarak en uygun koruyucu ortamın belirlenmesi amaçlanmıştır.

Denemesi yapılan 4 farklı koruyucu ortam ile liyofilizasyonu yapılan aşı gruplarının ölçülen nem miktarları ve hızlı stabilite testindeki canlılık sonuçlarının paralel çıkması liyofilize üründe bağlı bulunan nem yüzdesi ile depolama esnasındaki canlılık kayıp oranının bağlantılı olduğunu göstermiştir. Düşük nem oranı içeren 1. grup aşı serisinin hızlı stabilite testinde daha az kayıp vererek nem oranının düşük olmasının depolama esnasında canlılık üzerindeki olumlu etkisini desteklemiştir.

Liyofilizasyon sonucunda oluşan liyofilize ürünün nem miktarı çok yüksek olduğunda uygulanan liyofilizasyon programının son basamağı olan ve ürün içerisindeki bağlı su miktarını çeken sekonder kurutma safhası biraz daha uzatılarak ürünün nem oranı düşürülür.

Liyofilizasyonu yapılan 4 farklı stabilizatör ortam ile liyofilizasyonu yapılan aşı gruplarından alınan örneklerde ölçülen nem miktarı genel anlamda yüksek çıkmıştır. Liyofilizasyon işleminin dondurma kısmından sonraki evresi olan primer kurutma evresinde sublimasyon ile ürünlerdeki suyun yaklaşık % 90 lık kısmı uzaklaştırılır. Kalan % 10 luk kısım ise liyofilizasyon programının son evresi olan ve ürün içerisindeki bağlı su olarak adlandırılan suyun uzaklaştırılması için uygulanan sekonder kurutma işlemi yapılır.

Sekonder kurutmada ürünün cinsine ve özelliğine göre hassas derecelerde ısı işlemi verilmesi son derece önemlidir. Sekonder kurutma işleminde gerekenden yüksek ısı veya çok uzun süre sekonder kurutmada tutulur ise hücre içerisindeki su miktarının ta-

mamı çekilebilir bu ise yapıda ve aktivitede bozulmalara neden olur. Hücre içerisinden aşırı su çekildiği için hücrelölümler meydana gelebilir. Yapılan bu çalışmada nem oranları yüksek çıktığı için sekonder kurutma evresinin ürünün yapısını ve aktivitesini değiştirmeyecek şekilde deneme yapılarak uzatılması gerekmektedir.

İki numaralı aşı grubu serisi liyofilizasyon esnasındaki liyofilizasyon stresine karşı oluşturduğu dayanaksız ortam ile hızlı stabilite testi sonucunda yapılan canlılık sayımında en çok kayıp veren ortam olarak *Brucella* cinsi bakterilerin liyofilizasyonu işleminde iyi bir koruma göstermediği belirlenmiştir.

3 numaralı aşı grubu serisi liyofilizasyon direncine karşı dayanıklı bir ortam oluşturmuştur. Bu grupta kullanılan stabilizatörün uygun bir liyofilizasyon programı ile tekrar denenerek ve gerçek zamanlı stabilite testi yapılarak %5 sukroz, %2,5 bactocastone ve %1 lik Na L-glutamat stabilizatörüne alternatif olabileceği düşünülmektedir.

4 numaralı aşı grubu serisinde kullanılan stabilizatör ortamın daha önceden yapılan araştırmalar sonucu ile benzer oranda liyofilizasyon kaybı göstermiştir. Liyofilizasyon esnasında canlılık verimi olarak kabul edilebilir bir başarı göstermiş fakat hızlı stabilite testi sonucunda yapılan canlılık sayımında yüksek oranda kayıp vermiştir.

5. KAYNAKLAR

1. Öngör, H., Muz, A., Çetinkaya, B., 2001. Atık yapmış koyunlarda brucellozis'in teşhisinde ELISA ile Diğer serolojik testlerin karşılaştırılması. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 25, 21-26.
2. Altay, G., "Kültür pozitif 70 bruselloz hastasının klinik ve laboratuvar verilerinin değerlendirilmesi & antibiyotik duyarlılıklarının e-test yöntemi ile incelenmesi", Uzmanlık tezi, TC Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, 2008.
3. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı., 2012. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü Brusellanın Konjunktival Aşısı İle Kontrol ve Eradikasyonu Projesi Genelge NO:2012/03
4. Blasco, J. M., 1997. A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. Preventive Veterinary Medicine 31, 275-283.
5. Flosdorf, E. W., 1949. Freeze-drying. Reinhold Publ. Corp., New York.
6. Proom, H., 1951. Freezing and drying. Inst. of Biology. London. 117.
7. Özkan, S., Türkyılmaz, B., Battal, İ., Aslantekin, F., Pelitli, T.S., 2011. Zoonotik Hastalıklar Hizmet İçi Eğitim Modülü. ISBN: 978-975-590-328-6, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 799, Ankara.
8. Kaya, S., 2006. Bruselloz ve tedavi sorunu. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection) 20 (3), 227-230
9. Laria, C., Ricciardi, F., Marano, F., Pulisi, G., Pappas, G., Cascio, A., 2006. Live nativity and brucellosis, Silicy. Emerging Infectious Diseases 12, 1-3.
10. Carrera, I. A., Rodriguez, M. J. L., SapHina, A. M., Lafuente, A. L., Sacristan, A. R. B., 2006. Probable transmission of brucellosis by breast milk. Journal of Tropical Pediatrics 52, 380-381.
11. Mendez, M. C., Jimenez, A. P., Blanco C.M., Chamiz, S., Mohedano, E., Plata, C., Baena, A.V., 2003. Brucellosis outbreak due to unpasteurized raw goat cheese (Spain). Euro surveillance 8, 421.

12. Harith M. S. Salih, "Brucellosis in Iraq epidemiology, present status, and challenges in controlling the disease", Master of science, Department of Diagnostic Medicine/Pathobiology College of Veterinary Medicine, Kansas State university, 2010.
13. Mosayebi, Z., Movahedian, A. H., Ghayomi, A., Kazemi, B., 2005. Congenital brucellosis in a preterm neonate. *Indian Paediatrics* 42, 599-601.
14. Alton, G. G., Jones, L. M., Pietz, D.E., 1975: laboratory techniques in brucellosis. Second ed. FAO/WHO monograph series. No. 55. Geneva
15. Nicoletti, P., 1980: The epidemiology of bovine brucellosis. *Advances in Veterinary Science & Comparative Medicine* 24, 69-97.
16. European Commission. 2001. Scientific committee on animal health and animal welfare. Brucellosis in Sheep and Goats (*Brucella melitensis*).
17. Robinson, A., 2003. Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance. FAO Animal Production and Health Paper 156. 1-46.
18. Hoover, D. L., Friedlander, A., M., 1997. Brucellosis in text book of Military Medicine, Medical aspects of chemical and biological warfare. Ed. Brig.Gen. R. Zajtchuk and R. F. Ballamy. 513-521.
19. Eschenbrenner, M., Wagner, M., A., Horn, T., A., 2002. Comparative proteome analysis of *Brucella melitensis* vaccine strain, 16 M. *Journal of Bacteriology* 184, 4962-4970.
20. Cengiz, M., "Bruselloz: 76 olgunun değerlendirilmesi ", Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, 2007.
21. Fatma, I., Yener, Z., 2008. Immunohistochemical detection of *Brucella melitensis* antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 803-806.
22. Altuğ, N., Özdemir, R., Cantekin, Z., 2013. Ruminantlarda koruyucu hekimlik: I. Aşı uygulamaları. *Erciyes üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 10(1), 33-44.
23. OIE. 2009. Caprine and Ovine brucellosis. Chapter 2. 7. 2. OIE Technical Manual.

24. Alton, G.G., Elberg, S.S., 1967. Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine, A review of ten years study. *Veterinary Bulletin* 37, 9793-9800.
25. Behroozikhah, A. M., Alamian, S., Pourahmadi, A., Moghadampour, M., 2009. Evaluation on stability process of *Brucella melitensis* - Rev. 1 vaccine in Iran. *Archives of Razi Institute*, Vol. 64, 2 87-92.
26. WHO, Technical report series 1971. Joint FAO/ WHO expert committee on brucellosis, 5th report. No. 484.
27. WHO. Joint FAO. 1984 WHO, expert committee on brucellosis, sixth report, Technical report, series, 14, Geneva.
28. WHO. 1997. The development of new/ improved brucellosis vaccines: report of WHO. Meeting WHO/ EMC/ ZD/ 98. 14.
29. Deqiu, S., Donglou, X., Jiming, Y., 2002. Epidemiology and control of brucellosis in China. *Veterinary Microbiology* 90,165-182.
30. Jones, L.M., Entessar, F., Ardalan, A., 1964. Comparison of living vaccine in producing immunity against natural *Brucella melitensis* infection in sheep and goats in Iran. *Computational and Mathematical Organization Theory* Vol.74,No: 1
31. Halkman, A.,Doğan, H.B., 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını. Sim Matbaası, Ankara 522 08. Bölüm
32. Adams, G. D., 2003. Lyophilization of vaccines: current trends. *Methods in Molecular Medicine* 87, 223-243.
33. Vansteenberghe, M. P., 1903. Precede de conservation a l'etat sec. *Cr. Seanc. Soc. Biol.*55, 1646-1647
34. Flosdorf, E.W., Mudd, S., 1935. Procedure and apparatus for preservation in the lyophilic form of serum and other biological substances. *The Journal of Immunology* 29, 389-425.
35. Meryman, H. T., 1966. *Freeze-Drying; Cryobiology*. Ed. H. T. Meryman. Academic Pres, London, New York.
36. Lapage, S. P., Shelton, E. S., Mitchell, T. G., Mackenzie, A. R., 1970. *Culture Collections and the Preservation of Bacteria*.

37. Sawada, T., 1975. Stability of Freze-Dried BCG Vaccine; Proceedings of the First Intersectional Congress of IAMS. Ed. T. Hasegawa. Vol 5. Business Center for Academic Societies Japan, Tokyo.
38. Cemeroglu, B., 1976. Gıda Maddelerinin Dondurarak Kurutulma Prensipleri. A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları No: 501. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
39. Harris, R. J. C., 1954. Biological applications of freezing and drying. Academic Press, Inc., New York, New York.
40. Heckly, R. J., Faunce, K., Elberg, S. S., 1959. Lyophilization of *Brucella melitensis*. The Naval Biological Laboratory, School of Public Health, and the Department of Bacteriology, University of California, Berkeley, California, 52-54
41. Stadhouders, J., Jansen L. A., Hup, G., 1969. Preservation of Starters and Mass Production of Starter Bacteria. Netherlands Milk and Dairy Journal 23, 182-199.
42. Tamime, A. Y., Robinson, R. K., 1976. Recent Developments in the Production and Preservation of Starter Cultures for Yogurt. Dairy Industries International 41 (11), 408-411.
43. Lievense, L. C., Verbeek, M. A. M., Noomen, A., vant Riet, K., 1994. Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. Applied Microbiology and Biotechnology 41, 90-94.
44. Font de Valdez, G., de Giori, G. S., de Ruiz Holgado, A. P., Oliver, G., 1983. Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjective to freeze-drying. Applied and Environmental Microbiology 45, 302-304.
45. Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H., Crowe, L. M., 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. Applied and Environmental Microbiology 61, 3592-3597.
46. Abadias, M., Benabarre, A., Teixó, N., Usall, J., Vinas, I., 2001. Effect of freeze-drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. The International Journal of Food Microbiology 65, 173-182.
47. Halkman, A. K., Akyol, E., Çavus, A., 1986. Liyofilizasyon süresinin yoğurt bakterilerinin canlılığı üzerine etkisi. Gıda 11 (2), 95-99.
48. Day, J.G., McLellan, M. R., 1995. Cryopreservation and freeze-drying protocols Vol. 38. ISBN: 0-89603-296-5, Humana pres, Totowa, New Jersey.

49. Pınarkara, Y., “Liyofilizasyon İşlemi Esnasında Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Canlılıkları Üzerine Kriyojenik Koruyucu Maddelerin Etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.
50. Thomas, A., Jennings, S., 1997. Effect of formulation on lyophilisation. Part 1, Technology Magazine1, IV 5 Article Index.
51. Alexander, R. A., van Drimmelen, G. C., 1956. The economy of immunizing cattle with freeze-dried brucella vaccine. South African Journal of Science 52, 216-219.
52. Ferry, R.M.,1995. The freeze-drying of bacteria and viruses; Methods in Molecular Biology 38, No.2.
53. Greaves, R., 1964. Fundamental aspects of freeze-drying bacterial and living cells. Aspects Theoriques et Industriels de la Lyophilisation, Rey L (ed), Paris, Herman, 410-412.
54. Drimmelen, C. V., Steyn, H., 1958. The Keeping Quality of Freeze-Dried *Brucella abortus* Strain 19 Vaccine 324-329.
55. Fry, R. M., 1951. Freezing and drying, Inst. Of Biology. London. 107-115.
56. Naylor, H. B., Smith, P. A., 1946. Factors affecting the viability of *Serratia marcescens* during dehydration and storage. Journal of Bacteriology 52, 565.
57. Verwey, W.F., Scheidy, S. F., 1946. Journal of the American Veterinary Medical Association.. 109, 362.
58. Bosgra, O., 1951. Tijdschrift v. Diergeneesk. 76, 281.
59. Thorne, A. L. C., 1953. British Veterinary Journal 109, 234.
60. Scheer, A. F. Van Der., 1955. Observations on the lyophilization of *Brucella abortus*, Strain 19. State Serum Institute, Rotterdam.
61. Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P., 2003. Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. Lait 83, 203-210.
62. Güngör, A. B., Kabaklı, Ö., Çalışkan, E., 2011. Attenuated mavidil serotype-4 vaccine's production with different stabilizers. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 22, 16-22.

63. Sourek, J., 1974. Long-term preservation by freeze-drying of pathogenic bacteria of the Czechoslovak National Collection of Type Cultures. International Journal of Systematic Bacteriology, Institute of Hygiene and Epidemiology, Prague, Czechoslovakia, Vol. 24, No. 3 358-365.
64. Kamaraj, G., Rajendra, L., Shankar, C. R., Srinivasan, V.A., 2010. Optimization of production of *Brucella abortus* S19 culture in bioreactor using soyabean casein digest medium. New Microbiologica 33, 319-328.
65. Gürgün, V., Halkman, A.K., 1988. Mikrobiyolojide sayım yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği YayınN: 7, Ankara, s. 7-10.
66. OIE.,2008. Terrestrial Manual Chapter 1.1.8. Principles of veterinary vaccine production 90-101.
67. Sparkes, J. D., Fenje P., 1972. The effect of residual moisture in lyophilized smallpox vaccine on its stability at different temperatures. Bulletin of the World Health Organization 46 (6), 729-734.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yusuf AVCIOĞLU

Doğum Yeri : Merkez / Şanlıurfa

Doğum Tarihi : 19.09.1985

Medeni Hali : Bekar

E Posta : y.avcioglu@dollvet.com.tr

Yabancı Dili: : İngilizce

Eğitim Durumu (Okul, Mezuniyet Yılı, Şehir)

Lise : Şanlıurfa Lisesi, 2002, Şanlıurfa

Lisans : Dicle Üniversitesi, 2008, Diyarbakır

Yüksek Lisans : Kilis 7 Aralık Üniversitesi (Devam ediyor), Kilis