

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***SALMONELLA* spp. KÖKENLERİNİN PATOGENEZ DETERMİNANTLARI
VE SALMONELLOZLARIN MOLEKÜLER TANISINDA KULLANIMLARI**

DENİZ AKSOY

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. ECE ŞEN

EDİRNE-2015

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.



Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ece ŞEN
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Ece ŞEN



Prof. Dr. Güven URAZ



Prof. Dr. Mehmet KAYA



Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA



Yrd. Doç. Dr. Mesut BOZ



Tarih: 11/12/2015

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.


11/12/2015

Deniz AKSOY

Doktora Tezi

Salmonella spp. Kökenlerinin Patogenez Determinantları ve Salmonellozların

Moleküler Tanısında Kullanımları

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışma, Edirne ilindeki tavuk karkaslarından izole edilmiş olan *Salmonella* izolatlarının patojenite fenotiplerinin saptanması ve patogenez determinantlarının belirlenmesi amacı ile yapılmıştır. Toplam 32 izolat bu çalışmaya dahil edilmiştir ve izolatlardan 26'sı Infantis, 4'ü Enteritidis, 1'er tanesi de Telaviv ve Kentucky serotiplerine dahildir. İzolatların tamamında kullandığımız antibiyotiklerden en az bir tanesine karşı direnç ve 26 tanesinde çoklu ilaç dirençliliği gözlemlenmiştir. Plazmid analizi sonuçlarına göre 6 izolatın, büyüklükleri 1.2-42.4 kb arasında değişen 1-3 plazmid taşıdığı saptanmıştır. Infantis serotipinden 6 ve Enteritidis serotipinden 4 tane olmak üzere toplam 10 izolatın *Caenorhabditis elegans* için patojen olmadığı, Infantis, Kentucky ve Telaviv serotiplerine ait izolatları içeren diğer 22 izolatın ise patojen olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). BALB/c fare model sisteminde ise, Infantis serotipinden 3 ve Enteritidis serotipinden 1 izolatın patojen olmadığı ve Kentucky, Telaviv ve Enteritidis serotipinden 1'er izolatın patojen olduğu tanımlanmıştır ($p < 0.05$). Plazmid giderme çalışmalarında antibiyotik direnci ile plazmidler arasında bir ilişkiye rastlanamazken plazmid kaybının *C. elegans*'ta patojenitenin azalmasına yol açtığı bulunmuştur. mRNA analizi çalışmalarında *fim* ve *stn* geninin fare ve nematod modelinin her ikisinde de eksprese edilmemiş, patojenite ile ilişkili olduğu bilinen *invA* geni ise sadece nematod modelinde eksprese edilmiştir. İki hayvan modeli sisteminde *Salmonella* izolatlarının patojenite fenotipleri ve virülans gen anlatımlarının farklı olduğu tespit edilmiştir. Tıbbi DNA tabanlı tanı kiti geliştirmek için hasta izolatlarının kullanılması gerekmektedir.

Yıl : 2015

Sayfa Sayısı : 118

Anahtar Kelimeler : *Salmonella*, antibiyotik direnci, plazmid, *Caenorhabditis elegans*, BALB/c fare, virülans, patogenez, *invA* geni.

Doctoral Thesis

Determinants of Pathogenesis of *Salmonella* spp. Isolates and Their Utilization in the
Molecular Diagnosis

Trakya University Institute of Natural Sciences

Biology Department

ABSTRACT

This study was performed in order to determine pathogenicity status and pathogenetic determinants of *Salmonella* isolates obtained from chicken carcasses in Edirne. A total of 32 isolates were included in the study and seotyping revealed that 26 of this isolates belonged to Infantis, 4 to Enteritidis and 1 to Telaviv and 1 to Kentucky serotypes. All isolates were found to have resistance to at least one of the antibiotics tested and 26 isolates showed multi-drug resistance. 6 isolates possessed 1-3 plasmids of sizes ranging from 1.2 to 42.4 kb. 10 of the isolates (6 of the serotype Infantis and 4 of Enteritidis) showed no pathogenicity in *Caenorhabditis elegans* nematode model whereas the other 22 isolates belonging to Infantis, Kentucky and Telaviv serotypes were pathogenic for nematodes ($p < 0.05$). On the other hand, 3 isolates from Infantis and 1 isolate from Enteritidis serotypes were pathogenic for BALB/c mice model system while 1 isolates of each of Kentucky, Telaviv and Enteritidis were pathogenic. ($p < 0.05$). 3 Infantis and 1 Enteritidis serotype were found to be non-pathogenic but 1 serotype of each of Kentucky, Telaviv and Enteritidis isolates was found to be pathogenic in mice ($p < 0.05$). In plasmid curing experiments, no relationship was found between antibiotic resistance and plasmid loss but plasmid curing led to a decrease in pathogenicity in *C. elegans* model. mRNA analyses showed that fimA and stn genes were not expressed in mice and nematodes however, invA gene which is related to pathogenicity, was expressed only in nematodes. Pathogenicity phenotypes and virulence gene expressions of *Salmonella* isolates were found to be different in the two animal model systems. Patient originated isolates are needed for development of DNA based diagnosis kit.

Year : 2015

Number of Pages : 118

Keywords : *Salmonella*, antibiotic resistance, plasmid, *Caenorhabditis elegans*, BALB/c mice, virulence, pathogenesis, invA gene.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince çalışmamın her aşamasında her türlü desteği sağlayan ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ece ŞEN'e (Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ABD),

Tez çalışmamın her aşamasını sabır ve ilgi ile takip eden ve bilgilerinden faydalandığım Tez izleme komitesinde yer alan değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA (Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik ABD) ve Yrd. Doç. Dr. Mesut BOZ'a (Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Organik Kimya ABD),

Çalışmalarımı huzurlu bir ortamda yapmamı sağlayan çalışma arkadaşım Uzman Biyolog Hatice SOYLU'ya, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili dostum Araş. Gör. Gazel Burcu AYDIN'a, Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nün değerli öğretim elemanlarına,

Her durumda yanımda olan, koşulsuz desteğini her zaman hissettiğim sevgili eşim Doç. Dr. Volkan AKSOY'a, bu günlere gelmemi sağlayan sevgili annem ve babam İlknur YÜKSEL ve Ahmet Hamdi YÜKSEL'e,

Doktora eğitimim süresince sağladığı doktora bursu ile destek olan ve akademik hayatıma devam etmemi sağlayan TÜBİTAK-BİDEB'e,

Tezime TÜBAP 2013-59 kodlu proje ile maddi destek sağlayan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
BÖLÜM 1: GİRİŞ	1
BÖLÜM 2: KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. <i>Salmonella</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	3
2.2. <i>Salmonella</i> Patogenezi	4
2.2.1. Bulaşma Yolları	4
2.2.2. Kolonizasyon	5
2.2.3. Konakçı Hücrelerinde İnvazyon	6
2.2.4. Makrofaj ve Dentritik Hücrelerde Hayatta Kalma.....	7
2.3. <i>Salmonella</i> 'nın Tiplendirilmesi	8
2.3.1. Fenotipik Metodlar.....	8
2.3.1.1. Serotiplendirme	8
2.3.1.2. Faj Tiplendirmesi	9
2.3.2. Moleküler Metodlar	9
2.3.2.1. Plazmid Tiplendirmesi	10
2.3.2.2. Dalgalı Alan Jel Elektroforezi (PFGE)	11
2.3.2.3. Ribotiplendirme	11
2.3.2.4. İnsersiyon Dizi (IS200) Analizi	11

2.3.2.5. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD).....	12
2.3.2.6. ERIC-PZR.....	12
2.4. <i>Salmonella</i> 'da Antibiyotik Dirençliliği	13
2.5. <i>Salmonella</i> Enfeksiyonları için Hayvan Modelleri.....	15
2.5.2. <i>Caenorhabditis elegans</i> Nematod Modeli Sistemi	17
BÖLÜM 3: MATERYAL VE METOD	21
3.1. Çalışmada Kullanılan <i>Salmonella</i> spp. İzolatlarının Özellikleri.....	21
3.2. <i>Salmonella</i> spp. İzolatlarının Serotiplendirilmesi	21
3.3. <i>Salmonella</i> spp. İzolatlarının Enterobakteriyel Tekrarlayan Genlerarası Uzlaşan Dizi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ERIC-PZR) ile Moleküler Karakterizasyonu.....	21
3.3.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	21
3.3.1.1. Bio Speedy Genomik DNA İzolasyon Kiti Prosedürü.....	22
3.3.1.2. Genomik DNA Konsantrasyonlarının Hesaplanması	22
3.3.2. ERIC-PZR.....	23
3.3.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi ve ERIC PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi.....	23
3.3.2.2. Bant Büyüklüklerinin Hesaplanması ve Dendogramın Oluşturulması	24
3.4. Plazmid Analizi.....	24
3.4.1. Plazmid DNA İzolasyonu	24
3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi ve Plazmid DNA' nın Görüntülenmesi.....	24
3.5. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	25
3.5.1. Disk Difüzyon Metodu.....	26
3.5.2. Mikrodilüsyon Metodu	27
3.6. <i>Caenorhabditis elegans</i> Modeli Sistem ile <i>Salmonella enterica</i> Serotiplerinin Patojenitelerinin Belirlenmesi	29
3.6.1. <i>Caenorhabditis elegans</i> 'ın Temini ve Stoklarının Hazırlanması	29
3.6.2. Bakteriyel Besin Kaynağının ve Nematod Üreme Besiyeri (NGM) Petri Plaklarının Hazırlanması.....	29

3.6.3. <i>Caenorhabditis elegans</i> N2 Eş Zamanlı L4 Larvaların Hazırlanması	29
3.6.4. <i>Caenorhabditis elegans</i> Patojenite Denemeleri	30
3.7. Plazmidlerin <i>Salmonella</i> suşları için <i>Caenorhabditis elegans</i> Patojenitesi ve Antibiyotik Duyarlılığındaki Rollerinin Araştırılması.....	31
3.7.1. Plazmidlerin Giderilmesi	31
3.7.2. Plazmidleri Giderilen İzolatlar ile <i>Caenorhabditis elegans</i> Model Sisteminde Patojenite Denemeleri	31
3.7.3. Plazmidleri Giderilen Suşların Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi.....	32
3.8. BALB/c Fare Denemeleri	32
3.8.1. BALB/c Fare Modelinde Denenecek İzolatların Seçimi	32
3.8.2. BALB/c Fare Modelinde Patojenite Denemeleri	33
3.8.3. BALB/c Farede Kolonizasyonun Belirlenmesi.....	34
3.9. Virülans Genlerinin Ekspresyonunun BALB/c Fare ve <i>Caenorhabditis elegans</i> Nematod Model Sisteminde Belirlenmesi	34
3.9.1. Total RNA İzolasyonu	34
3.9.2. Kan Örneklerinin Hazırlanması	34
3.9.3. <i>Caenorhabditis elegans</i> Geri Kazanım	34
3.9.4. Vivantis Total RNA Ekstarksiyon Kiti Prosedürü	35
3.9.5. cDNA Sentezi.....	36
3.9.6. Ters-Yön Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	36
BÖLÜM 4: SONUÇLAR	38
4.1. <i>Salmonella</i> spp. İzolatlarının Serotiplendirilmesi ve ERIC-PZR ile Moleküler Karakterizasyonu.....	38
4.2. Plazmid Analizi	42
4.3. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	43
4.4. <i>Caenorhabditis elegans</i> Patojenite Denemeleri	48

4.5. Plazmidlerin <i>Salmonella</i> suşları için <i>Caenorhabditis elegans</i> Patojenitesi ve Antibiyotik Duyarlılığındaki Rollerinin Araştırılması.....	51
4.6. BALB/c Fare Denemeleri	52
4.9. Virülans Genlerinin Ekspresyonunun BALB/c Fare ve <i>Caenorhabditis elegans</i> Nematod Model Sisteminde Belirlenmesi	58
BÖLÜM 5: TARTIŞMA	65
EKLER	75
KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ	117
TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER	118

SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

AMP	Ampisilin
aw	su aktivitesi
bç	Baz çifti
°C	Santigrat derece
CDC	Hastalık kontrol ve korunma merkezi
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
cfu	Koloni oluşturma birimi
CGC	<i>Caenorhabditis elegans</i> Genetic Center
CHL	Kloramfenikol
CIP	Siprofloksasin
cm	Santimetre
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
EtBr	Etidyum Bromid
g	Gram
gDNA	Genomik DNA
GEN	Gentamisin
I	Orta dirençli
ip	İntraperitonel
KAN	Kanamisin
kb	Kilobaz
kb	Kilobaz
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolisakkarit
M	Molarite
mg	Miligram
MIK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu

mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
μ L	Mikrolitre
N	Normalite
NAL	Nalidiksik asit
NEO	Neomisin
ng	Nanogram
NGM	Nematod Üreme Besiyeri
nm	Nanometre
PBS	Peptanlanmış su
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
R	Dirençli
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
RT-PZR	Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
S	Duyarlı
SAM	Ampisilin/Sulbaktam
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SFS	Serum fizyolojik su
SPI	Salmonella patojenite adası
STR	Streptomisin
SUL	Sulfonilamid
T3SS	Tip 3 salgı sistemi
TAE	Tris Asetat Etilen Diamin Tetraasetik Asit
TD	Ölüm zamanı
TE	Tris Etilen Diamin Tetraasetik Asit
TET	Tetrasiklin
TMP	Trimethoprim
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya sağlık örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>C. elegans</i> 'ın yaşam döngüsü.....	19
Şekil 3.1. Disk Difüzyon Metodu.....	27
Şekil 3.2. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonun Belirlenmesi.....	27
Şekil 4.1. ERIC-PZR Agaroz Jel Fotoğrafı.....	39
Şekil 4.2. ERIC-PZR bant profiline göre oluşturulan dendogram.....	41
Şekil 4.3. <i>Salmonella</i> izolatlarının plazmid profilleri.....	42
Şekil 4.4. <i>C. elegans</i> model sistem kullanılarak gerçekleştirilen sağkalım analizi sonucu hesaplanan TD50 verilerini içeren sütun grafiği.....	50
Şekil 4.5. Plazmid taşıyan ve plazmidi giderilen izolatların agaroz jel fotoğrafı.....	51
Şekil 4.6. Sağlıklı ve hastalık belirtisi gözlemlenen fare fotoğrafları.....	52
Şekil 4.7. 21 günlük deney süresince her bir deney grubu için sağkalım yüzdeleri..	53
Şekil 4.8.a. Deney süresince farelerin karaciğer dokularında belirlenen kolonizasyon miktarları.....	54
Şekil 4.8.b. Deney süresince farelerin dalak dokularında belirlenen kolonizasyon miktarları.....	54
Şekil 4.8.c. Deney süresince farelerin ince bağırsak dokularında belirlenen kolonizasyon miktarları.....	55
Şekil 4.8.d. Deney süresince farelerin kolon dokularında belirlenen kolonizasyon miktarları.....	55
Şekil 4.8.e. Deney süresince farelerin çekum dokularında belirlenen kolonizasyon miktarları.....	56
Şekil 4.9. Total RNA izolasyonu.....	59
Şekil 4.10. cDNA sentezi.....	60
Şekil 4.11.a. gDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı <i>invA</i> primeri ile gerçekleştirilen PZR...	61
Şekil 4.11.b. gDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı <i>fimA</i> primeri ile gerçekleştirilen PZR.....	61
Şekil 4.11.c. gDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı <i>stn</i> primeri ile gerçekleştirilen PZR.....	62

Şekil 4.12.a. cDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı invA primeri ile gerçekleştirilen RT-PZR.....	63
Şekil 4.12.b. cDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı fimA primeri ile gerçekleştirilen RT-PZR.....	64
Şekil 4.12.c. cDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı stn primeri ile gerçekleştirilen RT-PZR.....	64

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. ERIC primerlerinin özellikleri.....	23
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin özellikleri.....	25
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan antibiyotik stok solüsyonlarının ve disklerinin konsantrasyonları.....	26
Tablo 3.4. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Metodu'nda Kullanılan Antibiyotiklerin Mikroplakadaki Konsantrasyonları.....	28
Tablo 3.5. BALB/c Fare Denemesi için seçilen İzolatların Özellikleri.....	33
Tablo 3.6. Virülans Primerlerin Özellikleri.....	37
Tablo 4.1. <i>Salmonella</i> izolatlarının suş kodları ve dahil olduğu serotipler.....	38
Tablo 4.2. Plazmid taşıyan izolatların dahil olduğu serotipler, plazmid büyüklükleri ve antibiyotik direnç durumları.....	43
Tablo 4.3. <i>Salmonella</i> Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları (Disk Difüzyon Metodu).....	44
Tablo 4.4. <i>Salmonella</i> Suşlarının Antibiyotiklere Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları.....	46
Tablo 4.5. <i>Salmonella</i> serotiplerinin nematod sağkalım analizinde elde edilen TD50 değerleri.....	49
Tablo 4.6. Plazmid taşıyan ve plazmidi giderilen <i>Salmonella</i> izolatları kullanılarak gerçekleştirilen <i>C. elegans</i> patojenite denemeleri sonucunda elde edilen TD50 verileri.....	52
Tablo 4.7. Dokulardaki ortalama kolonizasyon.....	57
Tablo 4.8. <i>Salmonella</i> izolatlarının BALB/c fare model sisteminde ve <i>C. elegans</i> nematod model sisteminde belirlenen patojenite durumları.....	58
Tablo 4.9. İnvazyon geni (<i>invA</i>), fimbrial (<i>fimA</i>) ve enterotoksin (<i>stn</i>) genlerinin <i>C. elegans</i> nematod ve BALB/c fare model sistemde ekspresyon durumları.....	63

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Tifo dışı *Salmonella enterica* serotipleri ile kontamine gıdaların tüketiminin neden olduğu salmonellozlar, dünya çapında önemli gıda kökenli hastalıkların başında gelmekte ve her yıl ölümlerle sonuçlanabilen yüz binlerce vaka görülmektedir [1]. Bu durum mikrobiyal gıda güvenliğini önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir. Çeşitli hayvanların gastrointestinal sistemleri *Salmonella*'yı da içeren enterik patojenler için başlıca kaynaklar arasında yer almaktadır. Enfekte olmuş hayvanlar ile doğrudan temas *Salmonella* enfeksiyonlarına neden olabilmektedir fakat insanlarda görülen salmonelloz olgularının büyük bir çoğunluğu kontamine gıdaların tüketimi ile ilişkilidir [2, 3]. Özellikle kanatlı ürünleri insanlarda gıda kökenli patojen enfeksiyonları için başlıca rezervuardır ve salmonelloz salgınları için önemli bir risk grubudur [4, 5]. Tavuk eti başta olmak üzere çiğ veya az pişmiş kontamine kanatlı etlerinin tüketimi salmonelloza neden olabilmektedir. Bugüne kadar tavuk eti kaynaklı çeşitli salgınlar rapor edilmiştir [6, 7].

Salmonellozlar sadece olgu sayılarıyla değil aynı zamanda antimikrobiyal dirençli suşların artmasıyla da önemli bir halk sağlığı sorunu olarak ortaya çıkmaktadır. Antibiyotiklerin tıp ve veterinerlikte yaygın kullanımı nedeniyle antimikrobiyal dirençli varyant bakteriler gelişmektedir [8, 9]. Tedavi gerektirmeyen gastroenterit olgularının yanı sıra özellikle çocuklarda, yaşlılarda ve immun yetmezliği olan hastalarda ortaya çıkan invazif *Salmonella* spp. enfeksiyonlarında antimikrobiyal terapi önerilmektedir [10, 11].

Mikrobiyal patojenlerin tiplendirilmesi enfeksiyonların tanı, tedavi ve epidemiyolojik olarak izlenmesinde önemli rol oynamaktadır. İzolatlar, serotiplendirme ve antibiyotik direnç profilleri gibi fenotipik özelliklerine göre veya moleküler tiplendirme teknikleri kullanılarak genotipleme yöntemleriyle karakterize edilebilirler [12].

Tifo dıŖı *Salmonella* spp. kökenlerinin patojeniteleri fareden buzağıya kadar eŖitli hayvan modellerinde incelenmektedir ancak, bu omurgalı hayvan modelleri ile karŖılaŖtırıldıđında, omurgasız hayvan modeli ile alıŖmak bte, organizmanın basit yapısı, izlenebilir yaŖam süresi ve kolay üretilmesi gibi birok özellik dikkate alındığında ok daha avantajlı hale gelmektedir. Son yıllarda kullanılan omurgasız hayvan modellerinden birisi de serbest olarak yaŖayan ve bakteri ile beslenen bir toprak nematodu olan *Caenorhabditis elegans*'tır [13, 14].

Bu alıŖmada Edirne ilinde satıŖa sunulan tavuk etlerinden izole edilmiŖ olan *Salmonella enterica* izolatlarının fenotipik (serotiplendirme, antibiyotik diren profillerinin oluŖturulması) ve genotipik metodlarla (plazmid analizi, ERIC-PZR) populasyon yapısının incelenmesi, insan enfeksiyonlarındaki yerlerinin anlaŖılması iin potansiyel patojenitelerinin *C. elegans* nematod ve BALB/c fare modeli sistemlerinde karŖılaŖtırılarak belirlenmesi amalanmıŖtır.

BÖLÜM 2

KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Salmonella* Cinsinin Genel Özellikleri

Salmonella Enterobacteriaceae familyasına dahil, hareketli, Gram-negatif ve çubuk şeklinde bakterilerdir. *Salmonella* ilk kez 1880 yılında Ebert tarafından tanımlanmış ve 1884 yılında Gaffky tarafından kültürü yapılmıştır [15, 16].

Salmonella zor üreyen bir bakteri cinsi değildir ve konakçı haricinde çok çeşitli çevresel koşullarda çoğalabilirler. Gelişmek için sodyum klorüre ihtiyaç duymazlar fakat %0.4-4 NaCl varlığında gelişebilirler. Çoğu *Salmonella* serotipi 5-47°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilirken optimum üreme sıcaklığı 35-37°C'dir. Bununla birlikte yüksek ısıya duyarlı olup çoğunlukla 70°C ve üzeri sıcaklıklarda ölürlür. *Salmonella*'ların gelişebildikleri optimum pH aralığı 6.5 ile 7.5 olmasına rağmen 4-9 pH aralığında da çoğalabilirler. 0.99 ve 0.94 gibi yüksek su aktivitesine (aw) ihtiyaç duyarlar ve kuru gıdalarda olduğu gibi aw<0.2 olduğu durumlarda ölürlür [17, 18, 19].

Salmonella'lar Kauffmann-White şemasına göre *Salmonella* flagellar (H) antijeni, somatik (O) antijeni ve virulens (Vi) kapsüller (K) antijenleri olmak üzere 4 ana antijenik faktöre göre sınıflandırılmaktadır. Bu sistem 1934'te Uluslararası Mikrobiyologlar Birliği tarafından kabul edilmiştir [19, 20]. İlk önerilen sistemde bir tür-bir serotip yaklaşımı benimsenmiştir. Her bir serotip ayrı bir tür olarak tanımlanmıştır (örn. *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. pullorum*, ve *S. dublin* gibi). Günümüzde *Salmonella* cinsinin sınıflandırılmasında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (CDC) ve bazı diğer organizasyonlar tarafından da kullanılan sistem kullanılmaktadır. Buna göre *Salmonella* cinsi 16S rRNA dizi analizindeki farklılıklarına göre 2400'ün üzerinde serotip içeren, *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki türe ayrılmaktadır. *S. enterica* ise, *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) ve *S. enterica* subsp. *indica* (VI) olmak üzere altı alt türe ayrılmaktadır. Serotip isimleri ile tür isimleri

arasındaki farklılığı ortaya çıkarmak için serotip isimleri italik olarak yazılmamakta ve ilk harfleri büyük olarak yazılmaktadır [21, 22, 23]. Serotip isimleri genellikle serotipin ilk izole edildiği coğrafik bölgeye göre verilmektedir [24]. Serotipler ayrıca faj tiplendirmesi olarak da bilinen izolatların seçilen farklı bakteriyofajlara karşı duyarlılıklarını esas alan sınıflandırma sistemine göre de sınıflandırılmaktadır [18]. Faj tiplendirmesi genel olarak ortaya çıkan salgınların karakteristiğinin ve orjininin belirlenmesinde aynı serotipe sahip izolatların ayırımında kullanılmaktadır. Bu zamana kadar 200'den fazla faj tipi (DT) tanımlanmıştır [19, 25].

S. enterica serovarları geniş hayatta kalma çevresine sahip ve çapraz kontaminasyon yapabilen çeşitli gruplara ayrılmaktadır. *S. Typhi*, *S. Dublin* ve *S. Gallinarum* gibi *S. enterica* serovarları sınırlı konakçı aralığına sahiptir ve tipik olarak bir veya birkaç konakçı türü ile ilişkili iken *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* geniş konakçı yelpazesi gösterirler [26].

Enterik patojenler tüm dünyada yüksek olabilen morbidite ve mortalite oranına sahip olabilen mikroorganizmalardır. Dünyada 3 milyondan fazla ölümün Gram-negatif enterik patojenler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [27].

Salmonella enterik ateşi, bakteremi, enterokolit ve fokal enfeksiyonlar gibi çeşitli enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Enterokolit bunlar arasında en sık rastlananıdır. Bunu bakteremi ve fokal enfeksiyonlar takip etmektedir. Enterik ateşe *S. Typhi* ve *S. Paratyphi* başta olmak üzere nadiren diğer serotipler de neden olmaktadır. Yaklaşık olarak 2,000 serotip enterokolit ile ilişkili olarak belirlenmiş olmakla birlikte yaklaşık olarak 10 serotipin neden olduğu enfeksiyonlar çoğunluğu oluşturmaktadır: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, and *S. Heidelberg* [16,28].

2.2. *Salmonella* Patogenezi

2.2.1. Bulaşma Yolları

Salmonella doğada yaygın olarak bulunmaktadır ve çeşitli yiyeceklerde hayatta kalabilmektedir. Kümes hayvanları, yumurtalar ve mandıra ürünleri salmonelloz için en yaygın bulaşma yollarıdır. Ayrıca son yıllarda meyve ve sebzeler gibi taze ürünler de gıda üretim zincirinin herhangi bir aşamasında meydana gelen kontaminasyon sonucu bulaşma aracı haline gelebilmektedir [29]. *Salmonella* çevresel koşullarda uzun süre

hayatta kalabilmektedir ve böylece enfeksiyon kaynağı haline gelebilmektedir. *Salmonella*'lar kuşlar, böcekler ve sürüngenler gibi vektörlere geçebilmekte ve bu hayvanların dışkıları ile haftalarca hatta aylarca yayılımı devam edebilmektedir. Doğrudan bulaşmayı takiben domuz, inek ve tavuklar gibi hareketli hayvanlar enfeksiyon için risk faktörü haline gelmektedir. *Salmonella*'lar hayvan rezervuarlara kontamine olmuş çevreden veya yemlerden oral yolla geçmektedir. İnsanlar, hayvan rezervuarların kontamine ettiği suyun içilmesi veya gıdaların tüketilmesi sonucu *Salmonella* ile enfekte olurlar. Fakat zorunlu insan patojeni *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Paratyphi A' nın hayvan rezervuarı mevcut değildir ve doğrudan enfekte olmuş bireyler aracılığı ile bulaş söz konusudur [30]. Ayrıca *Salmonella*'nın üretim sürecinde gıdalara bulaşmasında sebzeler ve kullanılan ekipmanlar da önemli rol oynamaktadır. Bu şekilde kontamine olan gıdaların tüketimi salmonelloz için risk oluşturmaktadır. Ayrıca *Salmonella* kullanılan ekipmanlarda biyofilm oluşturabilmektedir ve bu şekilde çapraz kontaminasyonlar da meydana gelebilmektedir. Sonuç olarak *Salmonella*, çiftlik hayvanlarının beslenmesinde kullanılan yemlerden gıda üretim zincirine, satış hatta servis sırasında ve evde yemeklerin hazırlanması aşamalarının herhangi birinde geçebilmektedir [31].

2.2.2. Kolonizasyon

İnsanlarda ve hayvanlarda *Salmonella* enfeksiyonunun ilk basamağı *Salmonella*'nın fekal-oral yolla bulaşmasıdır ve genellikle kontamine su ve gıda ürünlerinin tüketimi ile olmaktadır [32].

Konakçıyı enfekte eden bakteri sindirim sisteminden geçmek zorundadır ve midedeki asidik ortamda hayatta kalabilmelidir. *Salmonella* bu gibi asidik ortamlarda RpoS-faktör, PhoPQ, Ada ve Fur gibi 50'den fazla asit şok proteinlerinin sentezini gerektiren "asit tolerans cevabı" olarak adlandırılan kompleks adaptif sistemleri sayesinde hayatta kalabilmektedir [26, 33, 34].

Mide bariyerini geçen bakteriler intestinal epitel hücrelerinde enterositlerin ve M hücreleri olarak adlandırılan özel epitel hücrelerinin invazyonu ile bağırsakta kolonize olmaktadır [32]. Böylece *Salmonella* ince bağırsak ve kolonu içeren gastrointestinal sistem organlarında ilerleyebilmektedir. Gastrointestinal sistem hücrelerini astarlayan epitel ve immün sistem hücreleri, bağırsakta *Salmonella* için ilk

koruyucu bariyeri oluşturmaktadır. *Salmonella* gastrointestinal sistemde kolonize olurken enterosit ve M hücreleri ile temasa geçebilmek için bağırsak mikroflorası ile rekabet etmektedir [35, 36]. *Salmonella*'nın gastrointestinal sistem epitel hücrelerine adezyonunu bakteri yüzeyinde bulunan fimbriya (kirpik) ve flagellar (kamçı) kolaylaştırmaktadır [16, 37]. Çalışmalar *Salmonella* serovarlarının konakçıya gastrointestinal sisteminde kolonizasyonu için korunumlu ve konakçı spesifik faktörlere sahip olduğunu göstermiştir [26, 38].

2.2.3. Konakçı Hücrelerinde İnvazyon

Salmonella'da invazyon ve hücre içinde hayatta kalmak için gerekli genler *Salmonella* patojenite adaları (SPIs) olarak adlandırılan kromozomal DNA bölgelerinde kümelenmiştir. SPI-1 ve SPI-2 bir multiprotein kompleksinden oluşan tip III salgı sistemini (T3SS) kodlamaktadır [39, 40].

Salmonella intestinal epitel hücrelerine tutunduğu zaman endotelial invazyonu sağlayan bir multiprotein kompleksi olan T3SS ifade edilir (Foley ve Lynne, 2008). T3SS bir "moleküler şırınga" (bakteriyel sitoplazma ve konakçı hücre membranı arasında kanal) olarak görev alır ve toksinleri ve diğer efektör proteinleri intestinal hücrelere aktarır. Ayrıca 20'den fazla yapısal ve regülatör protein ile ilişkilidir. InvJ, SpaO, PrgI/J, SipA/B/C/D, SptP, AvrA, SopA/B/D/E/E2, SlrP, ve SspH1 gibi çeşitli efektör proteinler de T3SS tarafından salgılanır [41, 42, 43]. T3SS mekanizması, *Salmonella* adhezyonu, invazyonu ve toksisitesi ile ilgili virülans genleri barındıran SPI-1 ile ilişkilidir [38]. T3SS tarafından konakçı intestinal epitel hücrelerine aktarılan efektör proteinler arasında SopB, salgı yolaklarının aktivasyonunda, inflamasyonu kolaylaştırmada ve diyareye neden olan hücrelerdeki iyon dengesinin değişiminde önemli rol oynamaktadır. SopA, SopD, SopE2 ve SipA gibi diğer yer değiştiren proteinlerin de *Salmonella* gastroenteritinde rol oynadığı bilinmektedir [44]. SipA, SipC ve SopB gibi efektör proteinler, hücre iskeletindeki aktin ile reaksiyona girerek membran dalgalanması olarak adlandırılan konakçı hücre membranının dışa doğru genişlemesine neden olmaktadır [42]. Bu süreç *Salmonella*'nın konakçı hücre tarafından yutulmasını ve "*Salmonella* içeren vakuoller" adı verilen yapı ile hücre içerisine alınmasını sağlar [45, 46]. *Salmonella* içeren vakuoller olgunlaştıkları zaman lümen sınırından bazal membrana doğru hareket ederler ve böylece fagolizomal süreçle

parçalanmaktan korunmuş olurlar. Bu vakuoller *Salmonella*'nın intestinal hücrelerde ve makrofajların içerisinde çoğalmasında anahtar rol oynamaktadır [47]. Daha sonra *Salmonella* SPI-2 tarafından kodlanan T3SS ifade edilmeye başlanır ve bu olay hücre içi patogenezin ve sistemik enfeksiyonun ortaya çıkması için oldukça önemlidir [48]. SPI-2 tarafından kodlanan T3SS'leri *Salmonella* içeren vakuollerde efektör proteinlerin salgılanmasından sorumludur ve salgılanan bu proteinler motor proteinlerle ve hücre iskeleti proteinleri ile etkileşime girerek *Salmonella* tarafından indüklenmiş ve vakuolün dışına açılan filamentlerin oluşumunu sağlarlar [49]. Ayrıca SPI-2 tarafından kodlanan T3SS *Salmonella* içeren vakuolün, lizozom tarafından parçalanmaktan kaçmasını da düzenlediği bildirilmiştir [50]. PipB, SpiC, SseF/G/I/J, SspH1/H2, SifA/B, SopD2, SlrP ve faj üzerinde taşınan SrfA/B/C/D/E/G/I/J/K/L/M gibi efektör proteinler de doğrudan SPI-2 tarafından kodlanan T3SS tarafından salgılanmaktadır [51]. *Salmonella* tarafından indüklenen filamentler *Salmonella* içeren vakuollerin hücredeki diğer veziküllerle füzyonuna olanak sağlamaktadır ve böylece *Salmonella*'nın vakuol içerisinde çoğalmasında önemli rol oynamaktadır [52]. Fakat bu filamentlerin *Salmonella* enfeksiyonundaki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [26, 36].

2.2.4. Makrofaj ve Dentritik Hücrelerde Hayatta Kalma

Az sayıda olguda *Salmonella* konakçı hücre içerisinde üreyerek immun cevaptan kaçabilmektedir ve bu durum invaziv ve sistemik enfeksiyona neden olmaktadır [35]. Salmonelloz olgularında bu gibi durumlar, *Salmonella* dentritik hücreleri ve makrofaj hücrelerini istila ettiği zaman ortaya çıkmaktadır. *Salmonella*'nın makrofajlar içerisinde çoğalabildiği bilinmektedir [53]. *Salmonella*'nın farklı immun sistem hücrelerinin içerisinde verdiği yanıtlardaki farklılıkların mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bu ayrımda çeşitli patojen ve konakçı faktörleri rol oynamaktadır [54]. Dentritik hücreler lenfoid ve lenfoid olmayan dokularda oldukça yaygın olarak bulunmaktadır ve *Salmonella*'nın konakçı vücudunda çeşitli organlara hızlıca yayılımını sağlamaktadır [55]. Araştırmacılar, SPI-2 tarafından kodlanan T3SS'nin dentritik hücrelerdeki antijen sunumunu baskılayabildiğini ve bu sayede konakçı immun sisteminin enfekte hücreler için oluşturduğu yanıtı sınırlandırdığını bulmuşlardır [51]. Genellikle *Salmonella*'nın insanlarda veya hayvanlarda enfeksiyona neden olabilmesi konakçı savunmasından kaçmasını sağlayan ve bu savunmayı etkisizleştiren virülans

genlerini kodlamasına ve ifade edebilmesine bağlıdır. Bu faktörler patojenite adaları, virülans plazmidleri, toksinler, fimbriyalar ve flagella ile ilişkilidir [26].

2.3. *Salmonella*'nın Tiplendirilmesi

2.3.1. Fenotipik Metodlar

Salmonella suşları arasındaki ilişkinin belirlenmesi salgınlardaki yayılmasının izlenmesi ve enfeksiyon kaynaklarının belirlenmesi için ön koşuldur. Biyokimyasal analizler aynı *S. enterica* alt türü olarak belirlenen bakteriler arasında daha ileri bir ayırım yapmadığı için diğer fenotipik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır [56].

2.3.1.1. Serotiplendirme

Salmonella serotiplendirmesi Kauffmann-White-Le Minor (KW) şemasının 1930'larda öne sürülen orijinalinin değiştirilmiş şekli esas alınarak gerçekleştirilmektedir [57]. Serotiplendirme bakterinin somatik (O) ve flagellar (H) antijenlerine göre tanımlanan çeşitli spesifik serumlar ile aglütinasyonu temel alınarak yapılmaktadır. Bu antijenler değişiklik göstermektedir, 64 çeşit O ve 114 çeşit H varyantı tanımlanmıştır. O antijeni bakteriyel yüzeydeki lipopolisakkaritin (LPS) sakkarit bileşenidir ve spesifik antiserumlarla reaksiyonu *Salmonella* serotiplendirme şemasının temelini oluşturmaktadır [58, 59, 60]. Çeşitli O antijenleri tek bir hücrenin yüzeyinde birlikte sentezlenmiş olabilir. Bunun aksine çoğu *Salmonella* suşu flagellar protein kodlayan genin iki farklı kopyasına sahiptir ve bu bakteriler aynı anda sadece tek bir flagellar proteini ifade eder [61]. Bu nedenle birçok izolat flagellar antijenler göz önüne alındığında difazik (faz I ve faz II ya da H1 ve H2) olarak adlandırılır. Monofazik *Salmonella*' lar nadir değildir fakat trifazik ve kuadrofazik alt tiplere nadir rastlanmaktadır [62]. Her ne kadar tek bir seferde sadece bir H antijeni ifade edilse de saf kültürlerde H1 ve H2 antijenleri birlikte bulunabilir. Çünkü bu iki faz aynı kültür veya kolonideki farklı bakteriyel popülasyonlar tarafından ifade edilebilir. Fakat bir H fazı belirlenemezse özel bir besiyerinde (örn. Sven Grad) spesifik antiserum yardımı ile dominant fazı inhibe eden ve böylece diğer H antijenini ifade eden bakteriyel popülasyonun çoğalmasına olanak tanıyan "faz inversiyonu" metodu kullanılır. Kolaylık olması açısından, bir suşta tanımlanan antijenler alttür numarasını takiben O,

H1 ve H2'nin kullanıldığı bir formül ile gösterilir (örneğin, I 6,7,14:r:1,2). Geçmişte ortak antijenik formülü sergileyen *Salmonella* izolatlarına aynı serovar adı verilmekteydi. Fakat daha sonra aynı antijenik formüle sahip bazı suşların farklı biyokimyasal profillere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum farklı alt tür isimlendirmesi ile aşılmıştır. Bu nedenle serotiplendirme alt türlerdeki alt tipleri (serovar veya serotip) tanımlamaktadır [58, 63]. Günümüze kadar 2500' ün üzerinde *Salmonella* serotipi tanımlanmıştır. Serolojik analizler *Salmonella*'nın epidemiyolojik olarak incelenmesinde ilk basamak olarak kullanılmaktadır ve nadir serotipler ile ilişkili epidemiyolojik araştırmalar için elverişli bir metoddur [64].

2.3.1.2. Faj Tiplendirmesi

Faj tiplendirmesi aynı serotipe dahil *Salmonella* suşlarının ayrımı için kullanılmaktadır. Faj tipleri farklı bakteriyofajlar tarafından liziz duyarlılıklarına göre belirlenmektedir [65]. Bu metodun avantajı uygulanabilirliğindeki basitlik ve temel laboratuvar ekipmanlarıyla yapılabilmesidir. Fakat elde edilen sonuçların yorumlanması tecrübe gerektirmektedir ve her zaman tam anlamıyla tekrar edilemez [66]. Faj tiplendirmesi, faj reaksiyonu şekilleri çok bilinmeyen izolatların karakterizasyonunda kullanılan etkili bir metoddur. Her ne kadar bu yöntem aynı faj tiplerinin araştırılmasında uygun olmasa da, izolatlar arasındaki ilişkinin belirlenmesinde kullanışlı bir yöntemdir [63].

2.3.2. Moleküler Metodlar

Mikrobiyal patojenlerin tiplendirilmesi veya bakterilerin suş seviyesinde tanımlanması, bakteriyel infeksiyonların tanı, tedavi ve epidemiyolojik olarak izlenmesinde özellikle önemli rol oynamaktadır. Ayrıca suş tiplendirme bakteriyal popülasyonların dinamiklerinin çalışmasında da kullanım alanlarına sahiptir. Fenotipik metodların eksikliklerinin (fazla zaman harcanması, yakın suşlar arasındaki ayrımın tam olarak sağlanamaması vb.) giderilmesi açısından çeşitli DNA temelli teknikler geliştirilmiştir [67, 68].

2.3.2.1. Plazmid Tiplendirmesi

Plazmidler içinde buldukları konakçı hücreden bağımsız bir şekilde replike olabilen çevrimsel ekstra kromozomal DNA fragmentleridir. Neredeyse tüm bakteri türlerinde bulunurlar ve çeşitli büyüklüklere sahiptirler [69]. Plazmidler bakteriyel populasyonlar arasında aktarılabiltirler, farklı genlerin kazanımı ve kaybedilmesi ile bakteriyel genetik çeşitliliğin artmasına katkıda bulunurlar [70].

Salmonella enterica büyüklükleri 1 kb'dan başlayan 200 kb'ın üzerine çıkabilen farklı büyüklükte plazmidlere sahiptir. Bunlardan en iyi tanımlanmış olan grup serovar Enteritidis, Typhimurium, Dublin, Choleraesuis, Gallinarum, Pullorum ve Abortusovis' te bulunan (50-100 kb büyüklükte) virülans plazmidleridir. Bu plazmidlerin tamamı *Salmonella'* nın makrofaj içerisinde canlı kalmasını sağlayan *spvRABCD* genlerini kodlamaktadır. Serovar spesifik virülans plazmidlerinin yanı sıra *Salmonella* antibiyotik direnç genleri taşıyabilen ve bunların aktarılmasında rol oynayan büyük moleküler ağırlıklı plazmidler ve fonksiyonları bilinmeyen büyüklükleri 20 kb'ın altında olan küçük plazmidler de taşımaktadır. *Salmonella'*nın sahip olduğu plazmidler virülans faktörleri, antibiyotiklere, ağır metallere, fajlara karşı direnç ve farklı karbon kaynaklarının kullanımı gibi önemli özellikleri taşımaları bakımından oldukça önemlidir [71]. Plazmid tiplendirmesi aynı suşa sahip izolatların tiplendirilmesinde hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedir. Ekstra kromozomal elementlerin büyüklükleri, stabiliteleri, geniş yayılımları ve doğal farklılıkları bu metodu tüm bakteriler için kullanışlı hale getirmektedir [72]. Plazmid analizi mikrobiyal tiplendirme metodu olarak kullanılan ilk moleküler tekniktir [73]. Plazmid DNA'sının izolasyonu ve farklı büyüklükteki plazmidlerin agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmesi kolay bir yöntemdir. İzolatlar arasındaki aynı epidemik suşlar aynı büyüklükteki plazmidlere sahip olacaklardır. Fakat bu test en azından bir plazmid profilinin bulunması gereklidir. Daha kesin sonuçlar için izole edilen plazmid DNA restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek parçalar agaroz jel elektroforezinde analiz edilmesi ile elde edilebilir. Aynı plazmidlerin aynı restriksiyon profili oluşturması gerekir [74].

2.3.2.2. Dalgalı Alan Jel Elektrofrez (PFGE)

Dalgalı alan jel elektrofrezinin prensibi 1984 yılında Schwartz ve Cantor tarafından geliştirilmiştir ve o günden günümüze yüksek ayırım gücü dolayısıyla Gram pozitif, Gram negatif bakteriler ve diğer fungal mikroorganizmalar olmak üzere farklı patojenlerin genetik ve epidemiyolojik analiz araştırmalarında sıklıkla kullanılan bir metoddur [75]. 1990'larda *Salmonella*'nın moleküler tiplendirilmesinde kullanılmak üzere adapte edilmiştir [76, 77, 78, 79]. Bu teknik, salgın durumlarında suşların parmak izlerinin oluşturulması için oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Birçok çalışmada PFGE'nin farklı serovarlar için *Salmonella* enfeksiyonların kayanağının belirlenmesinde yüksek ayırım gücüne sahip bir metod olduğu belirlenmiştir [80, 81, 82]. Bunun yanı sıra bu metod işgücü yönünden yoğun, zaman gerektiren ve ayrıca farklı serovarlarda eşit duyarlılıkla çalışmayan bir metoddur [83, 84]. Ancak PFGE, salgın durumlarında *Salmonella* izolatlarının parmak izlerinin oluşturulmasında kullanılan en eski DNA tiplendirme sistemlerinden biridir ve *Salmonella*'nın moleküler tiplendirilmesinde altın standart olarak bilinmektedir [84].

2.3.2.3. Ribotiplendirme

Ribotiplendirme metodu bakterilerin ribozomal RNA farklılıklarına göre sınıflandırılmasını ve tanımlanmasını sağlayan bir metoddur. 16S ve 23S rRNA dizileri ile hibridizasyon esasına dayanan teknik ilk olarak bakteriyel suşlar arasındaki taksonomik ilişkiyi belirlemede kullanılmıştır [85]. *Salmonella*'da serovarlar arasındaki ilişkiyi belirlemede kullanılmaktadır [86, 87]. Ribotiplendirme düşük ayırım gücüne sahiptir ve genellikle salgın araştırmalarında kullanılmamaktadır [88].

2.3.2.4. İnsersiyon Dizi (IS200) Analizi

IS200 *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Actinobacillus* ve *Helicobacter* gibi çeşitli bakteri cinslerinde bulunan hareketli elementtir. IS200 elementi oldukça kısadır (707-711 bç) ve tek gen içermektedir. Tipik hareketli elementlerin aksine IS200 transpozazları nadirdir. Doğal bakteri popülasyonlarındaki IS200 elementinin sayısı ve dağılımı sabittir. Bu stabilite IS200 elementini epidemiyolojik ve ekolojik çalışmalarda kullanılması için uygun bir

moleküler belirteç haline getirmektedir. IS200 tiplendirmesi *Salmonella* izolatları arasında moleküler ilişkiyi değerlendirmek için kullanılmaktadır. *Salmonella enterica*'da IS200 parmak izi yaygın olarak suş ayırımında kullanılmaktadır. *Salmonella* kromozomunda 708 bç uzunluğunda çoklu kopya sayısına sahip insersiyon dizileridir [89]. Parçalanmış kromozomal DNA'nın IS200 probu ile hibridizasyonu çeşitli *Salmonella* serotiplerinin klonal ayırımında kullanılmak için uygun bir metoddur. Fakat *S. Enteritidis*, *S. Typhi* ve diğer serotipler için faj tiplerinin ayırımında kullanılmamaktadır [90]. Çoklu ilaç dirençli *S. Typhimurium* DT204c ve 193 tipleri gibi Amerika'da yaygın olan faj tiplerinde suş ayırımında kullanılabilirliğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [91].

2.3.2.5. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

Bu teknik ilk olarak Williams ve ark. ve Welsh ve McClelland tarafından tanımlanmıştır [92, 93]. Genomik DNA'yı kalıp olarak kullanarak kısa diziye sahip primerler ile (8-12 nükleotid) rastgele DNA parçalarının çoğaltılmasını sağlayan bir PZR metodudur. Geleneksel bir PZR tekniği değildir çünkü hedef patojen üzerinde spesifik bir DNA dizisinin bilinmesine ihtiyaç duymaz. PZR reaksiyonunun spesifikliği primerlerin dizilerine ve kullanılan bağlanma sıcaklığına dayanmaktadır. Suşların tiplendirilmesi PZR sonucu çoğaltılan fragment sayısına ve büyüklüğüne göre yapılmaktadır [92]. Yapılan çalışmalarda *Salmonella* serovarları arasında serovar düzeyinde ayırım yapılmasında başarılı bir teknik olduğu bildirilmiştir [94, 95, 96]. Bu metodun avantajı kolay ve geniş ölçüde uygulanabilir olması ve genom hakkında ön bir bilgiye ihtiyaç duyulmamasıdır. Fakat bu metodun dezavantajı ise tekrar edilebilirliğinin düşük olması ve oluşan farklı paternler arasındaki ilişkinin kurulamamasıdır [88].

2.3.2.6. ERIC-PZR

Enterobacteriaceae genomu "Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus" (ERIC) olarak adlandırılan tekrarlı diziler içerir ve bu diziler bakterilerin genetik analizinde ve tanımlanmasında kullanılırlar. ERIC dizileri ilk olarak *E. coli* ve *Salmonella*'da tanımlanmış olan genom üzerinde transkribe edilen bölgeler ile

sınırlandırılmış 126 bç uzunluğunda bölgelerdir. ERIC-PZR metodu bakteriyel genomda spesifik bölgelere özgü primerlerin kullanılmasını esas alan PZR temelli ve aynı türe sahip yakın ilişkili suşların ve serovarların ayırımında kullanılan bir yöntemdir. Farklı suşlarda bu elementlerin sayıları ve lokasyonları farklı uzunlukta DNA fragmentlerinin oluşmasına neden olur [97, 98]. Van Lith ve Aarts 61 farklı *Salmonella* serotipi ile yaptıkları çalışmalarında, tekrarlarında elde ettikleri profillerde varyasyonlar olmasına rağmen ERIC-PZR metodunun *Salmonella* tiplendirmesinde serotip seviyesinde ayırım elde etmişlerdir [99]. Benzer sonuçlar daha sonra yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir [100, 101]. Diğer moleküler tiplendirme metodlarıyla karşılaştırıldığında düşük maliyetli oluşu ve basitliği *Salmonella* serovarlarının analizi ve birçok enterobakterler için kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır [102, 103, 104].

2.4. *Salmonella*'da Antibiyotik Dirençliliği

Tifo dışı *Salmonella* serotiplerinde antimikrobiyal direnç evrensel bir problem haline gelmiştir. Sürveyans verileri *Salmonella*'lardaki antimikrobiyal direncin bazı ülkelerde 1990'ların başından bu zamana kadar %20-30'lardan %70'lere kadar yükseldiğini göstermektedir. Bu direnç oranı farklı serotiplere ve antibiyotiklere göre değişiklik göstermektedir [105].

Antimikrobiyal ajanların tıpta ve veterinerlikte tedavi amaçlı kullanımları ve gıda olarak tüketilen hayvanlarda büyüme artırıcı olarak bilinçsizce kullanımı antimikrobiyal direncin *Salmonella* ve diğer patojenlerde hareketli genetik elementler aracılığı ile yayılmasına neden olmaktadır [29]. Direnç hayvan, su ve kontamine gıdalar gibi kaynaklardan insanlara geçebilmektedir. Çoklu ilaç dirençli *Salmonella* suşları halk sağlığı açısından oldukça önemlidir ve araştırmacılar Agona, Anatum, Pullorum, Schwarzengrund, Choleraesuis, Derby, Dublin, Heidelberg, Kentucky, Newport, Senftenberg, Typhimurium, ve Uganda gibi farklı *Salmonella* serovarlarının çoklu ilaç dirençli suşlarının ortaya çıktığını göstermişlerdir [106, 107, 108]. Çoklu ilaç dirençliliği gösteren en bilinen *Salmonella* serotipi *S. Typhimurium* DT104' tür ve ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sulfonamid ve tetrasikline (ACSSuT) karşı dirençlidir. Bu antibiyotikler veterinerlikte yaygın olarak kullanılan ilaç sınıflarına dahildir [109]. Ayrıca *S. Typhi*, *S. Infantis*, *S. Paratyphi*, *S. Agona*, *S. Uganda*, ve *S.*

Newport, S. Heidelberg, S. Hadar ise *S. Typhimurium*' a ek olarak çoklu ilaç dirençliliği gözlemlenmiş olan diğer serotiplerdir [110, 111, 112].

Dirençli patojenlerin ve direnç genlerinin gıda olarak tüketilen hayvanlardan insanlara geçmesi enfeksiyonların tedavisi açısından ciddi sorunlara neden olmaktadır. Gıda olarak tüketilen hayvanlarda kullanılan tetrasiklinleri, sefalosporinleri ve florokinolonları içeren çoğu antibiyotik insanlarda da tedavi amaçla kullanılan ilaçlarla ilişkili ya da aynıdır. Bu durum sonucu ortaya çıkan direnç genlerinin çoğunlukla tek bir antibiyotik yerine antimikrobiyal sınıfa dahil bütün antibiyotiklere direnç kodlaması ve bazı genlerin çapraz dirence neden olması sorunlara neden olmaktadır. Ayrıca hareketli DNA elementleri genellikle çeşitli direnç genleri taşımaktadır, tek bir hareketli genetik elementin kazanımı çoklu antibiyotik direncine neden olabilmektedir ve sadece bir antimikrobiyalin ilaç olarak kullanıldığı durumlarda bu çoklu ilaç dirençliliği büyük bir problem olarak ortaya çıkmaktadır [113, 114, 115, 116].

Antimikrobiyal ajanların klinik tedavilerde ve hayvan çiftliklerinde kullanılmaya başlanması 20.yy'ın en önemli kazanımlarından biridir. İlk antimikrobiyal ajan 1930'larda tanımlanmıştır ve devam eden süreçte çok sayıda yeni bileşik keşfedilmiştir. Fakat bundan kısa bir süre sonra antimikrobiyallere direnç ortaya çıkmaya başlamıştır ve bu durumu yeni antimikrobiyal bileşiklere karşı direnç takip etmiştir [117]. Günümüzde antimikrobiyallere direnç insan ve hayvan sağlığını tehdit eden önemli bir durum haline gelmiştir. Modern hayvan üretimi hastalıkların kontrolü için yüksek miktarlarda antibiyotiklerin kullanımı esasına dayanmaktadır. Antibiyotiklerin hayvanlarda büyümeyi hızlandırmak için yem katkısı olarak kullanılmasının yanı sıra hayvan yetiştiriciliğinde ve veterinerlikte kullanımı insanlarda ve hayvanlarda hastalığa neden olan antimikrobiyal dirençli bakterilerin seçilmesi ve yayılması için seçici koşulları ortaya çıkarmaktadır. Gıda olarak tüketilen hayvanların ve hayvan orjinli gıdaların dünya çapında ticaretinin yapılması tek bir ülkede ortaya çıkan antimikrobiyallere direncin tüm dünya için problem olmasına neden olmaktadır. Bu durum antimikrobiyallere karşı direncin tüm ülkelerde izlenmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır [118].

Gıda ve insan kaynaklı *Salmonella* izolatlarında artan miktarlarda antimikrobiyallere direnç ve çoklu antibiyotik direnci gösteren *S. enterica*'ya dahil farklı serotipler, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde oldukça yaygındır. Bu suşların çoğu

zoonotik kökenlidir ve gıda zinciri yolu ile insanlara geçmekte ve enfeksiyonlara neden olmaktadır [119]. Çoğu enfeksiyon kendini sınırlayan diyare ile sonuçlanmaktadır ve antimikrobiyal terapiye ihtiyaç duyulmamaktadır. Fakat bunun yanı sıra özellikle çocuklarda, yaşlılarda ve immun yetmezliği olan hastalarda ortaya çıkan invazif *Salmonella* enfeksiyonlarında antimikrobiyal terapi önerilmektedir. *Salmonella* enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotikler ampisilin, trimethoprim sulfametaksazol, florokinolonları ve üçüncü kuşak sefalosporinleri içermektedir. Ampisilin ve trimethoprim sulfametaksazole karşı gözlemlenen direnç etkinliklerini düşürmektedir ve florokinolonlar çocuklarda kullanım için önerilmemektedir. Bu nedenle geniş etki spektrumuna sahip sefalosporinler çocuklarda gözlemlenen invazif enfeksiyonlarda tercih edilen ilaç seçeneği haline gelmiştir. Geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli *Salmonella* türlerinin ortaya çıkması dünya çapında sorun yaratmaktadır [11, 120].

Salgınlar veya sporadik olarak ortaya çıkan salmonelloz olguları üzerinde yapılan çalışmalarda antimikrobiyal direnç ile enfeksiyonun şiddeti arasındaki ilişki ortaya çıkarılmıştır. Holmberg ve ark., 1971 ve 1983 yılları arasında Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) kayıtlı *Salmonella* salgınları ile yapılan çalışmalarda antimikrobiyallere dirençli *Salmonella* ile enfekte olmuş hastalarda ölüm oranının (% 4.2) antimikrobiyallere duyarlı enfeksiyonlara oranla (% 0.2) daha yüksek olduğunu belirlemiştir [121]. Daha sonra 1971 ve 1980 yılları arasında meydana gelen halk kaynaklı ve nazokomiyal antibiyotiklere dirençli *Salmonella*'ların neden olduğu salgınlarda ölüm oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca halk salgınlарının neden olduğu vakalar arasında da dirençli salmonelloz vakalarında hastanede yatarak tedavi oranı % 57 iken duyarlı suşların neden olduğu vakalarda bu oran % 24.5' te kalmaktadır [122]. 1984 ve 2002 yılları arasında meydana gelen 24 epidemide de dirençli *Salmonella*'ların neden olduğu salgınlarda duyarlı *Salmonella*'ların neden olduğu salgınlara oranla daha yüksek hastanede yatarak tedavi oranı olduğu gözlemlenmiştir [116, 123].

2.5. *Salmonella* Enfeksiyonları için Hayvan Modelleri

Tifo dışı gastroenterit, tifo dışı bakteremi ve tifo ateşinin neden olduğu dünya çapında ölümler oldukça fazla sayıdadır ve bu hastalıkların patogenezi, bağışıklık ve aşı geliştirme çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda florokinolona direnci de

içeren çoklu ilaç dirençli *Salmonella* Typhi ve siprofloksasin ve geniş spektrumlu sefaloprinleri de içeren, çoklu ilaç dirençli tifo dışı *Salmonella* serotipleri tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. Tüm bu veriler elverişli hayvan modellerinin kullanılması ihtiyacını doğurmaktadır. Virülans, in vivo çalışmalarda konakçı patojen etkileşimlerinin anlaşılabilirdiği oldukça kompleks fenotiplere sahiptir. Hayvanlardaki doğal enfeksiyonun çalışılması *Salmonella* patogenezinin tamamen anlaşılması için oldukça önemlidir. *Salmonella* patogenezi, bağışıklığı ve aşı geliştirme çalışmaları için fareden buzağıya kadar çeşitli hayvan modelleri kullanılmaktadır [13, 124].

2.5.1. Fare Model Sistemi

1892 yılında Friedrich Loeffler, *Bacillus typhimurium* (şimdi *S. Typhimurium*) olarak adlandırılan ve farelerde bulaşıcı, tifo ateşi benzeri bir hastalığa neden olan bir patojen izole etmiştir [125]. Fareler *S. Typhimurium* ile enfekte olduğu zaman gastroenterit gelişmemektedir fakat hepatomegali ve splenomegali ile sonuçlanan karaciğer ve dalakta bakteriyel kolonizasyon ile karakterize edilen sistemik bir hastalığa neden olmaktadır [126]. İnce bağırsak patolojisinde, ölmek üzere olan hayvanlarda Peyer plaklarının çevresinde ülserleşme, kanama, kapiler tromboz, foliküler ve doku büyümesi ile birlikte mononükleer lökosit sızıntısı görülmektedir [127]. C57BL/6 fareler ve BALB/c fareler gibi bazı fare soyları, *Slc11a1* genindeki nokta mutasyonunun neden olduğu fagozomal makrofaj membranında "makrofaj proteini ile ilişkili doğal direnç" olarak adlandırılan fonksiyonel olmayan demir proteininin ifade edilmesi sonucu, letal *S. Typhimurium* enfeksiyonuna karşı genetik olarak duyarlıdırlar [128]. *S. Typhimurium* ayrıca CBA fareler ve 129sv fareler gibi *Slc11a1* aleline sahip olan genetik olarak hastalığa dirençli fare soylarında da karaciğer ve dalakta kolonize olabilmektedir. Ayrıca genetik olarak dirençli fareler tipik olarak sistemik bölgelerde bakteriyel çoğalmayı kontrol etmektedir ve dolayısıyla bu durum hastalığın çeşitli belirtilerinin ortaya çıkmasını engellemektedir [13].

Genetik olarak duyarlı hayvanların fare tifo modeli olarak kullanımları 1980'ler ve 1990' ların başlarında *Salmonella* patogenezi, bağışıklığı ve aşı geliştirme çalışmalarında yoğun olarak çalışılmaya başlanmıştır. Örneğin; Bruce Stocker ve ark., *S. Typhimurium aroA* mutantının farelerde atenüe ve bağışıklık sağlayıcı olduğunu keşfetmişlerdir ve bu bulgu insanlar için yeni, canlı *S. Typhi* aşılarının geliştirilmesine

yol açmıştır [129, 130, 131]. Pietro Mastroeni ve ark., fare tifo modelini, *S. Typhimurium* enfeksiyonunda bağışıklık için antikorların ve CD4_ T hücrelerinin birlikte de gerekli olduğunu bulmak için kullanmışlardır ve bu prensip halen aşı çalışmaları için öncülük etmektedir [132, 133]. Paul Gulig and Roy Curtiss III fare tifo modellerinde plazmidi giderilmiş *S. Typhimurium* suşları ile yaptıkları çalışmalarında *Salmonella* plazmid virülans (*spv*) operonunun virülans için gerekli olduğunu bulmuşlardır [134]. Son olarak, Michael Hensel, David Holden ve ark., SPI-2 tarafından kodlanan tip III salgı sistemindeki (T3SS-2) virülans genlerini tanımlamışlardır ve devam eden çalışmada Eduardo Groisman T3SS-2'nin *S. Typhimurium*'un konakçı makrofajlarında canlı kalmasını sağladığını bulmuşlardır [135, 136]. Ayrıca, genetik olarak dirençli fare soylarını kullanarak yaptıkları çalışmalarda, dokularda kronik taşımının mekanizmasının aydınlatılması bir çığır açmıştır [137, 138, 139]. Genetik olarak dirençli fare soyları intestinal kalıcılığın mekanizmalarının çalışılmasında ve *S. Typhimurium* bulaşması için fare model sistemi geliştirilmesinde kullanılmaktadır [140, 141, 142]. Son olarak, John Gunn ve Brett Finlay laboratuvarı tifo ateşinin bulaşmasında önemli bir rezervuar olan safra kesesi kolonizasyonunu araştırmak için fırsat sağlayacak bir fare modeli geliştirmişlerdir [143, 144].

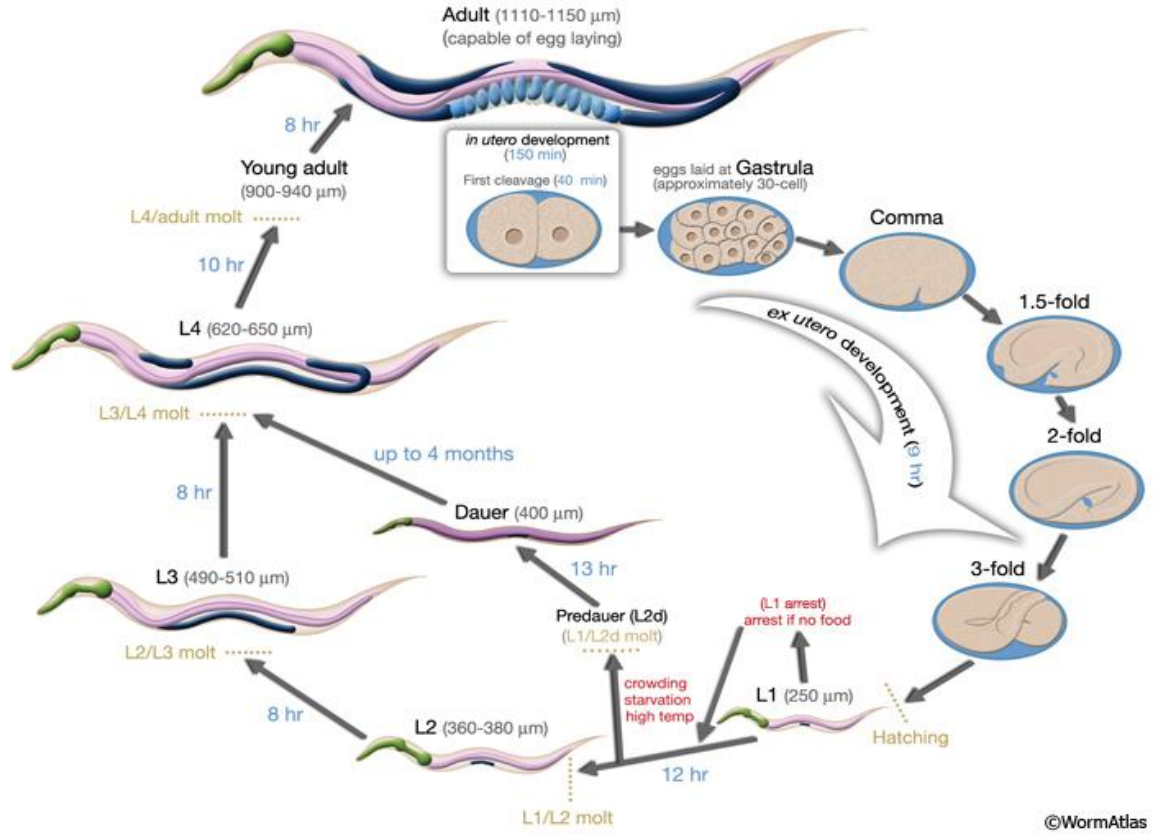
Ayrıca fare modeli sisteminin, tifo dışı *Salmonella* serotiplerinin neden olduğu enfeksiyonun patogenezinin aydınlatılmasında da yenilikçi kullanımları devam etmektedir. Swearingen ve ark., tifoidal ve tifo dışı *Salmonella* serovarlarını içeren 32 *Salmonella* suşunun virülansını belirlemek için BALB/c fare model sistemini kullanmışlardır [145]. Suez ve ark., 12 tifo dışı *Salmonella* serovarının virülans ile ilişkili fenotiplerinin belirlenmesinde fare model sistemi ile in vitro doku kültürü arasındaki farklılıklarının belirlenmesinde C3H/HeN ve BALB/c fare modeli sistemlerini kullanmışlardır [146].

2.5.2. *Caenorhabditis elegans* Nematod Modeli Sistemi

Caenorhabditis elegans küçük, serbest yaşayan, öncelikle bakteriler olmak üzere mikroorganizmalarla beslenerek hayatta kalan ve dünyanın çeşitli bölgelerinde yaşayan toprak nematodudur. Sydney Brenner tarafından tanımlanmasının ardından genomik, hücre biyolojisi, sinir bilimini içeren çeşitli alanlarda biyolojik araştırmalar için önemli bir model sistem olarak kullanılmaktadır. Kısa hayat döngüsü, yoğun genomu, kolay

çoğaltılması ve küçük boyutu çalışmalarda çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Yetişkin nematod anatomik olarak oldukça basittir ve yaklaşık olarak 1000 somatik hücreden oluşmaktadır. *C. elegans* uygun koşullar altında yaklaşık 3 günlük bir yaşam döngüsüne sahiptir. Nematod laboratuvar koşullarında agar plakalarda veya sıvı kültürlerde *E. coli*'yi gıda kaynağı olarak kullanarak yaşamını sürdürebilmektedir. Yaşam döngüsü boyunca şeffaf olması canlı preparatlarda DIC mikroskobu kullanılarak hücresel seviyede inceleme yapmayı mümkün kılmaktadır. Nematod elektron mikroskobu seviyesinde anatomik olarak incelenmiştir [147, 148, 149].

C. elegans'ın yaşam döngüsü diğer nematodlara benzer olarak embriyonik dönem, dört larval evre (L1-L4) ve erginden oluşmuştur. Her bir larval evrenin sonu deri değişimi ile karakterize edilir. Her bir yeni dönemde, döneme özgü kütikül sentezlenir ve eskisi atılır. L1 larval evrede üreme sistemi ve sindirim sistemi gelişmeye başlamakta ve L4 larval evrede gelişim tamamlanmaktadır. Ayrıca nematod uygun olmayan koşullarla karşılaştığında L3 larval evre yerine gelişimin devam etmediği ve "Dauer evre" olarak adlandırılan döneme geçiş olmaktadır. Dauer evreye geçiş ikinci deri değişiminin ardından yüksek sıcaklık, açlık populasyon sayısındaki aşırı artış gibi stres durumlarıyla karşılaşıncaya meydana gelmektedir [150].



Şekil 2.1. *C. elegans*'ın yaşam döngüsü. 0 dk döllenme. mavi ile gösterilmiş rakamlar hayvanın her bir dönemde harcadığı zamanı göstermektedir. İlk bölünme, döllenmeden sonra yaklaşık 40. dk'da meydana gelmektedir. Yumurtalar döllenmeden sonra yaklaşık 150. dk'da ve gastrula evresinde dışarı salınmaktadır. Her bir evrede hayvanın uzunluğu mikrometre cinsinden belirtilmiştir [150].

C. elegans doğal habitatında kendini zararlı çevresel mikroorganizmalara karşı korumaktadır. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalarla *C. elegans* ve mikroorganizmalar arasındaki patojenik etkileşimler tanımlanmıştır. 1999'dan beri çok sayıda insan, hayvan, bitki ve böcek patojeninin nematodu öldürebildiği gösterilmiştir. Bu patojenlerle yapılan çalışmalar ilgilenilen patojenin laboratuvar koşullarında nematod growth medium (NGM) agar plaklarında *C. elegans* için gıda kaynağı olarak kullanılan oksotrofik *Escherichia coli* suşu olan OP50 ile yer değiştirilerek ve deney süresince nematodların hayatta kalma süreleri karşılaştırılarak gerçekleştirilmektedir. Bu basit beslenme esaslı model, *C. elegans*'ı patojenik süreçleri çalışmak için ilgi çekici bir model sistem haline getirmektedir. Nematod oda sıcaklığında *E. coli* OP50 ile beslendiği zaman yaklaşık olarak iki haftalık bir yaşam döngüsüne sahiptir. Fakat nematod çeşitli patojen bakterilerle beslendiğinde çok daha kısa yaşam döngüsüne sahip

olmaktadır. İnsanlarda patojen olan *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia pseudomallei* ve *Vibrio cholerae* suşları besin kaynağı olarak verildiğinde *C. elegans*'ı öldürmektedir ve çeşitli bakteriyel virülans faktörlerinin nematodlar ve insanda patogenezin ortaya çıkmasında rol oynadığı gözlemlenmiştir [151, 152, 153, 154, 155].

Gram negatif enterik bir bakteri olan *Salmonella enterica*'nın *C. elegans* bağırsağında kolonize olduğu belirlenmiştir. *S. enterica* serovar Typhi çeşitli sistemik enfeksiyonlara ve tifo ateşine neden olmaktadır. *S. enterica* serovar Typhimurium'un farelerde letal, tifo benzeri bir hastalığa neden olduğu bilinmektedir ve bu nedenle fareler bu sistemik enfeksiyon için model sistem olarak kullanılmaktadır. *S. enterica* serovar Typhimurium'un *C. elegans* modelinde bağırsak lümeninde kalıcı ve fatal kolonizasyona neden olduğu bilinmektedir ve ayrıca bağırsak epitel hücrelerine invazyon ettiği bildirilmiştir [152, 153, 156]. *Salmonella* enfeksiyonu süresince nematodlarda güçlü endomitotik oosit fenotipi gözlemlenmektedir; bakteriye maruz kalan gelişmemiş döllenmiş yumurta taşıyan nematodlar ölürler. Ölen enfekte bir hayvanın hiçbir zaman gelişmeyecek döllenmiş yumurtalara sahip olması germ hattı gelişiminin bir şekilde *S. Typhimurium* enfeksiyonu ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bu ilişkinin nasıl olduğu bilinmese de, yapılan bir çalışmada *S. Typhimurium* enfeksiyonunda ölümlere karşı direnç için germ hattı apoptozisinin gerekli olduğu belirlenmiş ancak bu bulgu başka çalışmalarda tekrar elde edilmemiştir. p38 MAPK kaskadında mutasyon olan nematodların *S. Typhimurium* enfeksiyonuna karşı aşırı duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. PhoP/PhoQ, SPI-1 ve SPI-2' yi içeren klasik *S. Typhimurium* virülans faktörleri bakterinin *C. elegans* kolonizasyonu sırasında indüklenmektedir ve bu faktörlerin nematod modelde virülans için zorunlu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca tip III salgı sistemi ve "yabani tip" lipopolisakkarit (LPS) yapısının hem *C. elegans* hem de fare model sistemlerinde tam virülanslık için gerekli olması bu hastalığın bazı yönlerinin memeli ve nematod konaklarda benzer olacak şekilde korunduğunu düşündürmektedir [157, 158, 159, 160].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışmada Kullanılan *Salmonella* spp. İzolatlarının Özellikleri

Çalışmada Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda yer alan ve Edirne ilinde satışa sunulan tavuk etlerinden izole edilmiş olan gıda kökenli 32 adet *Salmonella* spp. izolatı kullanılmıştır.

3.2. *Salmonella* spp. İzolatlarının Serotiplendirilmesi

Salmonella spp. izolatlarının doğrulanması ve serotiplendirilmesi T.C. Sağlık Bakanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ulusal Enterik Patojenler Referans Merkez Laboratuvarı tarafından hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3. *Salmonella* spp. İzolatlarının Enterobakteriyel Tekrarlayan Genlerarası Uzlaşan Dizi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ERIC-PZR) ile Moleküler Karakterizasyonu

3.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Salmonella spp. izolatlarının moleküler karakterizasyonu için gerekli olan ERIC-PZR çalışmalarında kalıp DNA olarak kullanılmak üzere izolatlardan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Genomik DNA izolasyonu için Bio speedy Genomik DNA İzolasyon Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmış, işlem üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır.

3.3.1.1. Bio Speedy Genomik DNA İzolasyon Kiti Prosedürü

Salmonella suşları stok kültürden %1 ekim oranı ile 5 mL LB broth (Merck, Germany) besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C’de 18 saat inkübe edilmiştir. 1 mL bakteri kültürü 14000 rpm’de 5 dk santrifüje edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bakteri pelleti üzerine 600 µL parçalama tamponu eklenmiş ve 2 dk süre ile vortekslenmiştir. Ardından 95 °C’ye ayarlanmış su banyosunda 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 14000 rpm’de 1 dk santrifüje edilmiş ve süpernatant yeni steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Mikrosantrifüj tüplerine süpernatant hacmi kadar isopropanol, süpernatant hacminin 2 katı kadar bağlanma tamponu eklenmiş ve birkaç saniye vortekslenerek karıştırılmıştır. Karışımın 800 µL’si DNA kolonuna transfer edilmiş ve 14000 rpm’de 1 dk santrifüje edilmiştir. Santrifüj sonrası toplama kolonunda biriken sıvı atılmış ve bu işlem numune bitene kadar tekrarlanmıştır. Ardından DNA kolonuna 500 µL yıkama tamponu eklenmiş ve 14000 rpm’de 1 dk santrifüjlenerek toplama kolonunda biriken sıvı atılmış ve bu adım bir kez daha tekrarlanmıştır. Ardından kolon 14000 rpm’de 1 dk boş santrifüje edilmiş ve steril yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Kolona 100 µL çözücü tampon eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 14000 rpm’de 1 dk santrifüje edilmiş ve izole edilen genomik DNA’yı taşıyan mikrosantrifüj tüpleri etiketlenerek -20 °C’ye kaldırılmıştır.

3.3.1.2. Genomik DNA Konsantrasyonlarının Hesaplanması

İzole edilen genomik DNA örneklerinin konsantrasyonları kuvartz küvetler kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Küvetlere 995 µL steril distile su ve 5 µL gDNA örneği eklenerek 260 nm dalga boyunda verdikleri absorbanslar belirlenmiştir. Her bir suşa ait genomik DNA örneğinin konsantrasyonu aşağıda verilen formül yardımı ile hesaplanmıştır.

- dsDNA konsantrasyonu (ng/µL) = 50 ng/µL × OD260 × dilüsyon faktörü

Ayrıca gDNA örneklerinin OD260/OD280 değerleri hesaplanmıştır. Değerleri 1.8 – 2.0 arasında olan örneklerin DNA konsantrasyonları 50 ng/µL olarak seyreltilmiş ve ERIC-PZR çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C’ ye kaldırılmıştır.

3.3.2. ERIC-PZR

İzolatların moleküler karakterizasyonu için ERIC-PZR yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. ERIC primerlerinin özellikleri

Primer Adı	Baz Dizisi	Ürün Büyükülüğü(bç)
ERIC1	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'	Değişken
ERIC2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	Değişken

PZR için kullanılan karışım ve PZR amplifikasyon protokolü daha önce yayınlandığı şekilde hazırlanmış ve kullanılmıştır [97, 100].

PZR Amplifikasyon Protokolü

95°C	7 dk.	
90°C	30 sn.	} 30 döngü
52°C	1 dk.	
65°C	8 dk.	
65°C	16 dk.	

3.3.2.1. Agaroz Jel Elektrofrez ve ERIC PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

PZR işlemi tamamlandıktan ürünlerin analizi için agaroz jel elektrofrez yöntemi kullanılmıştır. 1X Tris Asetat EDTA (TAE) Tamponu kullanılarak % 1.5'lük agaroz jel hazırlanmış ve 25 µL PZR örneği 2 µL yükleme boyası ile karıştırılarak agaroz jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Elektrofrez işlemi 120 V sabit elektrik akımında 3,5 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Elektrofrez işlemi sonrası jel 1X TAE Tampon içerisine son konsantrasyon 2 µg/mL olacak şekilde etidyum bromid ilave edilmiş boya çözeltilisinde 20 dk süre ile boyanmış ve UV ışık altında görüntülenerek fotoğrafları çekilmiştir (Cleaver, ABD).

3.3.2.2. Bant Büyüklüklerinin Hesaplanması ve Dendogramın Oluşturulması

Oluşturulan ERIC-PZR profilinde bant büyüklükleri hesaplanmıştır. Analiz, bant varlığında '1' bant yokluğunda ise '0' değeri verilerek unweighted-pair group method (UPGMA)'a göre yapılmıştır [161].

3.4. Plazmid Analizi

Plazmid izolasyonu için Kado ve Liu (1981) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır [162].

3.4.1. Plazmid DNA İzolasyonu

Salmonella suşları stok kültürden %1 ekim oranı ile 5 mL LB broth (Merck, Germany) besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her bir kültürün üreme düzeyi spektrofotometrik ölçüm ile belirlenmiş ve tüm kültürlerin OD600 değerleri 0.610-0.620 arasında olacak şekilde steril serum fizyolojik su (SFS) ile seyreltilmiştir. Bu kültürden mikrosantrifüj tüpüne 1,5 mL aktarılacak oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüje edilmiş ve üst faz atılarak bakteri çökeltisi oda sıcaklığında kurutulmuştur. Çökelti kuruduktan sonra 20 µL Kado tampon çözeltisinde vortekslenerek çözülmüştür. Bu süspansiyona 100 µL hücre parçalama çözeltisi (lisis çözeltisi) eklenerek homojen karışım elde edinceye kadar yavaşça karıştırılmıştır. Örnekler 60°C su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiş ve sonrasında 100 µL fenol/kloroform (1:1) çözeltisi eklenerek vortekslenmiştir. Bu aşamadan sonra oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 30 dakika santrifüje edilmiştir. Santrifüjleme sonrası üst faz alınmış ve eşit miktarda kloroform eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrası alınan üst faz agaroz jelde yürütülmüştür [162].

3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi ve Plazmid DNA'nın Görüntülenmesi

İzole edilen plazmid DNA'ların analizi için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. 1X Tris Asetat EDTA (TAE) Tamponu kullanılarak % 0.8' lik agaroz jel hazırlanmış ve 20 µL plazmid DNA örneği 2 µL yükleme boyası ile karıştırılarak agaroz jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 100V sabit elektrik akımında

başlatılmış ve 15 dk sonra örneklerin kuyudan çıkmasıyla voltaj 120 V sabitlenerek 3 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrası jel, 1X TAE Tamponuna son konsantrasyon 2µg/mL olacak şekilde etidyum bromid ilave edilmiş boya çözeltisinde 20 dk boyanmış ve UV ışık altında görüntülenerek fotoğrafları çekilmiştir (Cleaver, ABD). Plazmid büyüklükleri Lambda Hind III DNA Marker (Promega, ABD) kullanılarak Gel Analyzer programında hesaplanmıştır [163].

3.5. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları disk difüzyon metodu, antibiyotiklerin minimal inhibisyon konsantrasyonları (MİK) ise mikrodilüsyon metodu kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada toplam 12 adet antibiyotik kullanılmıştır. Kullanılan antibiyotiklerin özellikleri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin özellikleri

Antibiyotik Adı	Antibiyotik Grubu	Çözücü
Kloramfenikol (CHL)	Fenikol	Etanol
Ampisilin (AMP)	Beta-Laktam	Saf su
Streptomisin (STR)	Aminoglikozid	Saf su
Gentamisin (GEN)	Aminoglikozid	Saf su
Nalidiksik Asid (NAL)	Kinolon	0.1M NaOH
Tetrasiklin (TET)	Tetrasiklin	Saf su
Siprofloksasin (CIP)	Kinolon	0.1M NaOH
Trimethoprim (TMP)	Antifolat	DMSO
Neomisin (NEO)	Aminoglikozid	Saf su
Ampisilin/Sulbaktam (SAM)	Beta-Laktam	Saf su
Sulfonamid (SUL)	Antifolat	DMSO
Kanamisin (KAN)	Aminoglikozid	Saf Su

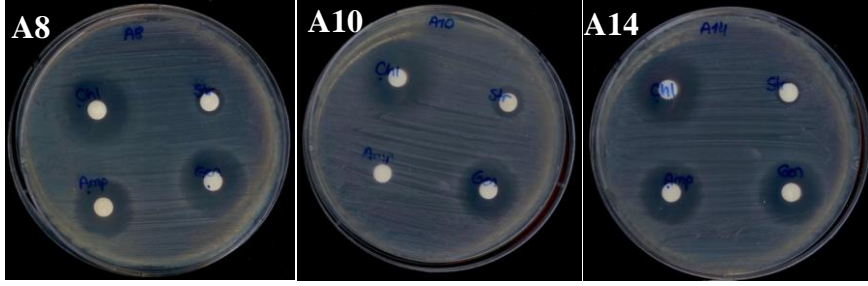
3.5.1. Disk Difüzyon Metodu

İncelenecek kültürler 16 cm cam deney tüplerinde %1 ekim oranı ile 5 mL LB broth besiyerine inoküle edilmiş ve 16-18 saat süre ile 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler 0.5 McFarland standardına göre steril distile su ile seyreltilmiştir. Seyreltilen örneklerden 100 µL alınarak Müller Hinton agar plakları (Sigma Chem.Co., USA) üzerine yayma ekim yapılmıştır. Çalışılacak konsantrasyonlarda antibiyotik emdirilmiş 6mm’lik steril diskler kültürlerin üzerine yerleştirilmiş ve 37°C’de 16-18 saat inkübe edilmiştir. Çalışılan antibiyotiklerin konsantrasyonları Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan antibiyotik stok solüsyonlarının ve disklerinin konsantrasyonları

Antibiyotik Adı	Stok Konsantrasyonu	Disk Konsantrasyonu
Kloramfenikol (CHL)	30 mg/mL	30 µg
Ampisilin (AMP)	10 mg/mL	10 µg
Streptomisin (STR)	10 mg/mL	10 µg
Gentamisin (GEN)	10 mg/mL	10 µg
Nalidiksik Asid (NAL)	10 mg/mL	30 µg
Tetrasiklin (TET)	10 mg/mL	30 µg
Siprofloksasin (CIP)	10 mg/mL	5 µg
Trimethoprim (TMP)	10 mg/mL	5 µg
Neomisin (NEO)	10 mg/mL	10 µg
Ampisilin/Sulbaktam (SAM)	1 mg/mL	10 µg
Sulfonamid (SUL)	10 mg/mL	250 µg
Kanamisin (KAN)	10 mg/mL	30 µg

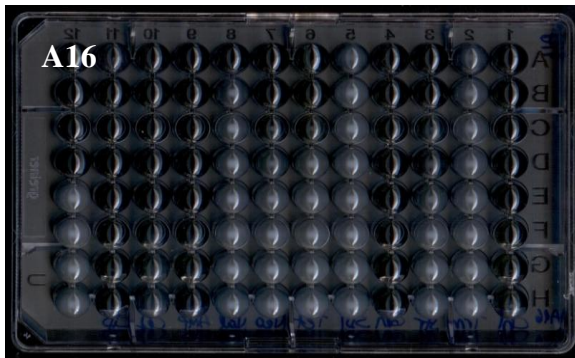
İnkübasyon süresi sonunda disklerin etrafındaki zon çapları ölçülmüş (Şekil 3.1) ve Klinik Laboratuar Standartları Enstitüsü (CLSI)’nün belirlediği kırılma noktaları ile karşılaştırılarak suşlar duyarlı (S), orta dirençli (I) ve dirençli (R) olarak belirlenmiştir [164].



Şekil 3.1. Disk Difüzyon Metodu

3.5.2. Mikrodilüsyon Metodu

Minimal İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi için 96 kuyucuklu mikropalaklar kullanılarak mikrodilüsyon metodu uygulanmıştır. Antibiyotik solüsyonları Tablo 3'te belirtilen çözücüler kullanılarak belirtilen stok miktarlarına göre hazırlanmıştır ve 0.22 µm çaplı filtreler kullanılarak sterilize edilmiştir. Çalışılacak olan kültürler 16 cm cam deney tüplerinde %1 ekim oranı ile 5 mL LB broth (Sigma Chem.Co.,USA) besiyerine inoküle edilmiş ve 16-18 saat süre ile 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her bir örnek 0.5 McFarland standardına göre steril distile su ile seyreltilmiştir. Plakalardaki kuyucuklara 100 µL Müller Hinton sıvı besiyeri eklenmiştir. Kuyucukların ilk sırasına Tablo 3.4'te belirtilen son konsantrasyonu sağlayacak şekilde stok antibiyotik solüsyonlarından 100 µL eklenmiştir. İlk kuyucuktan başlanarak bir sonraki kuyucuğa 100 µL aktarılmıştır ve son kuyucuktan 100 µL alınarak seyreltme işlemi tamamlanmıştır. Seyreltme sonrası her bir kuyucuğa 0.5 McFarland standardına göre seyreltilen kültürlerden 10 µL ekim yapılmış, mikropalaklar 37°C'ye ayarlanmış inkübatöre kaldırılmış ve 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası mikroorganizma üremesinin gözlemlenmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak belirlenmiştir (Şekil 3.2) [165].



Şekil 3.2. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Tablo 3.4. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Metodu'nda Kullanılan Antibiyotiklerin Mikroplakadaki Konsantrasyonları

Suş	CHL	AMP	STR	GEN	NAL	TET	CİP	TMP	NEO	SUL	KAN
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	512 µg/mL	512 µg/mL	512 µg/mL	512 µg/mL	512 µg/mL	512 µg/mL	64 µg/mL	512 µg/mL	512 µg/mL	512 µg/mL	512 µg/mL
B	256 µg/mL	256 µg/mL	256 µg/mL	256 µg/mL	256 µg/mL	256 µg/mL	32 µg/mL	256 µg/mL	256 µg/mL	256 µg/mL	256 µg/mL
C	128 µg/mL	128 µg/mL	128 µg/mL	128 µg/mL	128 µg/mL	128 µg/mL	16 µg/mL	128 µg/mL	128 µg/mL	128 µg/mL	128 µg/mL
D	64 µg/mL	64 µg/mL	64 µg/mL	64 µg/mL	64 µg/mL	64 µg/mL	8 µg/mL	64 µg/mL	64 µg/mL	64 µg/mL	64 µg/mL
E	32 µg/mL	32 µg/mL	32 µg/mL	32 µg/mL	32 µg/mL	32 µg/mL	4 µg/mL	32 µg/mL	32 µg/mL	32 µg/mL	32 µg/mL
F	16 µg/mL	16 µg/mL	16 µg/mL	16 µg/mL	16 µg/mL	16 µg/mL	2 µg/mL	16 µg/mL	16 µg/mL	16 µg/mL	16 µg/mL
G	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	1 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL
H	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	0.5 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL

CHL: kloramfenikol, AMP: ampicilin, STR: streptomisin, GEN: gentamisin, NAL: nalidiksik Asit, TET: tetrasiklin, CİP: siprofloksasin, TMP: trimethoprim, NEO: neomisin, SUL: sulfonamid, KAN: kanamisin.

3.6. *Caenorhabditis elegans* Modeli Sistem ile *Salmonella enterica* Serotiplerinin Patojenitelerinin Belirlenmesi

3.6.1. *Caenorhabditis elegans*'ın Temini ve Stoklarının Hazırlanması

Caenorhabditis elegans atasal suşu olan N2 suşu *Caenorhabditis elegans* Genetic Center (CGC), University of Minnesota' dan temin edilmiştir. Nematodlar, Nematod Üreme Besiyeri (NGM) ile ve besin kaynağı olan *E.coli* OP50 suşu katı besi yerinde ekili olarak laboratuvarımıza gönderilmiştir.

C. elegans N2 suşunun aç L1 evredeki larvaları %15 gliserol eklenmiş S Tampon içerisinde stok tüplerine aktarılarak -80°C'de muhafaza edilmektedir.

3.6.2. Bakteriyel Besin Kaynağının ve Nematod Üreme Besiyeri (NGM) Petri Plaklarının Hazırlanması

C. elegans'ın üretilmesinde besin kaynağı olarak *E. coli* OP50 suşu kullanılmıştır. *E. coli* OP50 suşu %1 ekim oranı ile 5 mL LB broth (Sigma Chem.Co.,USA) besiyerine inoküle edilmiş ve 16-18 saat süre ile 37°C'de inkübe edilmiştir. *E.coli* OP50 sıvı kültüründen petri plaklarına (35 mm çaplı küçük petrilere hazırlanmış NGM agar için 0.05 mL veya 60 mm çaplı büyük petrilere hazırlanmış NGM agar için 0.1 mL) yayılarak 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası nematodların *E. coli* OP50 ekili NGM agar plaklarına aktarımı için agar parçalama (chunking) metodu kullanılmıştır. Nematodların üremiş olduğu agardan bir parça alkol ile ateşte yakılarak sterilize edilmiş spatula yardımı ile alınarak yeni plakalara aktarılmıştır. Nematodların laboratuvar ortamında sürekli olarak canlılığının sağlanabilmesi için 1-3 jenerasyonda bir (3-9 günde bir) *E.coli* OP50 ekili NGM plakalara aktarılmıştır [166].

3.6.3. *Caenorhabditis elegans* N2 Eş Zamanlı L4 Larvalarının Hazırlanması

C.elegans N2 suşu "chunking" metodu ile *E.coli* OP50 ekili NGM agar içeren Petrilere (60 mm çaplı) aktarılmış ve 3 gün oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası petrilere 2 mL M9 Tampon ile yıkanmış, yumurta taşıyan (gravid) nematodlar ve yumurtalar pastör pipeti ile steril 15 mL'lik konikal satrifüj tüplerine

aktarılmıştır. Her bir tüpteki son hacim M9 Tampon ile 3.5 mL'ye tamamlanmıştır. Her bir tüpe 0.5 mL 5N NaOH ve 1 mL %5 sodyum hipoklorit solüsyonu eklenip oda sıcaklığında her 2dk aralıklarla vorteks ile karıştırılarak 10 dk inkübe edilmiş ve sonrasında 1300g'de 30sn santrifüjlenmiştir. Süpernatant Pastör pipeti ile atılmıştır. Tüplere 5 mL M9 Tamponu eklenerek vorteks ile birkaç saniye karıştırılmış ve 1300g'de 30sn santrifüjlenmiştir. Sediment M9 Tampon solüsyonu ile 2 kez yıkanmıştır. Son santrifüjlemeden sonra sediment 7 mL M9 tamponunda çözülmüş ve 18 saat 22°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yumurtalardan çıkan L1 larvalar 1300g'de 30sn santrifüjlenerek toplanmıştır. Süpernatant 0.1 mL kalacak şekilde Pastör pipeti ile uzaklaştırılmış ve kalan çözeltilde sediment çözülerek ölü nematodlar ve yumurtalar *E. coli* OP50 ekili NGM agara aktarılmıştır. 28 saat 22°C'de inkübe edilen nematodların L4 larval evreye ulaşması sağlanmıştır [167].

3.6.4. *Caenorhabditis elegans* Patojenite Denemeleri

LB broth besiyerinde 37°C'de 18 saat üretilen *Salmonella* spp. suşlarının yoğunlukları saptanmış (OD600 0.5-0.6) ve 10 µL NGM agara ekilmiştir. 37°C'de 18 saat inkübasyondan sonra Petrielerin 22°C'ye soğuması beklenmiş ve 20 adet L4 dönemindeki larvalar her bir Petriye (35 mm çaplı) stereo mikroskop (Olympus, Japonya) altında 4X büyütmede platin çengel uçlu bir aktarıcı yardımı ile aktarılmıştır. 24 saat aralıklarla canlı ve ölü nematodların sayıları belirlenmiş ve ölenler uzaklaştırılmıştır. Nematodlar deney süresinde 48 saat aralıkla yeni hazırlanmış besiyerine aktarılmıştır. Deney süresince platin uç ile mikroskop altında nazik dokunma sonucu tepki vermeyen nematodlar ölü kabul edilmiştir. Petri duvarı ile besiyeri arasına sıkışarak ölen nematodlar analizden çıkarılmıştır. Deneye tüm nematodlar ölene kadar devam edilmiştir [153].

Mortalite ve survi GraphPad Prism programı kullanılarak analiz edilmiştir. Nematodların %50'sinin ölmesi için geçen zaman (TD50) programdaki $Y=Bottom+[Top-Bottom]/[1+10(\log EC_{50}-X)]$ (Hill slope) denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. X değeri olarak zaman (gün) logaritması, Y değeri olarak o gün için canlı nematodların yüzdesi yazılmış ve maksimum değer 100, minimum değer ise 0 olarak sabitlenmiştir. Belirlenen EC50 değeri ise TD50 olarak değerlendirilmiştir. TD50 değerleri arasındaki anlamlı farklılık Student's t-testi ($p<0.05$) ile analiz edilmiştir.

3.7. Plazmidlerin *Salmonella* suşları için *Caenorhabditis elegans* Patojenitesi ve Antibiyotik Duyarlılığındaki Rollerinin Araştırılması

3.7.1. Plazmidlerin Giderilmesi

Plazmid giderme ajanı olarak floresan bir DNA boyası olan etidyum bromid kullanılmıştır. 50 µg/mL'den 125 µg/mL'ye kadar değişen konsantrasyonlarda EtBr LB-broth ortamlarına eklenmiş ve ardından %1 ekim oranı ile plazmid taşıyan *Salmonella* izolatları inoküle edilmiştir. Farklı EtBr konsantrasyonlarında geliştirilen bakteri kültürlerinden Kado ve Liu metoduna göre plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izole edilen plazmidler %0.7 agaroz jel elektroforezinde analiz edilerek suşların plazmidlerinin giderilmesi için uygun konsantrasyon saptanmıştır [168].

3.7.2. Plazmidleri Giderilen İzolatlar ile *Caenorhabditis elegans* Model Sisteminde Patojenite Denemeleri

Plazmidi giderilen izolatlar 125 µg/mL Et-Br içeren LB broth ortamına %1 ekim oranı ile inoküle edilmiş ve 37°C'de 16-18 saat inkübe edilmiştir. Gelişen kültürlerin yoğunlukları saptanmış (OD600 0.5-0.6) bu kültürlerden mikrosantrifüj tüpüne 1,5 mL aktararak oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüje edilmiş ve bakteri çökeltisi 3 defa steril PBS ile yıkanmış, 10 µL olacak şekilde NGM agara ekilerek 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. 18 saat inkübasyondan sonra Petrielerin 22°C'ye kadar soğuması beklenmiş ve 20 adet L4 larva her bir petriye platin uçlu aktarıcı yardımı ile aktarılmıştır. 24 saatte bir her bir petrideki canlı ve ölü nematodların sayıları belirlenmiştir. Ölen nematodlar petrilere uzaklaştırılmıştır. Nematodlar deney süresinde 48 saatte bir yeni hazırlanmış petrilere aktarılmıştır. Deney süresince platin uç ile nazik dokunma sonucu tepki vermeyen nematodlar ölü olarak sayılmıştır. Petri duvarı ile besiyeri arasına sıkıştırarak ölen nematodlar analizden çıkarılmıştır. Deneye tüm nematodlar ölene kadar devam edilmiştir.

Sonuçlar GraphPad Prism programı kullanılarak analiz edilmiştir. Nematodların %50'sinin ölmesi için geçen zaman (TD50) programdaki $Y=Bottom+[Top-Bottom]/[1+10(\log EC_{50}-X)]$ (Hill slope) denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. X yerine günlerin logaritması, Y yerine ise o gün canlı kalan kurtların yüzdesi yazılmıştır. Top değeri 100, Bottom değeri ise 0 olarak sabitlenmiştir. Belirlenen EC50 değeri ise

TD50 olarak alınmıştır. Plazmidi giderilen suşların kullanıldığı deney grubunda elde edilen TD50 değeri, plazmidi giderilmeden önce elde edilen TD50 değeri ile karşılaştırılmış ve aradaki anlamlı farklılık Student's t-testi ($p < 0.05$) ile analiz edilmiştir.

3.7.3. Plazmidleri Giderilen Suşların Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi

Plazmidi giderilen izolatlar 125 µg/mL Et-Br içeren LB broth ortamına %1 ekim oranı ile inoküle edilmiş ve 37°C'de 16-18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her bir örnek 0.5 McFarland standardına göre steril distile su ile seyreltilmiştir. Bu kültürden mikrosantrifüj tüpüne 1,5 mL aktarılarak oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve hücre pelleti 3 defa steril PBS ile yıkanmıştır. İzolatların plazmid giderme işlemi öncesi dirençli oldukları antibiyotiklerin minimal inhibisyon konsantrasyonlarında değişim olup olmadığı mikrodilüsyon metodu kullanılarak belirlenmiştir [165].

3.8. BALB/c Fare Denemeleri

Bu çalışma için gerekli Etik Kurul onayı TÜHDYEK-2014/23 sayılı protokol no ile alınmıştır. 45 adet BALB/c fare Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edilmiştir.

3.8.1. BALB/c Fare Modelinde Denenecek İzolatların Seçimi

Fare modeli patojenite testleri için izolatlar serotiplerine, antibiyotik direnç profillerine, plazmid profillerine ve *C. elegans* patojenite denemelerinde elde edilen sonuçlara göre seçilmiştir. Seçilen izolatların serotipleri, antibiyotik direnç profilleri, plazmid profilleri ve *C. elegans* patojenite denemelerinde elde edilen TD50 verileri Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.5. BALB/c Fare Denemesi için seçilen İzolatların Özellikleri

Suş Kodu	Serotip	Antibiyotik Direnç Profili	Plazmid Sayısı	Plazmid Büyüklüğü (kb)	TD50 (gün)
A8	Infantis	STR, NAL, TET, TMP, SUL	-	-	3.7±0.005*
A10	Kentucky	AMP, NAL, TET, CİP, TMP, SUL	1	31,6	4.9±0.04*
A17	Enteritidis	SUL	-	-	6.8±0.47
A18	Infantis	STR, NAL, TET, TMP, SUL	-	-	3.4±0.08*
A22	Telaviv	SUL	-	-	4.8±0.25*
A30	Enteritidis	SUL	1	35,8	7.3±0.81
A32	Enteritidis	AMP, STR, GEN, NAL, TET, CİP, TMP, NEO, SUL, KAN	-	-	4.7±0.2*

STR: streptomisin, NAL: nalidiksik asid, TET: tetrasiklin, AMP: ampisilin, NEO: neomisin, KAN: kanamisin, SUL: sulfonamid, CİP: siprofloksasin, GEN: gentamisin, TMP: trimethoprim, SAM: ampisilin/sulbaktam, TD50: nematodların %50'sinin ölmesi için geçen zaman, * TD50 verilerinin *S. Typhimurium* ATCC14028 ile arasında anlamlı fark ($p<0.05$) bulunmayan *C. elegans* model sistem için patojen olarak tanımlanan izolatlar.

3.8.2. BALB/c Fare Modelinde Patojenite Denemeleri

Denemede, izolatların enjekte edildiği gruplar için ve BALB/c farelerde patojen olduğu bilinen (pozitif kontrol) *S. Typhimurium* ATCC14028'in enjekte edildiği grup için 5, nematod patojenite deneylerinde kullanılan ve patojen olmayan *E. coli* OP50 suşunun enjekte edildiği grup için 3 ve negatif kontrol olarak kullanılan ve sadece PBS'nin enjekte edildiği grup için 2 adet 8-10 haftalık dişi BALB/c fareden oluşan gruplar kullanılmıştır. Deneyde kullanılan her bir gruptaki farelere 10^6 koloni oluşturma birimi bakteri içeren 0.3 mL PBS ve negatif kontrol için sadece 0.3 mL PBS intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Ortamın ısı ve nemi 'humidity-temperature data logger' ile deney süresince kontrol edilmiştir. Deney süresince fareler *ad libitum* olarak beslenmişlerdir. Fareler 21 günlük deney süresince günde iki defa kontrol edilmiş ve hastalık oluştuğunun göstergesi olarak kabul edilen kriterler (hareketlerde azalma-uyuşukluk (letarji), bozulmuş kürk yapısı ve kambur duruş) gözlemlenen

farelere ötanazi uygulanmıştır. Ötanazi işlemi için öncelikle 5mg/kg olacak şekilde intramuskuler Ksilazin ve ardından 50mg/kg olacak şekilde intramuskuler Ketamin enjeksiyonu yapılmıştır. Anestezi işlemi sonrasında farelerden 24 Gauge iğne ile kalp kanı alınarak ötanazi işlemi tamamlanmıştır.

3.8.3. BALB/c Farede Kolonizasyonun Belirlenmesi

Deney süresi sonunda veya deney süresince sakrifiye edilen fareler steril koşullarda disekte edilmiştir. Alınan dalak, karaciğer, ince bağırsak, kalın bağırsak ve çekum buzda soğutulmuş 2 mL PBS içerisinde steril cam boncuklar ile vortekslenerek homojenize edildikten sonra seri dilüsyonları hazırlanmış, Ksiloz Lizin Deoksikolat (XLD) agar besiyerine yayma ekim yöntemi ile ekilerek 37°C' de 16-18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası XLD agarda gelişen siyah koloniler sayılarak dokulardaki kolonizasyon belirlenmiştir.

3.9. Virülans Genlerinin Ekspresyonunun BALB/c Fare ve *Caenorhabditis elegans* Nematod Model Sisteminde Belirlenmesi

3.9.1. Total RNA İzolasyonu

3.9.2. Kan Örneklerinin Hazırlanması

BALB/c fare modeli patojenite denemelerinde anestezi işlemi sonrası farelerden alınan kalp kanı RNA degradasyonunun engellenmesi için RNA Later Solüsyonu (Sigma Chem.Co.,USA) eklenerek -20°C'ye kaldırılmıştır. Total RNA izolasyonu bu kan örneklerinden Vivantis Total RNA Ekstarksiyon Kiti ile üretici firmanın talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.9.3. *Caenorhabditis elegans* Geri Kazanım

RNA izolasyonu için *Salmonella* suşlarının *C. elegans*'tan geri kazanımları gerçekleştirilmiştir. Nematodlardan geri kazanım nematodların *Salmonella* suşlarına maruz bırakılmalarının ardından 6 gün sonra gerçekleştirilmiştir. Birer adet nematod alınarak yüzeydeki bakterilerin giderilmesi için önce NGM agar üzerinde 4 µl %70 etanolde yıkanmıştır. Ardından etanolün uzaklaştırılması için her bir nematod NGM

agar üzerinde 4 µl steril M9 tamponda üç defa yıkanmıştır. Her bir nematod 20 µl %1 Triton X-100 içeren steril M9 tampon eklenmiş 1.5 mL mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır ve mikrotüp havan eli ile mekanik olarak ezilmiştir. Son hacim steril M9 tampon eklenerek 50 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan seri dilüsyonlar Ksiloz Lizin Deoksikolat (XLD) agar besiyerine yayma ekim yöntemi ile ekilerek 37°C'de 16-18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası oluşan siyah koloniler 250 µL Tris-EDTA tampona aktarılmıştır ve RNA izolasyonu Vivantis Total RNA Ekstarksiyon Kiti ile üretici firmanın talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.9.4. Vivantis Total RNA Ekstarksiyon Kiti Prosedürü

250 µL kan örneğine ve 250 µL TE tampon içerisine aktarılan *C. elegans*' tan geri kazanılan *Salmonella* suşlarına 100 µL 0.5 mg/mL konsantrasyonunda TE tamponda hazırlanmış lizozim eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Ardından 350 µL "Buffer TR" eklenerek hazırlanmış lizat homojenizasyon kolonuna aktarılmış ve 13500 rpm' de 2 dk santrifüje edilmiştir. Toplama kolonunda biriken kısma 300 µL absolut etanol eklenmiş ve oluşan çözelti RNA Bağlanma Kolonuna aktarılmıştır. 11000 rpm' de 1 dk santrifüje edilerek toplama kolonunda biriken kısım atılmıştır. 500 µL "Wash Buffer" eklenmiş ve 13500 rpm' de 1 dk santrifüje edilerek altta biriken kısım atılmıştır. Kolona 70 µL "DNaseI Digestion Mix" eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir. Ardından 500 µL "Inhibitor Removal Buffer" eklenmiş ve 13500 rpm'de 1 dk santrifüje edilerek altta biriken kısım atılmıştır. 500 µL "Wash Buffer" eklenerek 13500 rpm'de 1dk santrifüje edilmiştir. Ardından bu basamak tekrarlanmıştır. Kolon boş olarak 11000 rpm'de 1 dk santrifüje edilmiştir. Kolon yeni santrifüj tüpüne aktarılarak 50 µL "RNase-free water" eklenerek oda sıcaklığında 1 dk inkübe edilmiş ve ardından 11000 rpm' de 1 dk santrifüje edilmiştir. Elde edilen RNA örnekleri 1X Tris Asetat EDTA (TAE) Tampon kullanılarak hazırlanan % 1.5' luk agaroz jel kuyucuklarına 5 µL RNA örneği 2 µL yükleme boyası ile karıştırılarak yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 100 V sabit elektrik akımında 1,5 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonrası jel 1X TAE Tampon içerisine son konsantrasyon 2µg/mL olacak şekilde etidyum bromid ilave edilmiş boya çözeltisinde 20 dk süre ile boyanmış ve UV ışık altında görüntülenerek fotoğrafları çekilmiştir

(Cleaver, ABD). RNA örnekleri -80°C'de muhafaza edilmiştir. Analiz edilen total RNA izolatları cDNA sentezinde kalıp olarak kullanılmıştır.

3.9.5. cDNA Sentezi

İzole edilmiş olan total RNA buz üzerinde eritilmiş ve cDNA sentezi reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 65°C' de 5 dk inkübe edilmiş ve ardından buz üzerinde soğutulmuştur. Her bir reaksiyon tüpüne cDNA sentezi reaksiyon karışımı-2 eklenmiştir. Karışım kısa bir vorteksleme işlemi ile karıştırılmıştır. cDNA sentezi aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon Koşulları

25°C	10 dk
50°C	50 dk
85°C	5 dk

Sentezlenen cDNA ürünlerin analizi için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. 1X Tris Asetat EDTA (TAE) Tampon kullanılarak % 1.5'luk agaroz jel hazırlanmış ve 4 µL PZR örneği 2 µL yükleme boyası (Fermentas, Finland) ile karıştırılarak agaroz jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 100 V sabit elektrik akımında 1,5 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonrası jel 1X TAE Tampon içerisine son konsantrasyon 2µg/mL olacak şekilde etidyum bromid ilave edilmiş boya çözeltisinde 20 dk süre ile boyanmış ve UV ışık altında görüntülenerek fotoğrafları çekilmiştir (Cleaver, ABD). %1.5'luk agaroz jelde analiz edilerek sonrasında -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.9.6. Ters-Yön Polimeraz Zincir Reaksiyonu

BALB/c fare model sisteminde ve *C. elegans* nematod model sisteminde virülans genlerin ekspresyon farklılığının belirlenebilmesi için ters yön polimeraz zincir reaksiyonu kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin özellikleri Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6. Virülans Primerlerin Özellikleri

Gen Bölgesi	Baz Dizisi	Ürün Büyüklüğü
inv A	5'-GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA-3' 5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'	284 bç
stn	5'-CTTTGGTCGTAAAATAAGGCG-3' 5'-TGCCCAAAGCAGAGAGATTC-3'	260 bç
fimA	5'-CCTTTCTCCATCGTCCTGAA-3' 5'-TGGTGTTATCTGCCTGACCA-3'	85 bç

PZR için kullanılan karışım ve PZR amplifikasyon protokolü daha önce yayımlandığı şekilde hazırlanmış ve kullanılmıştır [169].

invA primeri için PZR Amplifikasyon Protokolü

95°C	2 dk.	
95°C	30 sn.	} 30 döngü
62°C	30 sn.	
72°C	30 sn.	
72°C	5 dk.	

stn ve fimA primerleri için PZR Amplifikasyon Protokolü

95°C	2 dk.	
95°C	1 dk.	} 25 döngü
52-53°C	1 dk.	
72°C	1 dk.	
72°C	5 dk.	

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

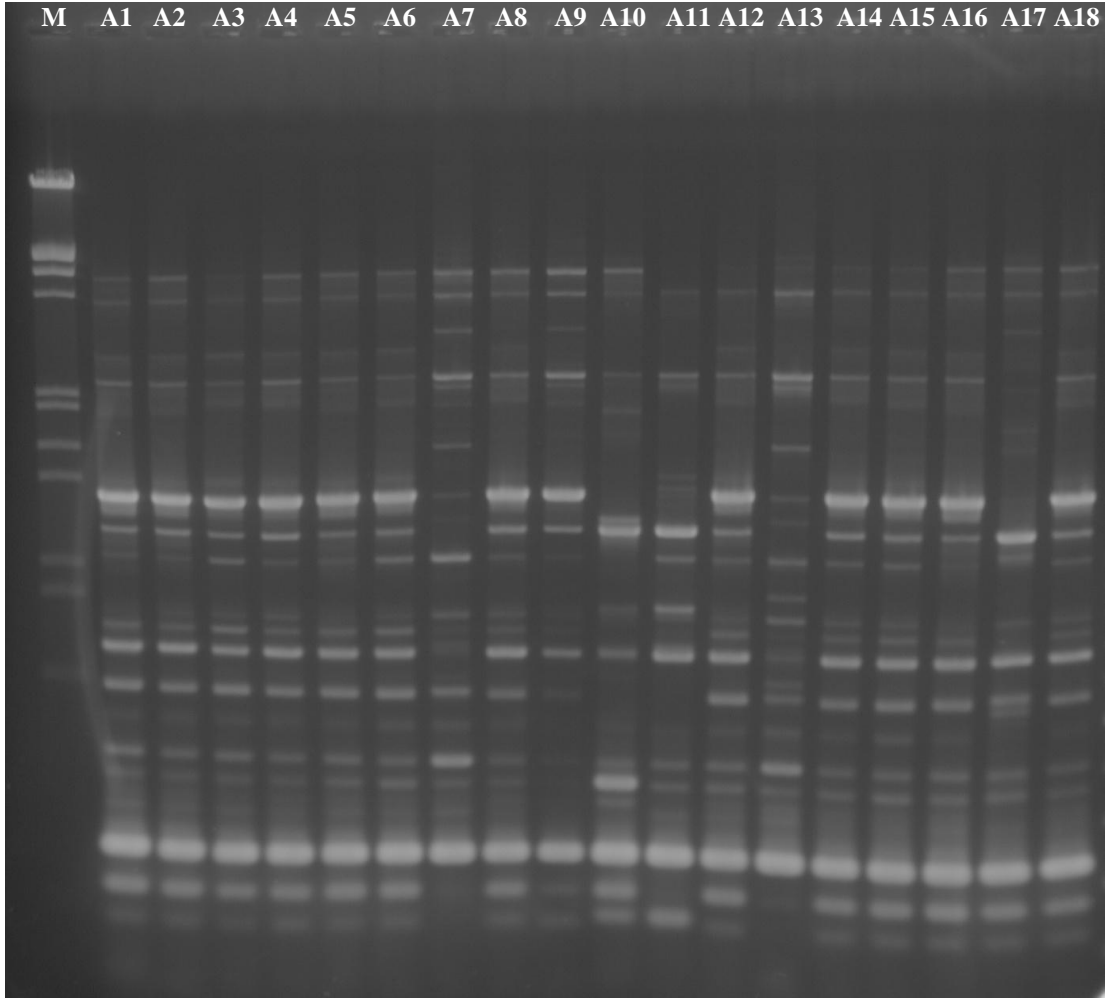
4.1. *Salmonella* spp. İzolatlarının Serotiplendirilmesi ve ERIC-PZR ile Moleküler Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan gıda kökenli 32 adet *Salmonella* izolatının 26'sının (%81.25) *S. Infantis*, 4'ünün (%12.5) *S. Enteritidis*, 1'er tanesinin de (%3.125) *S. Telaviv* ve *S. Kentucky* serotiplerine dahil olduğu saptanmıştır. Suşların kodları ve dahil oldukları serotipler Tablo 4.1'de verilmiştir.

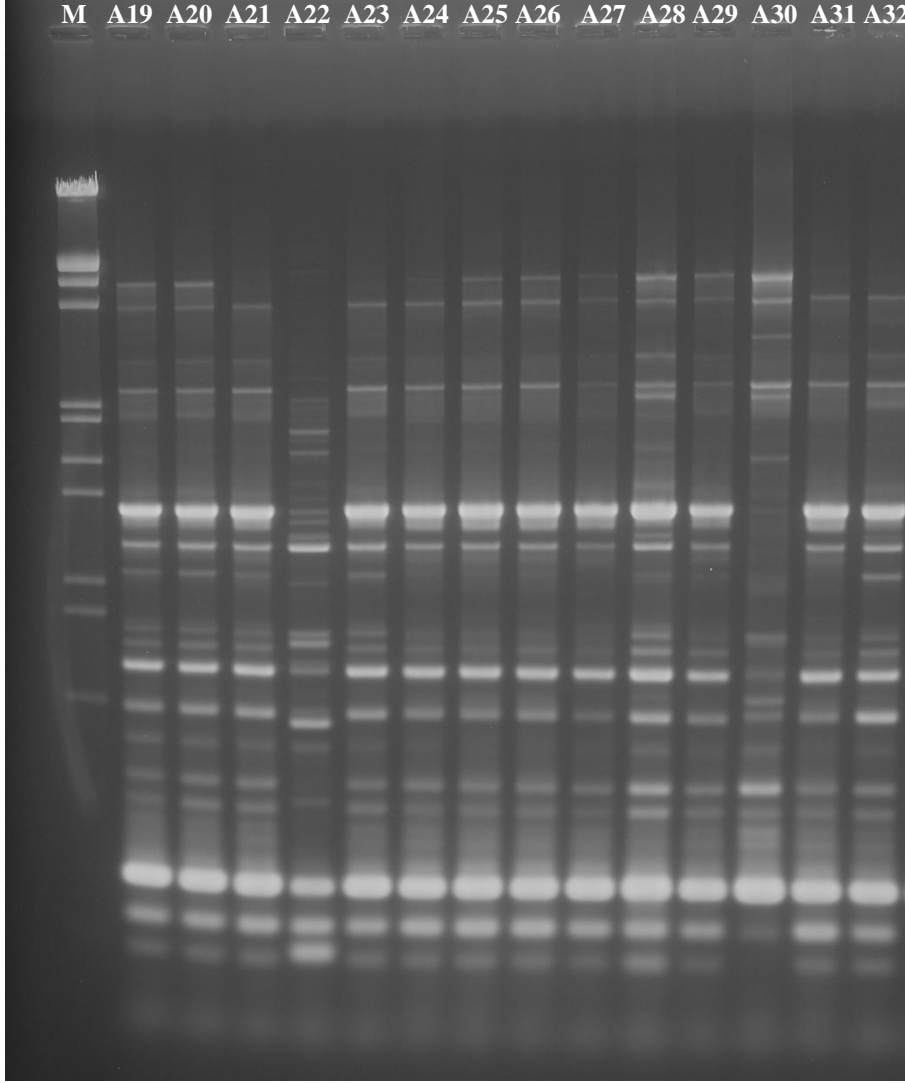
Tablo 4.1. *Salmonella* izolatlarının suş kodları ve dahil olduğu serotipler

Suş Kodu	Serotipi	Suş Kodu	Serotipi
A1	<i>S. Infantis</i>	A17	<i>S. Enteritidis</i>
A2	<i>S. Infantis</i>	A18	<i>S. Infantis</i>
A3	<i>S. Infantis</i>	A19	<i>S. Infantis</i>
A4	<i>S. Infantis</i>	A20	<i>S. Infantis</i>
A5	<i>S. Infantis</i>	A21	<i>S. Infantis</i>
A6	<i>S. Infantis</i>	A22	<i>S. Telaviv</i>
A7	<i>S. Enteritidis</i>	A23	<i>S. Infantis</i>
A8	<i>S. Infantis</i>	A24	<i>S. Infantis</i>
A9	<i>S. Infantis</i>	A25	<i>S. Infantis</i>
A10	<i>S. Kentucky</i>	A26	<i>S. Infantis</i>
A11	<i>S. Infantis</i>	A27	<i>S. Infantis</i>
A12	<i>S. Infantis</i>	A28	<i>S. Infantis</i>
A13	<i>S. Enteritidis</i>	A29	<i>S. Infantis</i>
A14	<i>S. Infantis</i>	A30	<i>S. Enteritidis</i>
A15	<i>S. Infantis</i>	A31	<i>S. Infantis</i>
A16	<i>S. Infantis</i>	A32	<i>S. Infantis</i>

Çalışmada kullanılan *Salmonella* izolatlarının moleküler karakterizasyonu için ERIC-PZR metodu kullanılmıştır. ERIC1 ve ERIC2 primerleriyle gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu sonucu elde edilen bant profillerini gösteren agaroz jel fotoğrafı Şekil 4.1'te verilmiştir.



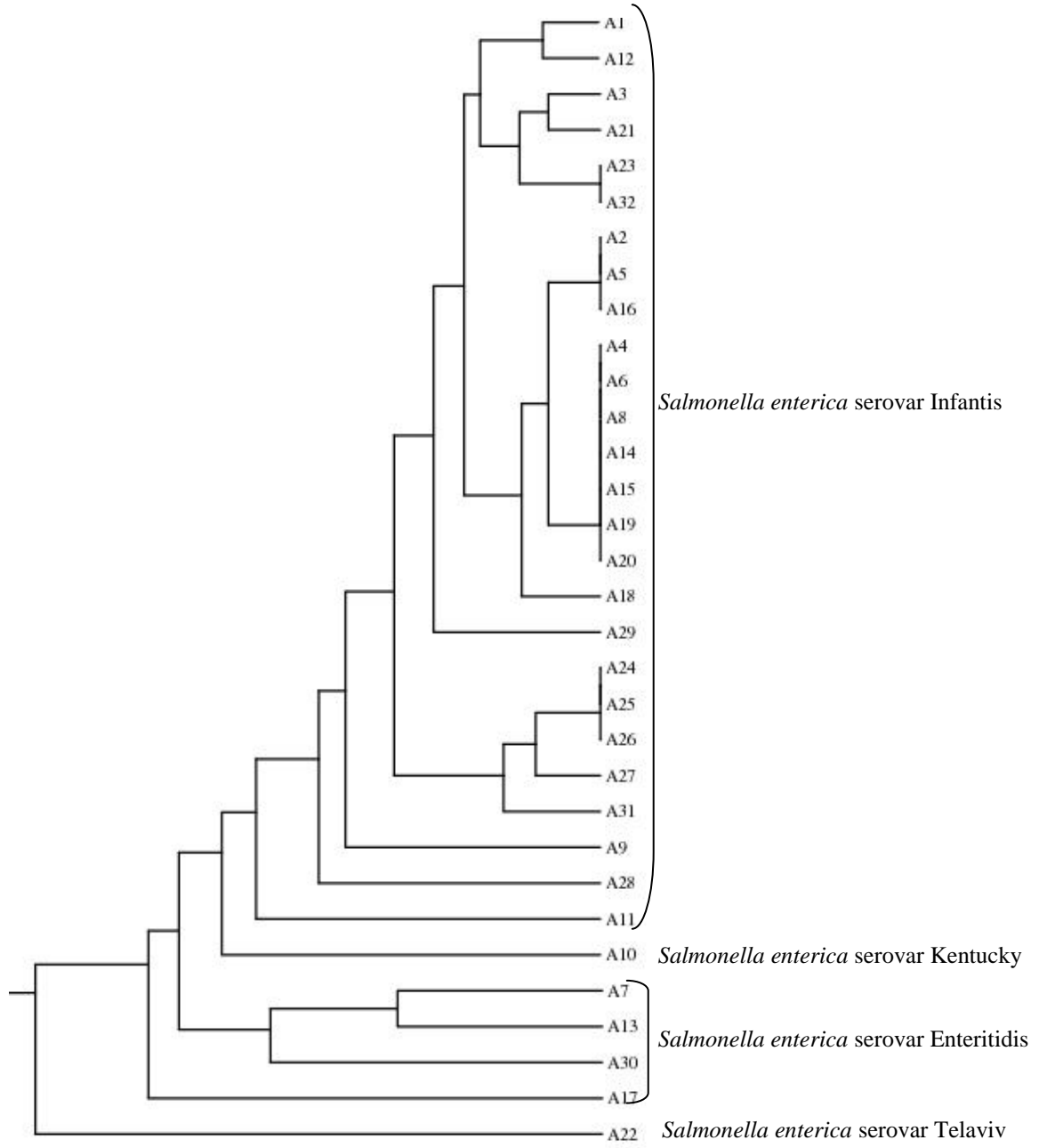
Şekil 4.1. ERIC-PZR Agaroz Jel Fotoğrafi, A1-A18 kodlu örnekler, M: Lambda HindIII DNA Marker (Promega,USA), (21.226bç, 5.148bç, 4.268bç, 3,530bç, 2,027bç, 1,904bç, 1,584bç, 1,357bç, 947bç, 831bç, 564 bç)



Şekil 4.1. ERIC-PZR Agaroz Jel Fotoğrafi (Devam) A19-A32 kodlu örnekler, M: Lambda HindIII DNA Marker (Promega,USA), (21.226bç, 5.148bç, 4.268bç, 3,530bç, 2,027bç, 1,904bç, 1,584bç, 1,357bç, 947bç, 831bç, 564 bç)

Salmonella izolatlarından elde edilen ERIC profilleri 160-3300 bç büyüklüğünde 13-22 adet banttandır oluşmaktadır. 250 bç büyüklüğündeki bant tüm izolatlarda bulunmaktadır.

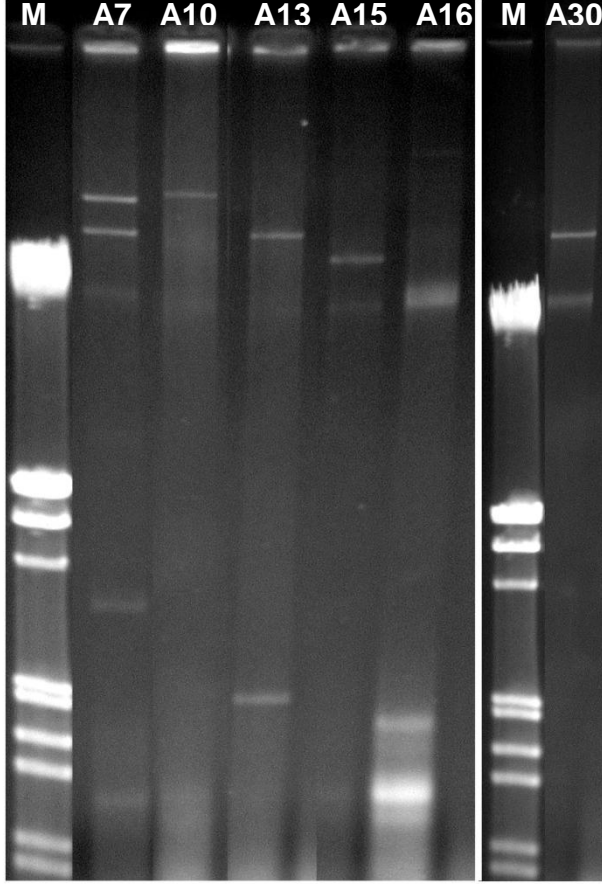
ERIC-PZR sonucu elde edilen bant profillerinin unweighted-pair group method (UPGMA) göre yapılan analizi sonucunda oluşturulan dendogram Şekil 4.2'de verilmiştir. Bu metodun serotip düzeyinde ayırım gücü değeri 0.33 olarak hesaplanmıştır. Infantis serotipine dahil 26 izolat 15, Enteritidis serotipine dahil 4 izolatın her biri ayrı gruplar oluşturmuşlardır. Suşların moleküler tiplendirmesi ile antibiyotik duyarlılıkları arasında bir korelasyona rastlanmamıştır.



Şekil 4.2. ERIC-PZR bant profiline göre oluşturulan dendrogram

4.2. Plazmid Analizi

32 *Salmonella* suşundan 26 tanesinin (%81.25) plazmid içermediği, 6 tanesinin (%18.75) ise büyüklükleri 1.2 ile 42.4 kb arasında değişen 1-3 adet plazmid taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Salmonella* izolatlarının plazmid profilleri. M: Lambda HindIII DNA Marker (Promega,USA), (21.226bç, 5.148bç, 4.268bç, 3,530bç, 2,027bç, 1,904bç, 1,584bç, 1,357bç, 947bç, 831bç).

Plazmid taşıyan izolatlardan 3 tanesi Enteritidis, 2 tanesi Infantis ve bir tanesi de Kentucky serotipine dahildir. Bu izolatların her birinin dahil olduğu serotipler, plazmid büyüklükleri ve antibiyotik direnç durumları Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Plazmid taşıyan izolatların dahil olduğu serotipler, plazmid büyüklükleri ve antibiyotik direnç durumları

Suş Kodu	Serotipi	Plazmid Büyüklükleri (kb)	Direnç Gösterdiği Antibiyotikler
A7	S. Enteritidis	31.6, 25.6, 2.6	SUL
A10	S. Kentucky	31.6	AMP, NAL, TET, CİP, TMP, SUL
A13	S. Enteritidis	25.6, 1.5	SUL
A15	S. Infantis	19.9	AMP, STR, NAL, TET, TMP, NEO, SUL, KAN
A16	S. Infantis	42.4, 1.5, 1.2	STR, NAL, TET, TMP, NEO, SUL, KAN
A30	S. Enteritidis	35.8	SUL

4.3. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

12 antibiyotik kullanılarak gerçekleştirilen antibiyotik duyarlılık testleri sonuçlarına göre 32 suştan 3 tanesi (%9.4) ampisiline, 27 tanesi (%84.4) streptomisine, 1 tanesi (%3.125) gentamisine, 26 tanesi (%81.25) nalidiksik aside, 25 tanesi (%78.1) tetrasikline, 2 tanesi (%6.25) siprofloksasine, 25 tanesi (%78.1) trimethoprime, 19 tanesi (%60.8) neomisine, 32 tanesi (%100) sulfonamid bileşiklerine ve 18 tanesi (%56.3) kanamisine karşı direnç göstermiştir. 32 suşun tamamının kloramfenikol ve ampisillin/sulbaktama karşı duyarlı olduğu saptanmıştır. Kullanılan antibiyotikler içerisinde streptomisin (256 µg/mL), nalidiksik asit (512 µg/mL), tetrasiklin (>512 µg/mL), trimethoprim (>512 µg/mL), sulfonilamid bileşikleri (>512 µg/mL), kanamisin (>512 µg/mL) ve neomisin (>512 µg/mL) için yüksek düzeyde direnç belirlenmiştir. İzolatların disk difüzyon metoduna göre elde edilen duyarlılık durumları ve çalışmada kullanılan antibiyotiklere karşı direnç düzeyleri sırasıyla Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te verilmiştir.

Antibiyotik duyarlılık testleri sonuçları izolatların 9 farklı direnç fenotipine sahip olduğunu göstermiştir ve 32 suştan 26 tanesinin (%81.3) çoklu ilaç dirençliliği (en az 3 antibiyotiğe karşı dirençlilik) sergilediği tespit edilmiştir.

Tablo 4.3. *Salmonella* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları (Disk Difüzyon Metodu)

Antibiyotikler ve Zon Çapları (mm)												
Suş Kodu	CHL	AMP	STR	GEN	NAL	TET	CİP	TMP	SAM	NEO	SUL	KAN
A1	18,34-S	17,73-S	8,17-R	22,36-S	0-R	0-R	20,12-S	0-R	19,85-S	0-R	0-R	0-R
A2	18,28-S	18,80-S	9,04-R	23,95-S	0-R	0-R	20,05-S	0-R	19,25-S	0-R	0-R	0-R
A3	23,52-S	20,48-S	8,97-R	22,84-S	0-R	0-R	20,11-S	0-R	20,03-S	10,46-R	0-R	24,29-S
A4	25,61-S	19,86-S	9,65-R	16,28-S	0-R	0-R	20,36-S	0-R	21,27-S	19,68-S	0-R	25,07-S
A5	22,30-S	19,09-S	8,61-R	22,41-S	0-R	0-R	18,47-S	0-R	20,88-S	0-R	0-R	0-R
A6	22,42-S	19,40-S	9,60-R	24,08-S	0-R	0-R	19,59-S	0-R	22,55-S	0-R	0-R	0-R
A7	27,25-S	23,70-S	21,50-S	24,60-S	20,55-S	22,76-S	33,94-S	27,40-S	24,85-S	18,15-S	0-R	24,63-S
A8	23,16-S	20,89-S	9,71-R	24,16-S	0-R	0-R	19,48-S	0-R	22,09-S	18,39-S	0-R	24,97-S
A9	23,50-S	23,05-S	9,68-R	19,38-S	0-R	0-R	21,07-S	0-R	24,05-S	0-R	0-R	0-R
A10	30,91-S	0-R	13,22-I	24,23-S	0-R	0-R	14,43-R	0-R	22,86-S	20,73-S	0-R	28,21-S
A11	23,60-S	24,05-S	14,20-I	18,04-S	0-R	24,06-S	23,69-S	26,25-S	23,43-S	15,50-S	0-R	20,03-S
A12	26,79-S	23,98-S	0-R	20,27-S	0-R	0-R	22,66-S	0-R	25,19-S	17,14-S	0-R	22,18-S
A13	25,77-S	23,67-S	17,21-S	20,21-S	22,67-S	22,76-S	27,87-S	28,31-S	24,50-S	20,67-S	8-R	21,65-S
A14	26,50-S	24,30-S	10,22-R	20,02-S	0-R	0-R	22,74-S	0-R	24,56-S	0-R	0-R	0-R
A15	23,94-S	0-R	10,23-R	20,23-S	0-R	0-R	22,17-S	0-R	22,10-S	0-R	0-R	0-R
A16	22,40-S	23,20-S	9,72-R	20,92-S	0-R	0-R	22,29-S	0-R	23,78-S	0-R	0-R	0-R
A17	24,60-S	22,31-S	13,88-I	18,04-S	20,98-S	21,61-S	28,66-S	27,21-S	21,16-S	16,97-S	0-R	19,59-S

CHL: Kloramfenikol, AMP: Ampisilin, STR: Streptomisin, GEN: Gentamisin, NAL: Nalidiksik Asit, TET: Tetrasiklin, CİP: Siprofloksasin, TMP: Trimethoprim, SAM: Ampisilin/Sulbaktam, NEO: Neomisin, SUL: Sulfonamid, KAN: Kanamisin. R: Dirençli, I: Orta Dirençli, S: Duyarlı.

Tablo 4.3. *Salmonella* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları (Disk Difüzyon Metodu) (devam)

Antibiyotikler ve Zon Çapları (mm)												
Suş Kodu	CHL	AMP	STR	GEN	NAL	TET	CİP	TMP	SAM	NEO	SUL	KAN
A18	22,06-S	18,25-S	8,94-R	23,50-S	0-R	0-R	21,61-S	0-R	20,37-S	21,80-S	0-R	18,85-S
A19	27,30-S	19,87-S	8,95-R	17,67-S	0-R	0-R	22,32-S	0-R	12,40-S	0-R	0-R	0-R
A20	25,78-S	20,32-S	8,46-R	17,08-S	0-R	0-R	21,39-S	23,73-S	24,51-S	20,09-S	0-R	19,66-S
A21	22,46-S	17,06-S	8,89-R	17,06-S	0-R	0-R	19,06-S	0-R	21,59-S	0-R	0-R	0-R
A22	23,18-S	21,61-S	13,24-I	19,89-S	21,15-S	20,52-S	26,75-S	25,05-S	21,26-S	14,60-S	0-R	18,88-I
A23	22,41-S	18,38-S	8,81-R	17,47-S	0-R	0-R	19,29-S	0-R	20,01-S	0-R	0-R	0-R
A24	21,01-S	19,26-S	9,12-R	19,12-S	0-R	0-R	21,79-S	0-R	18,79-S	18,11-S	0-R	19,87-I
A25	24,57-S	20,28-S	8,21-R	18,44-S	0-R	0-R	23,03-S	0-R	24,96-S	0-R	0-R	0-R
A26	22,13-S	17,90-S	0-R	16,29-S	0-R	0-R	21,45-S	0-R	23,11-S	0-R	0-R	0-R
A27	23,57-S	20,57-S	0-R	16,62-S	0-R	0-R	21,80-S	0-R	22,24-S	0-R	0-R	0-R
A28	20,88-S	20,16-S	0-R	17,01-S	0-R	0-R	21,71-S	0-R	19,87-S	0-R	0-R	0-R
A29	20,34-S	18,72-S	9,40-R	18,48-S	0-R	0-R	18,56-S	0-R	22,28-S	0-R	0-R	0-R
A30	26,57-S	21,22-S	15-S	18,58-S	20,14-S	21,31-S	23,17-S	24,26-S	24,05-S	19,35-S	0-R	20,90-S
A31	23,12-S	19,75-S	9,65-R	17,07-S	0-R	0-R	18,90-S	0-R	20,16-S	0-R	0-R	0-R
A32	19-S	12-R	0-R	9,83-R	0-R	9-R	13,92-R	0-R	20,05-S	0-R	0-R	0-R

CHL: Kloramfenikol, AMP: Ampisilin, STR: Streptomisin, GEN: Gentamisin, NAL: Nalidiksik Asit, TET: Tetrasiklin, CİP: Siprofloksasin, TMP: Trimethoprim, SAM: Ampisilin/Sulbaktam, NEO: Neomisin, SUL: Sulfonamid, KAN: Kanamisin. R: Dirençli, I: Orta Dirençli, S: Duyarlı.

Tablo 4.4. *Salmonella* Suşlarının Antibiyotiklere Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları

Suş Kodu	Antibiyotikler (µg/mL)										
	CHL	AMP	STR	GEN	NAL	TET	CİP	TMP	NEO	SUL	KAN
A1	8	<4	256	<4	512	512	<1	>512	512	>512	512
A2	8	<4	512	<4	512	512	<1	>512	512	>512	512
A3	8	<4	128	<4	512	256	<1	>512	>512	>512	<4
A4	<4	<4	256	<4	512	256	<1	>512	<4	>512	<4
A5	<4	<4	256	<4	512	512	<1	>512	512	>512	512
A6	8	<4	256	<4	512	>512	<1	>512	512	>512	512
A7	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<1	<4	<4	>512	<4
A8	<4	<4	64	<4	512	256	<1	>512	<4	>512	<4
A9	4	<4	256	<4	512	256	<1	>512	256	>512	>512
A10	<4	512	128	<4	256	256	8	>512	<4	>512	<4
A11	<4	<4	64	<4	512	<4	<1	<4	<4	>512	8
A12	4	<4	256	<4	512	256	<1	>512	<4	>512	8
A13	<4	<4	16	<4	<4	<4	<1	<4	<4	>512	<4
A14	<4	<4	256	<4	512	256	1	>512	256	>512	>512
A15	8	>512	256	<4	512	256	<1	>512	256	>512	>512
A16	<4	<4	256	<4	512	256	<1	>512	256	>512	512
A17	<4	<4	16	<4	<4	<4	<1	<4	<4	>512	<4
A18	<4	<4	256	<4	512	256	<1	>512	<4	>512	32
A19	<4	<4	256	<4	512	256	<1	>512	512	>512	>512
A20	<4	<4	256	<4	512	256	<1	<4	<4	>512	<4

CHL: Kloramfenikol, AMP: Ampisilin, STR: Streptomisin, GEN: Gentamisin, NAL: Nalidiksik Asit, TET: Tetrasiklin, CİP: Siprofloksasin, TMP: Trimethoprim, SAM: Ampisilin/Sulbaktam, NEO: Neomisin, SUL: Sulfonamid, KAN: Kanamisin.

Tablo 4.4. *Salmonella* Suşlarının Antibiyotiklere Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (Devam)

Suş Kodu	Antibiyotikler (µg/mL)										
	CHL	AMP	STR	GEN	NAL	TET	CİP	TMP	NEO	SUL	KAN
A21	<4	<4	128	<4	512	512	<1	>512	256	>512	>512
A22	<4	<4	64	<4	<4	<4	<1	<4	<4	>512	8
A23	8	<4	256	<4	512	512	1	>512	512	>512	512
A24	<4	<4	256	<4	512	256	<1	>512	<4	>512	8
A25	<4	<4	256	<4	512	128	<1	>512	512	>512	512
A26	<4	<4	256	<4	512	128	<1	>512	512	>512	512
A27	<4	<4	128	<4	512	256	<1	>512	512	>512	512
A28	<4	<4	256	<4	512	256	<1	>512	256	>512	512
A29	<4	<4	256	<4	256	256	<1	>512	256	>512	512
A30	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<1	<4	<4	>512	<4
A31	<4	<4	256	<4	512	512	<1	>512	256	>512	512
A32	<4	>512	512	64	512	512	4	>512	256	>512	>512

CHL: Kloramfenikol, AMP: Ampisilin, STR: Streptomisin, GEN: Gentamisin, NAL: Nalidiksik Asit, TET: Tetrasiklin, CİP: Siprofloksasin, TMP: Trimethoprim, SAM: Ampisilin/Sulbaktam, NEO: Neomisin, SUL: Sulfonamid, KAN: Kanamisin.

4.4. *Caenorhabditis elegans* Patojenite Denemeleri

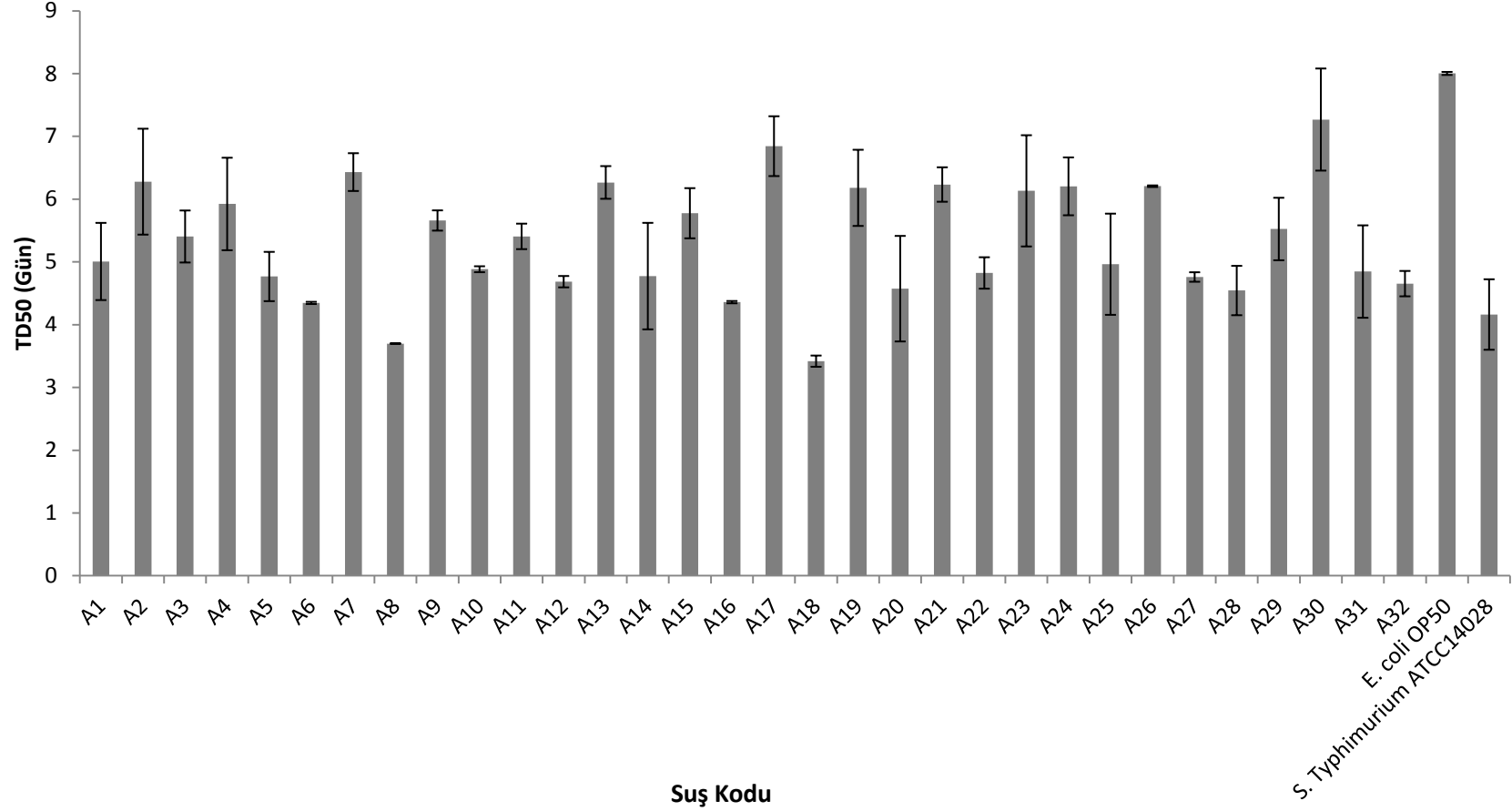
C. elegans hayvan deney modeli kullanılarak gerçekleştirilen sağkalım analizlerinde hesaplanan TD50 (nematodların %50'sinin ölmesi için geçen gün) değerleri pozitif kontrol olarak kullanılan *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşu ile beslenen nematod grubu için 4.2 ± 0.5 gün, negatif kontrol olarak kullanılan *E. coli* OP50 suşu ile beslenen nematod grubu için ise 8.0 ± 0.02 gün olarak hesaplanmıştır. Çalışmada kullanılan diğer gıda kökenli *Salmonella* izolatları ile beslenen nematod grupları için ise TD50 değerleri 3.4-7.3 gün arasında belirlenmiştir (Tablo 4.5, Şekil 4.4). Deney süresince 24 saatte bir yapılan sayımlardaki her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı EK-A'da verilmiştir.

S. Typhimurium ATCC 14028 suşunun kullanıldığı pozitif kontrol grubundan elde edilen TD50 değeri ile deney gruplarından elde edilen TD50 değerleri karşılaştırılmış ve aralarındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı t-test ile ($p < 0.05$) analiz edilmiştir. Sonuçlar, Infantis serotipine dahil 6 ve Enteritidis serotipine dahil 4, toplam 10 izolatın (%31.25) yer aldığı deney gruplarından hesaplanan TD50 değerleri ile daha önce bu model sistemde patojenitesi belirlenmiş olan *S. Typhimurium* ATCC 14028 kontrol suşunun kullanıldığı deney grubundan elde edilen TD50 değerleri arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir ($p < 0.05$). Bu izolatların *C. elegans* için patojen olmadığı belirlenmiştir. Infantis, Kentucky ve Telaviv serotiplerine ait izolatları içeren diğer 22 izolatın (%67.75) dahil olduğu deney gruplarından elde edilen TD50 değerleri ile *S. Typhimurium* ATCC 14028 kontrol suşu ile elde edilen TD50 değerleri arasında ise anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiş ($p < 0.05$) ve bu gruba dahil olan izolatlar da *C. elegans* için patojen olarak tanımlanmışlardır.

Tablo 4.5. *Salmonella* serotiplerinin nematod sağkalım analizinde elde edilen TD50 değerleri

Suş Kodu	Serotip	TD50 (gün)	Suş Kodu	Serotip	TD50 (gün)
A1	Infantis	5.0±0.61*	A17	Enteritidis	6.8±0.47
A2	Infantis	6.3±0.84	A18	Infantis	3.4±0.08*
A3	Infantis	5.4±0.41*	A19	Infantis	6.2±0.6
A4	Infantis	5.9±0.73*	A20	Infantis	4.6±0.84*
A5	Infantis	4.8±0.39*	A21	Infantis	6.2±0.27
A6	Infantis	4.3±0.01*	A22	Telaviv	4.8±0.25*
A7	Enteritidis	6.4±0.3	A23	Infantis	6.1±0.88
A8	Infantis	3.7±0.005*	A24	Infantis	6.2±0.46
A9	Infantis	5.7±0.16*	A25	Infantis	4.9±0.80*
A10	Kentucky	4.9±0.04*	A26	Infantis	6.2±0.01
A11	Infantis	5.4±0.20*	A27	Infantis	4.8±0.07*
A12	Infantis	4.7±0.09*	A28	Infantis	4.5±0.39*
A13	Enteritidis	6.3±0.26	A29	Infantis	5.5±0.49*
A14	Infantis	4.8±0.84*	A30	Enteritidis	7.3±0.81
A15	Infantis	5.7±0.39*	A31	Infantis	4.8±0.73*
A16	Infantis	4.4±0.01*	A32	Infantis	4.7±0.2*

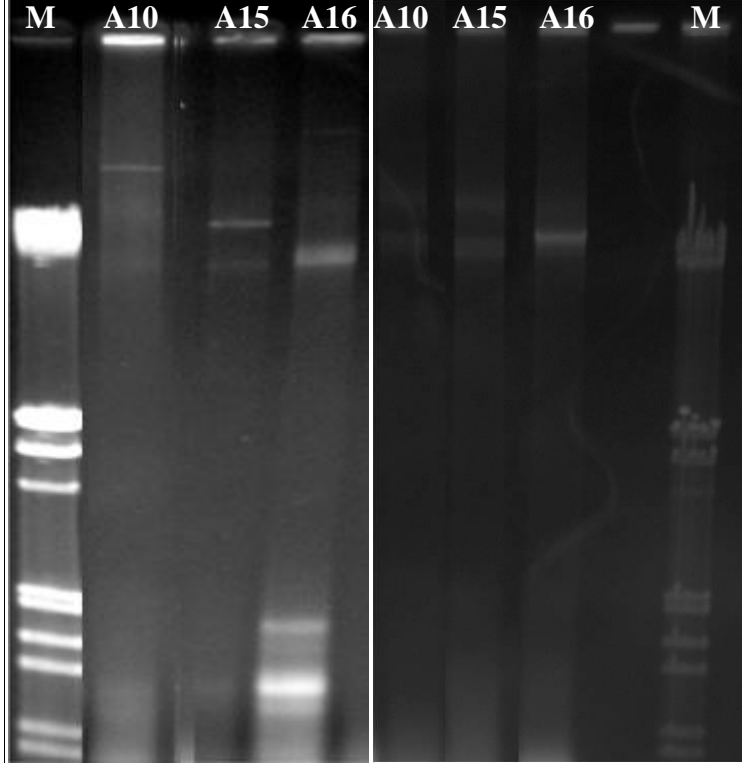
TD50: nematodların %50'sinin ölmesi için geçen zaman, * TD50 verilerinin *S. Typhimurium* ATCC14028 ile arasında anlamlı fark ($p<0.05$) bulunmayan *C. elegans* için patojen olarak tanımlanan izolatlar.



Şekil 4.4. *C. elegans* model sistem kullanılarak gerçekleştirilen sağkalım analizi sonucu hesaplanan TD50 verilerini içeren sütun grafiği (A1-A32: *Salmonella enterica* izolatları, *E. coli* OP50: patojen olmadığı gösterilmiş suş, negatif kontrol suşu, *S. Typhimurium* ATCC14028: patojen olduğu gösterilmiş suş, pozitif kontrol suşu).

4.5. Plazmidlerin *Salmonella* suşları için *Caenorhabditis elegans* Patojenitesi ve Antibiyotik Duyarlılığındaki Rollerinin Araştırılması

Plazmidleri giderilen izolatların taşıdığı plazmidleri ve plazmidlerinin giderildiğini belirleyen agaroz jel fotoğrafı Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. Plazmid taşıyan ve plazmidi giderilen izolatların agaroz jel fotoğrafı. M: Lambda HindIII DNA Marker (Promega,USA), (21.226bç, 5.148bç, 4.268bç, 3,530bç, 2,027bç, 1,904bç, 1,584bç, 1,357bç, 947bç, 831bç).

Plazmid giderme ajanı olarak kullanılan Et-Br'ün çalışma öncesi gerçekleştirilen yıkama işlemi ile uzaklaştırıldığı ve nematodların yaşam süreleri üzerinde etkisinin olmadığını belirlemek amacıyla kontrol olarak Et-Br içeren LB broth ortamında geliştirilen *E. coli* OP50 suşu kullanılmıştır. Sağkalım analizlerinde hesaplanan TD50 değeri Et-Br içermeyen besiyerinde geliştirilen *E. coli* OP50 suşu ile beslenen nematod grubu için 8.00 ± 0.02 gün, Et-Br içeren LB broth ortamında geliştirilen *E. coli* OP50 suşu ile beslenen nematod grubu için 7.8 ± 0.45 gün olarak hesaplanmıştır ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Deney süresince 24 saatte bir yapılan sayımlardaki her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı EK-B'de verilmiştir. Deneyde kullanılan plazmid taşıyan ve plazmidi giderilmiş izolatlar ile

beslenen nematod grupları için belirlenen TD50 verileri ve aralarında anlamlı fark olup olmadığı Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Plazmid taşıyan ve plazmidi giderilen *Salmonella* izolatları kullanılarak gerçekleştirilen *C. elegans* patojenite denemeleri sonucunda elde edilen TD50 verileri

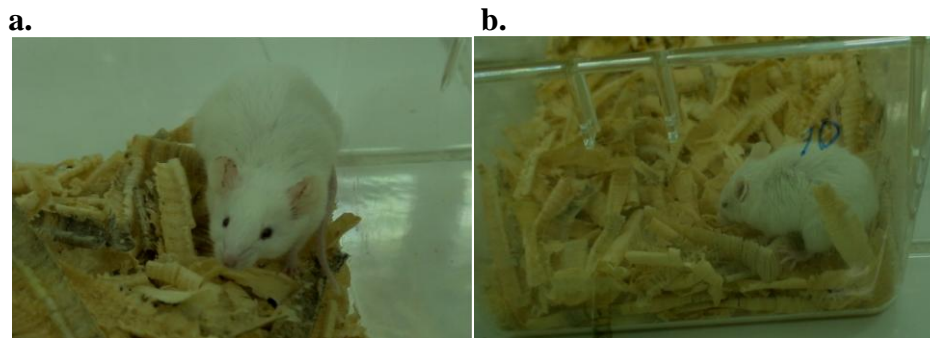
Suş Kodu	TD50 (gün) (Plazmid Taşıyan)	TD50 (gün) (Plazmidi Giderilmiş)
A10	4.9±0.04	6.2±0.1*
A15	5.7±0.39	5.8±0.16
A16	4.4±0.01	6.2±0.2*
Kontrol grubu	Et-Br içermeyen LB broth ortamında geliştirilen	Et-Br içeren LB broth ortamında geliştirilen
<i>E. coli</i> OP50	8.00±0.02	7.8±0.45

TD50: nematodların %50'sinin ölmesi için geçen zaman, *Plazmid taşıyan ve plazmidi giderilmiş izolatlar ile beslenen nematod gruplarından hesaplanan TD50 verileri arasında anlamlı fark ($p<0.05$) bulunan izolatlar

İzolatların plazmid giderme işlemi öncesi dirençli oldukları antibiyotiklerin minimum inhibisyon konsantrasyonları ile plazmid giderme işlemi sonrası elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyonları arasında bir farka rastlanmamıştır.

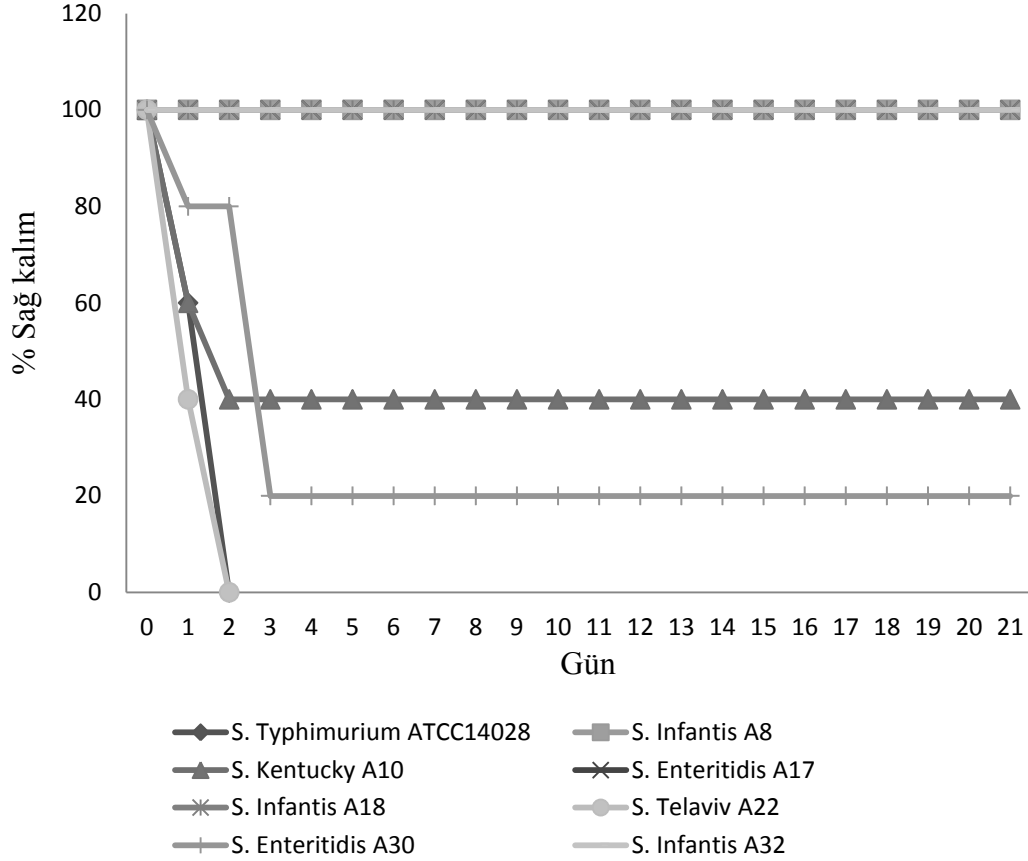
4.6. BALB/c Fare Denemeleri

21 günlük deney süresince yapılan gözlemlerde farelerdeki hareketlerde azalma, uyuşukluk (letarji), bozulmuş kürk yapısı ve kambur duruş hastalık belirtisi olarak kabul edilmiştir. Enjeksiyon (i.p.) sonrası sağlıklı kalan ve hastalık belirtisi gösteren farelerin fotoğrafları Şekil 4.6'da verilmiştir.



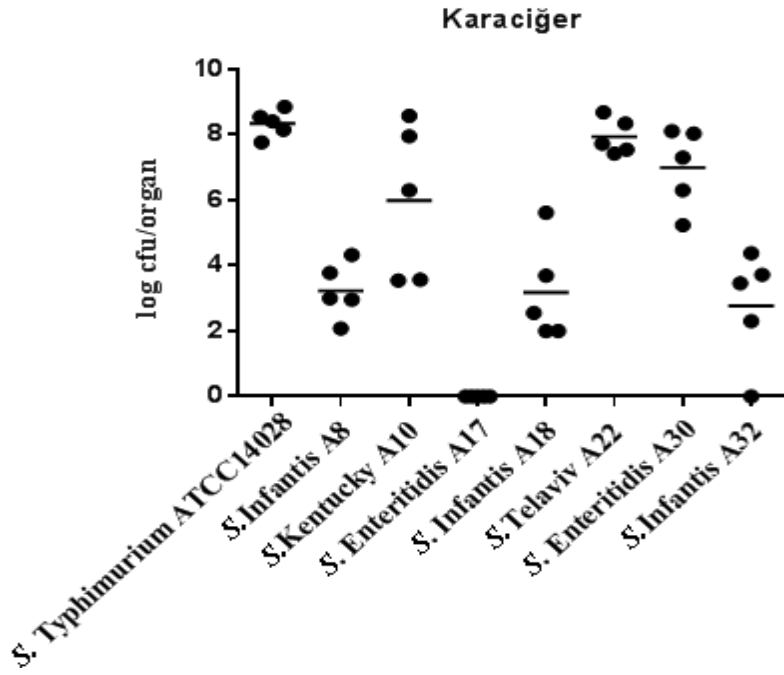
Şekil 4.6. a. Sağlıklı, b. Hastalık belirtisi gözlemlenen fare fotoğrafları

Deney süresince her gün yapılan kontrollerde o güne ait sağlıklı kalan ve hastalık belirtisi göstermesi sonucu ötenazi uygulanan fare sayıları EK-D' de verilmiştir. Deney sonucu elde edilen sağkalım yüzdesine ait grafik Şekil 4.7'de verilmiştir.

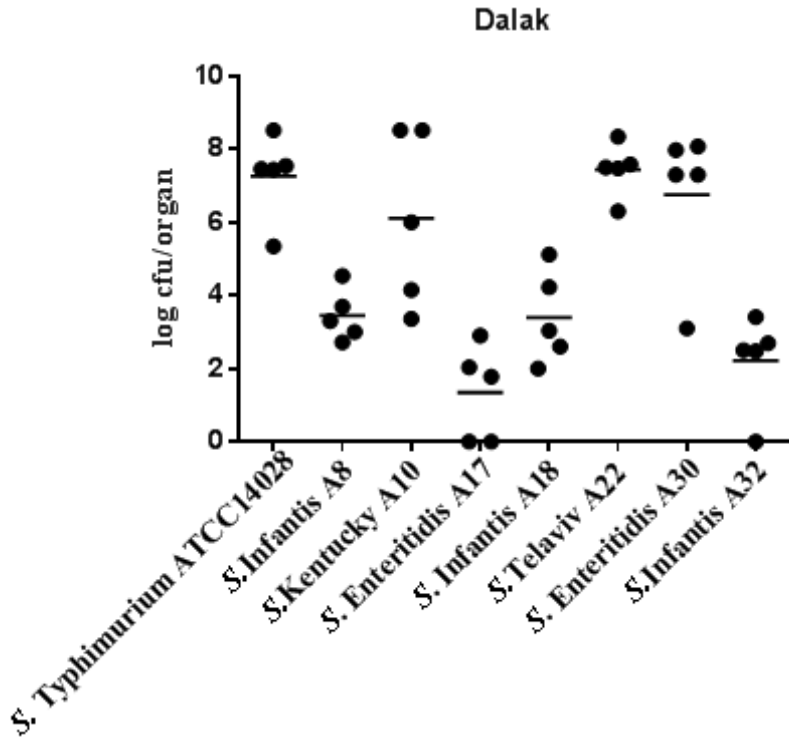


Şekil 4.7. 21 günlük deney süresince her bir deney grubu için sağkalım yüzdeleri

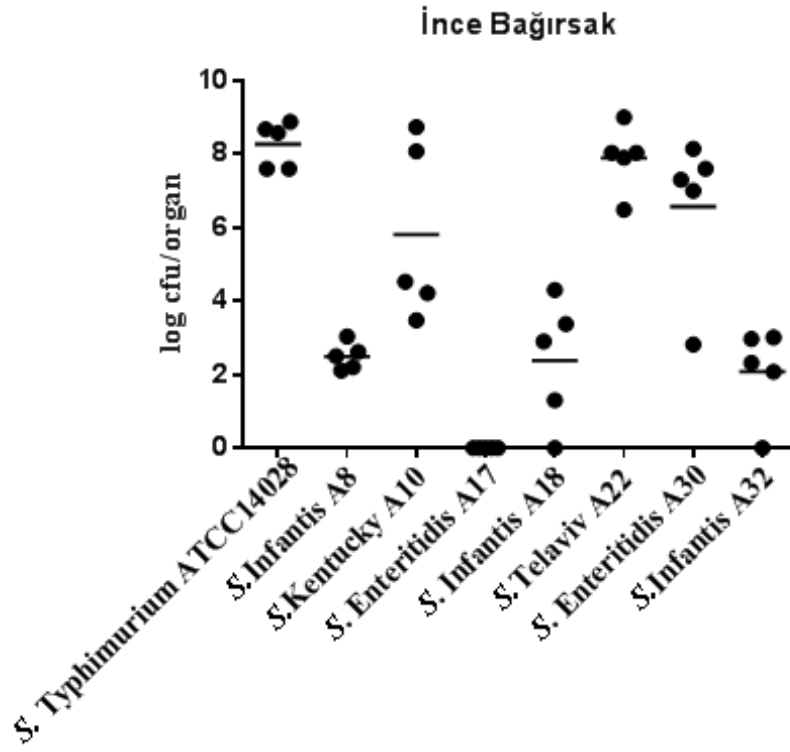
Deney süresince hastalık belirtisi gözlemlenmesi sonucu veya deney süresi sonunda sakrifiye edilen farelerden alınan dalak, karaciğer, ince bağırsak, kalın bağırsak ve çekum için organ başına kolonizasyon miktarları belirlenmiştir (EK-E). Her bir izolatanın i.p. olarak enjekte edildiği deney grubunda yer alan farelerdeki kolonizasyon miktarını ve ortalama kolonizasyon miktarını gösteren grafik Şekil 4.8'de verilmiştir.



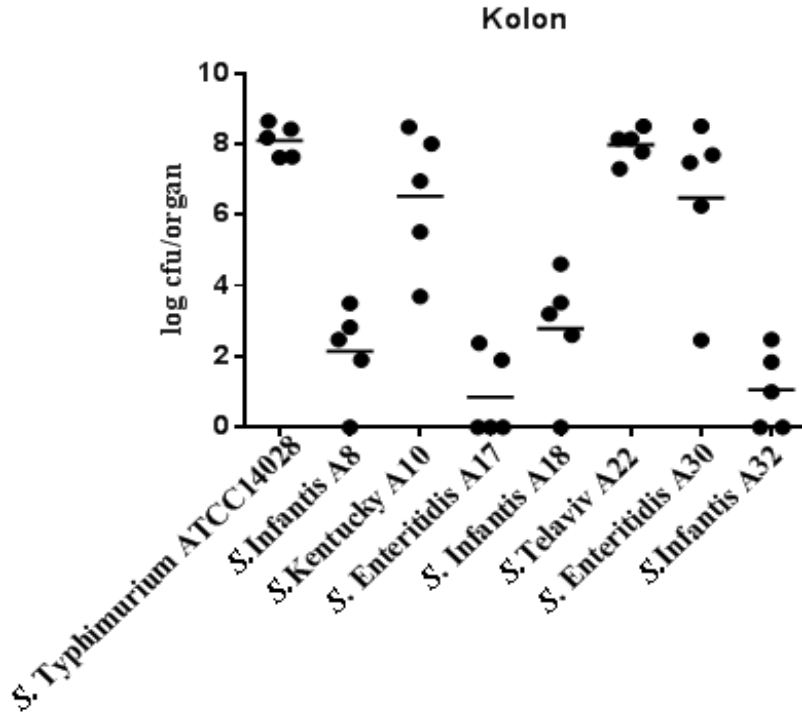
Şekil 4.8.a. Deney süresince farelerin karaciğer dokularında belirlenen kolonizasyon miktarları (log cfu/organ). Yatay çizgi her bir izolata ait dokudaki ortalama kolonizasyon miktarını göstermektedir.



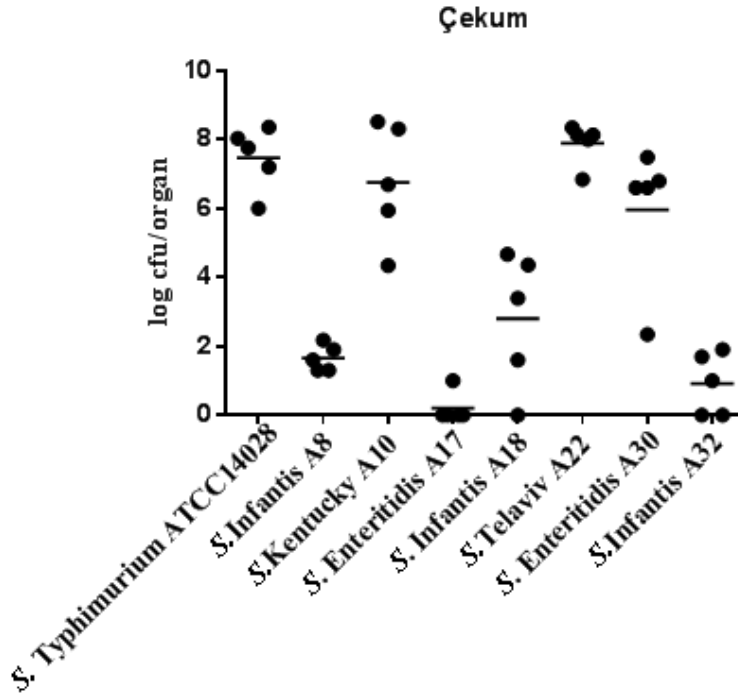
Şekil 4.8.b. Deney süresince farelerin dalak dokularında belirlenen kolonizasyon miktarları (log cfu/organ). Yatay çizgi her bir izolata ait dokudaki ortalama kolonizasyon miktarını göstermektedir.



Şekil 4.8.c. Deney süresince farelerin ince bağırsak dokularında belirlenen kolonizasyon miktarları (log cfu/organ). Yatay çizgi her bir izolata ait dokudaki ortalama kolonizasyon miktarını göstermektedir.



Şekil 4.8.d. Deney süresince farelerin kolon dokularında belirlenen kolonizasyon miktarları (log cfu/organ). Yatay çizgi her bir izolata ait dokudaki ortalama kolonizasyon miktarını göstermektedir.



Şekil 4.8.e. Deneş süresince farelerin çekum dokularında belirlenen kolonizasyon miktarları (log cfu/organ). Yatay çizgi her bir izolata ait dokudaki ortalama kolonizasyon miktarını göstermektedir.

Dokulardaki kolonizasyon miktarları arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı one-way ANOVA testi ile analiz edilmiştir ($p < 0.05$). Sonuçlar ilk iki gün içerisinde tüm farelerin hastalık belirtisi gösterdiği ve sakrifiye edildiği kontrol grubu olan *S. Typhimurium* ATCC1402 ve *S. Telaviv* (A22) izolatlarının enjekte edildiği farelerin örneklenen tüm dokularındaki (karaciğer, dalak, ince bağırsak, kolon ve çekum) kolonizasyon miktarı ile hastalık belirtisi göstermeyerek 21 günlük deney süresinin tamamlanmasının ardından sakrifiye edilen *S. Infantis* (A8, A18, A32) ve *S. Enteritidis* (A17) izolatlarının enjekte edildiği farelerin dokularında belirlenen kolonizasyon miktarları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir ($p < 0.05$). Bununla birlikte, ilk iki gün içerisinde 3 farenin hastalık belirtisi gösterdiği ve sakrifiye edildiği *S. Kentucky* (A10) izolatlarının enjekte edildiği farelerin kolon ve çekumlarındaki ve ilk üç gün içerisinde 4 farenin hastalık belirtisi gösterdiği ve sakrifiye edildiği *S. Enteritidis* (A30) izolatlarının enjekte edildiği farelerin karaciğerindeki kolonizasyon miktarları ile *S. Infantis* (A8, A18, A32), *S. Enteritidis* (A17) izolatlarının enjekte edildiği farelerin dokularında belirlenen kolonizasyon

miktarları arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Her bir dokudaki ortalama kolonizasyon miktarı ve standart sapma değerleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Dokulardaki ortalama kolonizasyon

	Dokulardaki Ortalama Kolonizasyon (log cfu/organ±std sapma)				
	Karaciğer	Dalak	İnce Bağırsak	Kolon	Çekum
S. Typhimurium ATCC14028	8,348±0,41	7,264±1,16	8,268±0,62	8,099±0,46	7,474±0,93
S. Infantis (A8)	3,230±0,86	3,452±0,71	2,497±0,37	2,142±1,33	1,656±0,38
S. Kentucky (A10)	5,990±2,37	6,110±2,4	5,809±2,42	6,530±1,95	6,763±1,73
S. Enteritidis (A17)	0±0	1,342±1,29	0±0	0,856±1,19	0,2±0,45
S. Infantis (A18)	3,175±1,53	3,399±1,26	2,377±1,72	2,787±1,72	2,806±1,97
S. Telaviv (A22)	7,948±0,54	7,44±0,73	7,895±0,9	7,975±0,46	7,892±0,6
S. Enteritidis (A30)	6,999±1,23	6,751±2,07	6,573±2,14	6,479±2,39	5,966±2,06
S. Infantis (A32)	3,466±0,87	2,773±0,44	2,594±0,47	1,330±1,07	1,150±0,86

Dokulardaki kolonizasyon miktarları göz önüne alındığında, kontrol grubu olarak kullanılan *S. Typhimurium* ATCC14028 ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı ve deney süresince farelerde hastalık belirtilerine yol açan *S. Telaviv* (A22), *S. Kentucky* (A10) ve *S. Enteritidis* (A30) izolatları BALB/c fare model sistem için patojen olarak tanımlanırken, deney süresince farelerde hastalık belirtisine yol açmayan ve doku kolonizasyon miktarları bakımından *S. Typhimurium* ATCC14028 ile arasında anlamlı bir farklılık olan *S. Infantis* (A8, A18, A32), *S. Enteritidis* (A17) izolatlarının BALB/c fare model sistem için patojen olmadığı belirlenmiştir. Bu izolatların BALB/c fare model sisteminde ve *C. elegans* nematod model sisteminde belirlenen patojenite fenotipleri Tablo 4.8'de gösterilmiştir. Bu iki model sistem izolatların patojeniteleri bakımından karşılaştırıldığında *S. Kentucky* (A10) ve *S. Telaviv* (A22) her iki model sistem için de patojen, *S. Enteritidis* (A17) her iki model sistem için de patojen değil, 3 *S. Infantis* (A8, A18, A32) izolatu *C. elegans* için patojen BALB/c fare için patojen değil, *S. Enteritidis* (A30) *C. elegans* için patojen BALB/c fare için patojen değil olarak tanımlanmıştır.

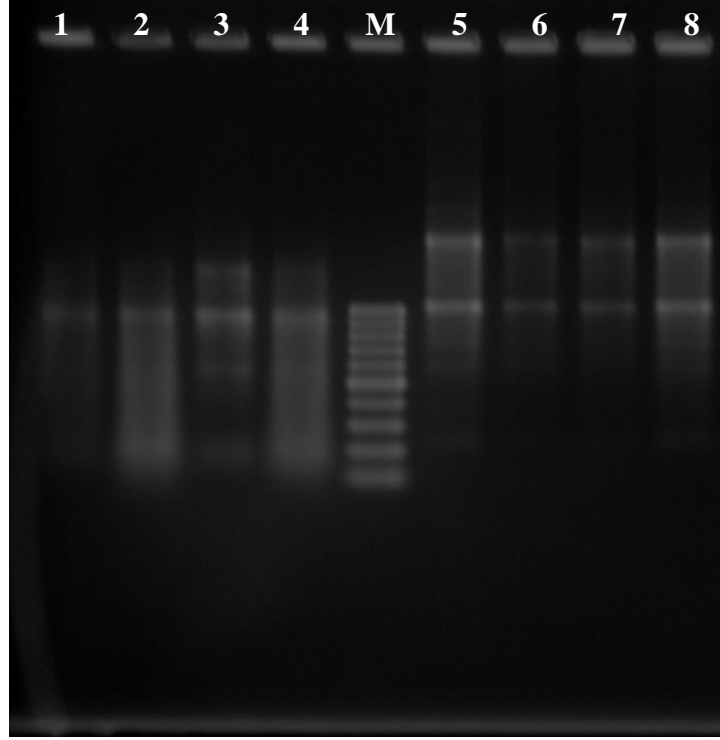
Tablo 4.8. *Salmonella* izolatlarının BALB/c fare model sisteminde ve *C. elegans* nematod model sisteminde belirlenen patojenite fenotipleri.

	<i>C. elegans</i> Nematod Model Sistemi	BALB/c Fare Model Sistemi
S.Typhimurium ATCC14028	+	+
S.Infantis (A8)	+	-
S.Kentucky (A10)	+	+
S.Enteritidis (A17)	-	-
S.Infantis (A18)	+	-
S.Telaviv (A22)	+	+
S.Enteritidis (A30)	-	+
S.Infantis (A32)	+	-

+: Belirtilen model sistem için patojen olarak tanımlanan suşlar, -: Belirtilen model sistem için patojen olmadığı tanımlanan suşlar. Suşların patojenite durumları her bir izolat için *C. elegans*'da hesaplanan TD50 değerlerinin, BALB/c fare sistemi için ise fare dokularındaki kolonizasyon miktarlarının *S. Typhimurium* ATCC14028 ile elde edilen değerler ile karşılaştırıldığındaki anlamlılık ($p < 0.05$) derecelerine göre belirlenmiştir.

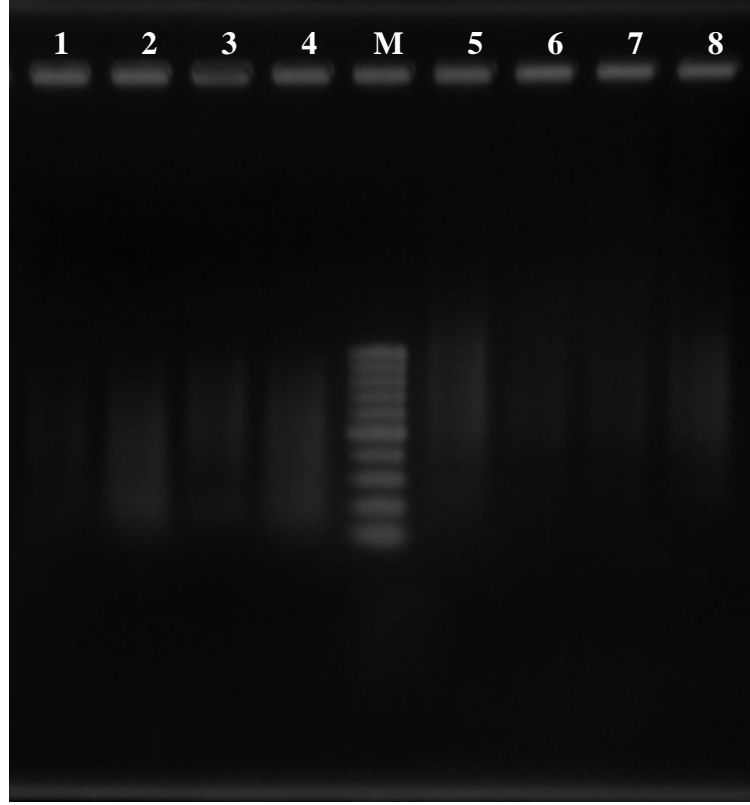
4.9. Virülans Genlerinin Ekspresyonunun BALB/c Fare ve *Caenorhabditis elegans* Nematod Model Sisteminde Belirlenmesi

S. Kentucky (A10), *S. Enteritidis* (A17), *S. Telaviv* (A22) ve *S. Infantis* (A32) izolatlarında BALB/c fare ve *C. elegans* nematod model sisteminde invazyon (*invA*), fimbriyal (*fimA*) ve enterotoksin (*stn*) genlerinin ekspresyonu bakımından fark olup olmadığının belirlenmesi için ilk olarak BALB/c fare denemelerinde farelerden ötanazi sırasında alınan kan örneklerinden ve *C. elegans* patojenite denemeleri sonucu *Salmonella* suşlarına maruz bırakılmalarının ardından 6. günde geri kazanılan suşlardan total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen total RNA bantlarını gösteren agaroz jel fotoğrafı Şekil 4.9'da verilmiştir.



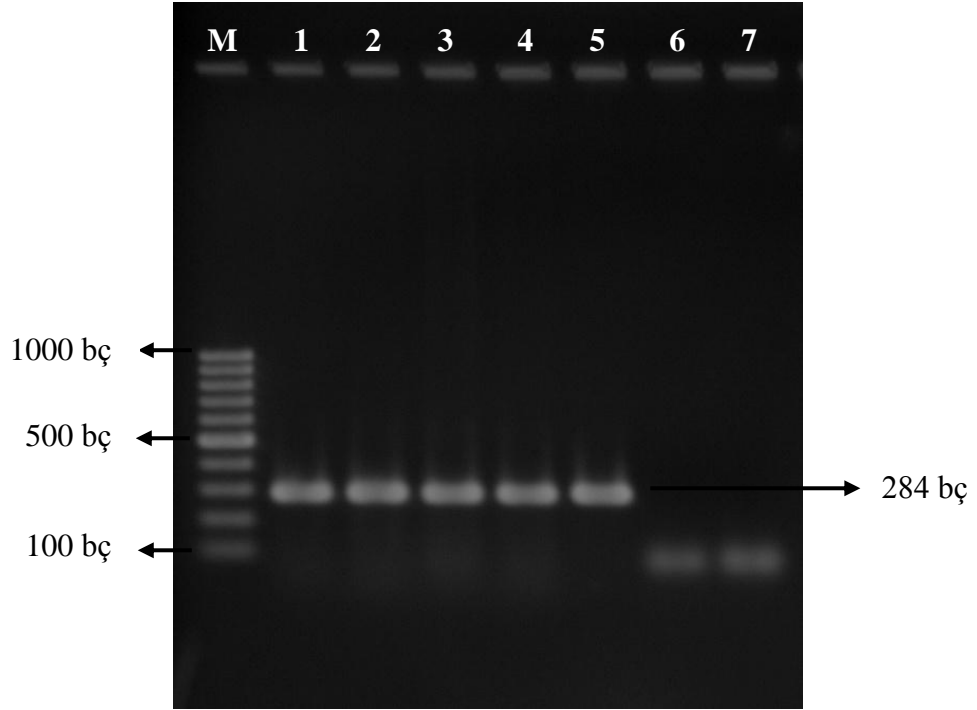
Şekil 4.9. Total RNA izolasyonu. 1-4. kuyular; *C. elegans*' tan geri kazanılan *Salmonella* suşlarından izole edilen total RNA, 5-8. kuyular; BALB/c fare denemelerinde alınan kan örneklerinden izole edilen total RNA. 1: A10, 2:A17, 3:A22, 4:A32, 5:A10, 6:A17, 7:A22, 8:A32, M: Gene Ruler 100 bp DNA Marker (Fermentas, Finland) (100bç, 200bç, 300bç, 400bç, 500bç, 600bç, 700bç, 800bç, 900bç 1000bç)

Elde edilen total RNA örnekleri kullanılarak ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonunda kalıp olarak kullanılacak olan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen cDNA örneklerini gösteren agaroz jel fotoğrafı Şekil 4.10'da verilmiştir.

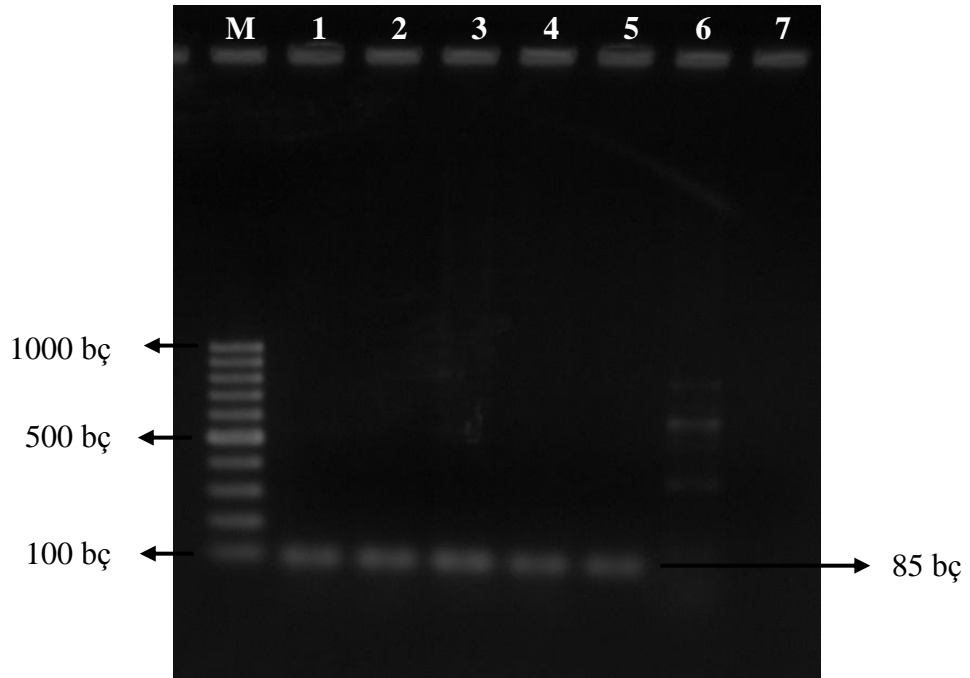


Şekil 4.10. cDNA sentezi. 1-4. kuyular; *C. elegans*' tan geri kazanılan *Salmonella* suşlarından izole edilen total RNA' dan sentezlenen cDNA, 5-8. kuyular; BALB/c fare denemelerinde alınan kan örneklerinden izole edilen total RNA' dan sentezlenen cDNA. 1: A10, 2:A17, 3:A22, 4:A32, 5:A10, 6:A17, 7:A22, 8:A32, M: Gene Ruler 100 bp DNA Marker (Fermentas, Finland) (100bç, 200bç, 300bç, 400bç, 500bç, 600bç, 700bç, 800bç, 900bç 1000bç)

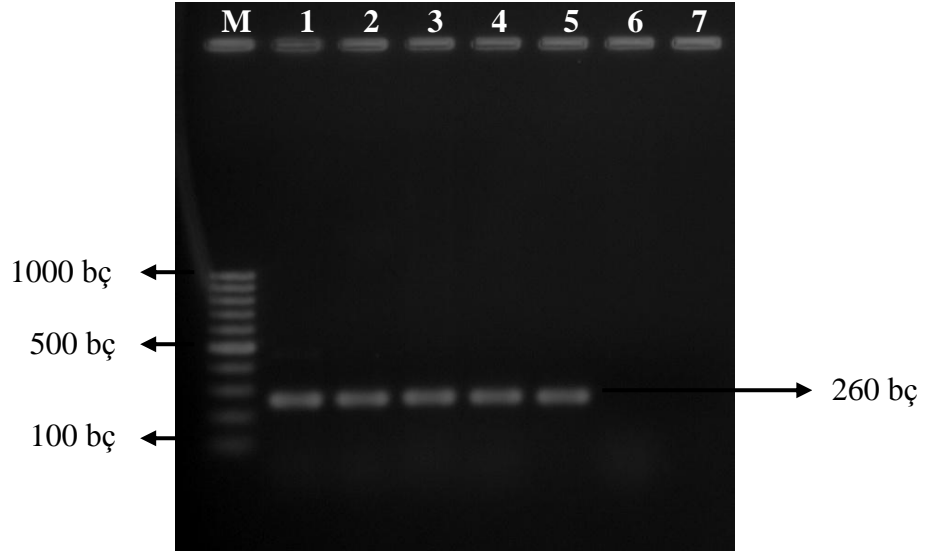
Elde edilen cDNA'ların kalıp olarak kullanılacağı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu işlemine geçmeden önce invazyon (*invA*), fimbriyal (*fimA*) ve enterotoksin (*stn*) genlerinin *Salmonella* izolatlarının genomunda varlığını göstermek ve PZR koşullarını optimize etmek için öncelikle PZR işleminde kalıp olarak gDNA örnekleri kullanılmıştır. PZR işleminde pozitif kontrol olarak *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşu ve primerlerin çapraz reaksiyon verip vermediğini göstermek amacı ile de negatif kontrol olarak *E. coli* OP50 suşu kullanılmıştır. gDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PZR işleminde her bir *Salmonella* suşu için ve pozitif kontrol olan *S. Typhimurium* ATCC 14028 için *invA* geni için 284 bç, *fimA* geni için 85bç ve *stn* geni için 260 bç büyüklüğünde PZR ürünleri elde edilirken negatif kontrol olarak kullanılan *E. coli* OP50 suşu için spesifik banda rastlanmamıştır. Bu PZR işlemine ait agaroz jel fotoğrafı Şekil 4.11.a,b ve c'de verilmiştir.



Şekil 4.11.a. gDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı *invA* primeri ile gerçekleştirilen PZR. 1: A10, 2:A17, 3:A22, 4:A32, 5: *S. Typhimurium* ATCC 14028, 6: *E. coli* OP50, 7:Negatif Kontrol, M: Gene Ruler 100 bp DNA Marker (Fermentas, Finland) (100bç, 200bç, 300bç, 400bç, 500bç, 600bç, 700bç, 800bç, 900bç 1000bç)

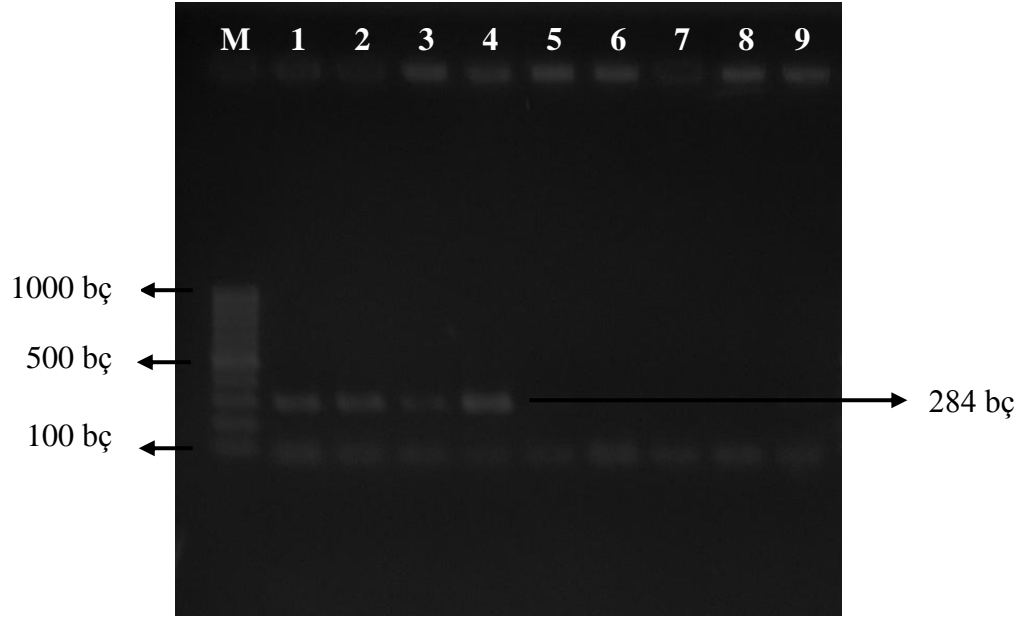


Şekil 4.11.b. gDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı *fimA* primeri ile gerçekleştirilen PZR. 1:A10, 2:A17, 3:A22, 4:A32, 5: *S. Typhimurium* ATCC 14028, 6: *E. coli* OP50, 7:Negatif Kontrol, M: Gene Ruler 100 bp DNA Marker (Fermentas, Finland) (100bç, 200bç, 300bç, 400bç, 500bç, 600bç, 700bç, 800bç, 900bç 1000bç)



Şekil 4.11.c. gDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı stn primeri ile gerçekleştirilen PZR. 1:A10, 2:A17, 3:A22, 4:A32, 5: *S. Typhimurium* ATCC 14028, 6: *E. coli* OP50, 7:Negatif Kontrol, M: Gene Ruler 100 bp DNA Marker (Fermentas, Finland) (100bç, 200bç, 300bç, 400bç, 500bç, 600bç, 700bç, 800bç, 900bç 1000bç)

C. elegans nematod model sisteminde ve BALB/c fare model sisteminde invazyon geni (*invA*), fimbrial (*fimA*) ve enterotoksin (*stn*) genlerinin ekspresyonları arasındaki farkı belirlemek amacıyla elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak ters transkriptaz PZR işlemi uygulanmıştır. *C. elegans*'tan geri kazanılan *Salmonella* suşlarından izole edilen total RNA'dan sentezlenen cDNA'lar kullanılarak *invA* primeri ile gerçekleştirilen RT-PZR işleminde 284 bç büyüklüğünde PZR ürünü elde edilirken BALB/c fare denemelerinde alınan kan örneklerinden izole edilen total RNA'dan sentezlenen cDNA'ların kullanıldığı *invA* primeri ile gerçekleştirilen RT-PZR işleminde bant oluşumu gözlemlenmemiştir (Şekil 4.12.a). Bu sonuç invazyon geninin nematod model sisteminde ifade edilirken fare model sisteminde ifade edilmediğini göstermektedir (Tablo 4.9).



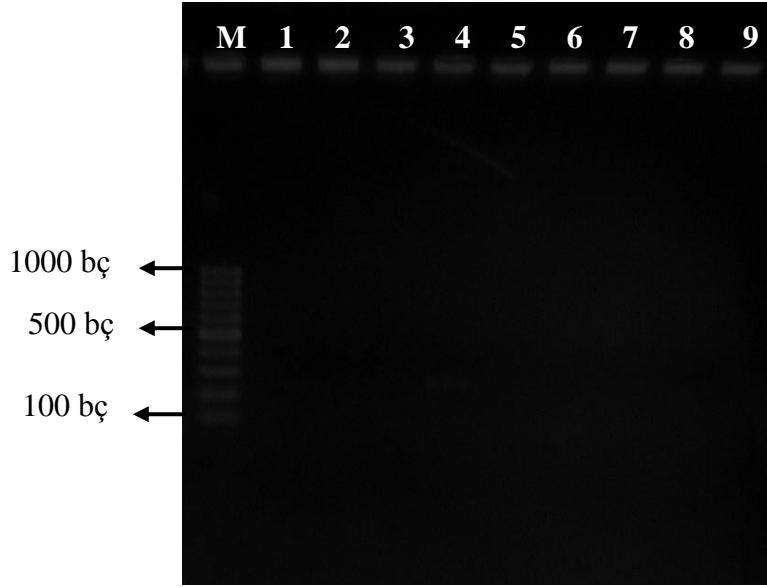
Şekil 4.12.a. cDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı *invA* primeri ile gerçekleştirilen RT-PZR. 1:A10, 2:A17, 3:A22, 4:A32 (1-4. kuyular: *C. elegans*'tan geri kazanılan *Salmonella* suşlarından izole edilen total RNA' dan sentezlenen cDNA ile yapılan RT-PZR), 5:Negatif Kontrol, 6:A10, 7:A17, 8:A22, 9:A32 (6-9. kuyular: BALB/c fare denemelerinde alınan kan örneklerinden izole edilen total RNA' dan sentezlenen cDNA ile yapılan RT-PZR). M: Gene Ruler 100 bp DNA Marker (Fermentas, Finland) (100bç, 200bç, 300bç, 400bç, 500bç, 600bç, 700bç, 800bç, 900bç 1000bç)

C. elegans' tan geri kazanılan *Salmonella* suşlarından izole edilen total RNA' dan sentezlenen cDNA'lar ve BALB/c fare denemelerinde alınan kan örneklerinden izole edilen total RNA'dan sentezlenen cDNA' lar kullanılarak *fimA* ve *stn* primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-PZR işleminde bant oluşumu gözlemlenmemiştir (Şekil 4.12.b,c). Bu sonuçlar tip1 fimbriyanın ana alt ünitesini kodlayan *fimA* geninin ve enterotoksin (*stn*) geninin hem nematod hem de fare model sistemde ifade edilmediğini göstermektedir (Tablo 4.9).

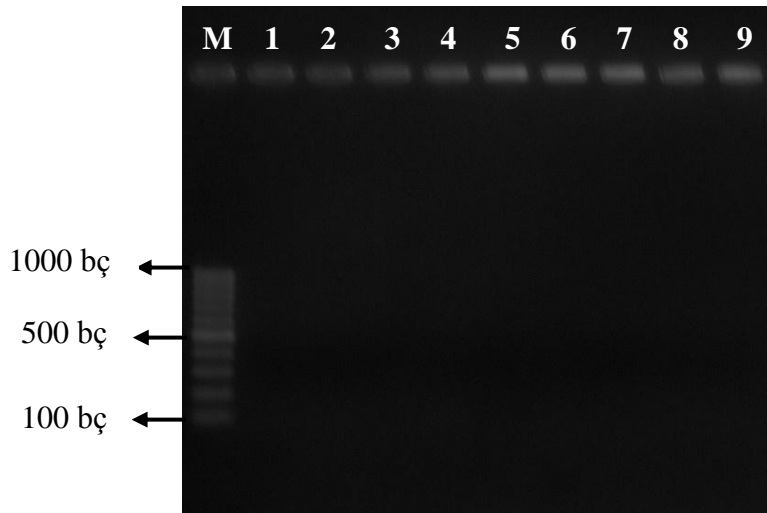
Tablo 4.9. İnvazyon geni (*invA*), fimbrial (*fimA*) ve enterotoksin (*stn*) genlerinin *C. elegans* nematod ve BALB/c fare model sistemde ekspresyon durumları

	<i>invA</i> geni	<i>fimA</i> geni	<i>stn</i> geni
<i>C. elegans</i> nematod model sistemi	+	-	-
BALB/c fare model sistemi	-	-	-

+: Belirtilen model sistemde belirtilen virülans genin ifade edildiğini -: Belirtilen model sistemde belirtilen virülans genin ifade edilmediğini göstermektedir.



Şekil 4.12.b. cDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı fimA primeri ile gerçekleştirilen RT-PZR. 1:A10, 2:A17, 3:A22, 4:A32 (1-4. kuyular: *C. elegans*'tan geri kazanılan *Salmonella* suşlarından izole edilen total RNA' dan sentezlenen cDNA ile yapılan RT-PZR), 5:Negatif Kontrol, 6:A10, 7:A17, 8:A22, 9:A32 (6-9. kuyular: BALB/c fare denemelerinde alınan kan örneklerinden izole edilen total RNA' dan sentezlenen cDNA ile yapılan RT-PZR). M: Gene Ruler 100 bp DNA Marker (Fermentas, Finland) (100bç, 200bç, 300bç, 400bç, 500bç, 600bç, 700bç, 800bç, 900bç 1000bç)



Şekil 4.12.c. cDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı stn primeri ile gerçekleştirilen RT-PZR. 1: A10, 2:A17, 3:A22, 4:A32 (1-4. kuyular: *C. elegans*'tan geri kazanılan *Salmonella* suşlarından izole edilen total RNA' dan sentezlenen cDNA ile yapılan RT-PZR), 5:Negatif Kontrol, 6:A10, 7:A17, 8:A22, 9:A32 (6-9. kuyular: BALB/c fare denemelerinde alınan kan örneklerinden izole edilen total RNA' dan sentezlenen cDNA ile yapılan RT-PZR). M: Gene Ruler 100 bp DNA Marker (Fermentas, Finland) (100bç, 200bç, 300bç, 400bç, 500bç, 600bç, 700bç, 800bç, 900bç 1000bç)

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Mikrobiyal gıda güvenliği dünya çapında giderek artan bir toplum sağlığı sorunu haline gelmektedir. Tavuk eti başta olmak üzere kontamine gıdaların tüketimi de insanlarda salmonelloz vakalarının ortaya çıkmasında başta gelen sebepler arasındadır [8].

Salmonella enfeksiyonlarının izlenmesinde serotiplendirme 50 yılı aşkın süredir ana rolü üstlenmektedir [170]. Bir ülkede izole edilmiş serovarların ve kaynaklarının bilinmesi, o ülkede daha sonra tanımlanacak *Salmonella* izolatları için önem taşımakta ve epidemiyolojik çalışmalarda yardımcı olmaktadır. Türkiye’de izole edilen serovarlar 1930’lı yılların sonunda bildirilmeye başlanmıştır [171]. Ayrıca Töreci ve Anđ, 1991 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalarında izolasyonu bildirilen *Salmonella* serovarlarını derleyerek [172] ve son olarak Töreci ve ark., 2011 yılının sonuna kadar izolasyonu bildirilen *Salmonella* serovarlarını yayınlamak üzere Türkiye'deki *Salmonella* sörveyansının belirlenmesine büyük katkı sağlamışlardır [173]. Çalışmamızda tanımlanan gıda kökenli *Salmonella* izolatlarının Infantis, Enteritidis, Kentucky ve Telaviv olmak üzere dört farklı serovara dahil oldukları tespit edilmiştir. Bu serovarlar, Töreci ve arkadaşları'nın Türkiye *Salmonella* serovarlarını belirledikleri çalışmalarında [173] yer alan 129 serovar içerisinde yer almaktadır. İzolatların büyük bir kısmını oluşturan Infantis serotipi (%81.25) birçok ülkede tavuk başta olmak üzere kanatlı etlerinden izole edilen serotiplerin başında gelmektedir [174, 175]. Türkiye'den 2004 ve 2010 yılları arasında yedi farklı şehirde faaliyet gösteren hastane ve halk sağlığı laboratuvarlarından gönderilen izolatlarla gerçekleştirilen çalışmada da Infantis serovarı en yaygın izolatlar arasında ikinci sırada yer almaktadır [176]. İzolatlarının dahil olduğu Enteritidis (%12.5) ve Kentucky (%3.125) serotipleri de tavuk eti izolatlarında sıklıkla rastlanan serotipler olmalarına rağmen Telaviv (%3.125) nadir rastlanan serotipler arasında yer

almaktadır. Bu serovar daha önce Türkiye'de satışa sunulan kıymalardan ve sığır karkaslarından izole edilmiştir [177, 178]. 2008-2011 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen suşlar ile yapılan bir çalışmada bir tane Telaviv serovarı tespit edilmiştir [179]. Çalışmamızda, Türkiye'de nadir rastlanan serovarlarda yer alan bu serovarin farklı bir kaynaktan izolasyonunun gerçekleştirilmiş olması ve patojenitesinin çalışılması önem taşımaktadır. Ayrıca yapılan literatür taramasında Edirne ilinde gıdalardan soyutlanan *Salmonella* izolatlarına ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızdan elde edilen veriler Türkiye'deki *Salmonella* sörveyansının belirlenmesinde bu bölge için katkı sağlayacaktır.

Salmonella suşları arasındaki ilişkinin belirlenmesi salgınlardaki yayılmasının izlenmesi ve enfeksiyon kaynaklarının belirlenmesi için ön koşuldur. Biyokimyasal analizler aynı *S. enterica* alt türü olarak belirlenen bakteriler arasında daha ileri bir ayırım yapmadığı için diğer fenotipik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır [56]. Diğer moleküler tiplendirme metodlarıyla karşılaştırıldığında "Enterobakteriyel Tekrarlayan Genler arası Uzlaşan Dizi" parmak izi metodu düşük maliyeti ve metodun uygulanmasının basit oluşu nedeni ile *Salmonella* serovarlarnın analizi için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [100, 101]. Lim ve ark., *Salmonella* spp. izolatlarının ayırımında kullanılan dört moleküler metodu (RAPD, ERIC, Ribotiplendirme-PZR ve Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) karşılaştırdıkları çalışmalarında en etkili metodun ERIC-PZR olduğunu bulmuşlardır [100].

Çalışmamızda *Salmonella* izolatlarından elde edilen ERIC profilleri 160-3300 bp büyüklüğünde 13-22 adet banttandır oluşmaktadır. 250 bp büyüklüğündeki bant tüm izolatlarda bulunmaktadır. *Salmonella* izolatlarında elde ettiğimiz yüksek yoğunluktaki bu bant diğer araştırmacıların da yaptığı şekilde analiz sırasında daha anlamlı grupların elde edilebilmesi için analizden çıkarılmıştır [180, 181, 182]. Literatürde Van Lith and Aarts, ERIC1-ERIC2 primer setinin *Salmonella* serotiplerinin ayırımında kullanılabileceğini belirtirken Burr ve ark. ve Milleman ve ark. çalışmalarında aynı primer setini kullandıklarında serotipler ile ilişkili olmayan bir parmak izi elde ettiklerini belirtmişlerdir [99, 183, 184]. ERIC1 ve ERIC2 primer setini kullandığımız çalışmamızda aynı serovarlarnın benzer ERIC paternleri oluşturmalarına rağmen bu

metodun serovar düzeyinde ayırım gücü 0.33 olarak belirlenmiştir ve bu ayırım gücü oldukça düşük bir düzeydir. Çalışmadaki 26 *S. Infantis* izolatu 15 farklı ERIC profili oluştururken 4 *S. Enteritidis* izolatının her biri farklı birer ERIC profili oluşturmaktadır. Bu elde edilen ERIC profilleri, plazmid profilleri ve antibiyotik direnç fenotipleri karşılaştırıldığı zaman izolatların farklı klonal kökene sahip olduğu görülmektedir. Bu durum, Fendri ve ark. [185] da çalışmalarında belirlediği gibi ERIC-PZR'nin tek tiplendirme metodu olarak kullanılmasının yetersiz kalabileceğini fakat diğer tiplendirme metodları ile beraber daha anlamlı sonuçlar verebileceğini ortaya çıkarmaktadır.

Salmonella enterica, büyüklükleri 1 kb'dan başlayan 200 kb'ın üzerine çıkabilen plazmidlere sahiptir. *Salmonella*'nın sahip olduğu plazmidler, virülans faktörleri, antibiyotiklere, ağır metaller, fajlara karşı direnç ve farklı karbon kaynaklarının kullanımı gibi özellikleri taşımaları bakımından oldukça önemlidir [71].

Çalışmada *Salmonella* izolatlarından 26 tanesinin (%81.25) plazmid içermediği, 6 tanesinin (%18.75) ise büyüklükleri 1.2 ile 42.4 kb arasında değişen 1-3 adet plazmid taşıdığı belirlenmiştir. Plazmid taşıyan izolatlardan 3 tanesi *Enteritidis*, 2 tanesi *Infantis* ve bir tanesi de Kentucky serotipine dahildir. Bu bölgede Edirne yakınlarındaki bir askeri birlikte meydana gelen gıda kaynaklı salgından ve sporadik vakalardan izole edilen *Enteritidis* izolatlarının da yer aldığı çalışmada, bu izolatların tamamının antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu ve salgın izolatlarının aynı plazmid profiline sahip olduğu belirlenmiştir [186, 187]. Çalışmamızda yer alan 4 adet *Enteritidis* izolatu sadece sulfonamide karşı direnç gösterirken kullanılan diğer antibiyotikler için duyarlıdır ve 3 tanesi büyüklükleri 1.5 - 35.8 kb arasında değişen 1-3 plazmid taşımaktadır. Bu izolatların antibiyotik direnç profilleri diğer araştırmacıların çalışmalardaki izolatlar ile benzerlik gösterirken plazmid profilleri arasında bir benzerliğe rastlanmamıştır.

Plazmid taşıyan diğer Kentucky ve 2 *Infantis* izolatu çoklu ilaç dirençliliği göstermektedir. Bu izolatların taşıdıkları plazmidlerin antibiyotik direnç genleri taşıyıp taşımadığının ve *C. elegans* patojenitesi üzerine etkilerinin araştırılması için Et-Br kullanılarak, plazmid giderme işlemi uygulanmış ancak bunun sonucunda antibiyotik direnç durumlarında bir fark oluşmamıştır. Bu durum bu izolatlardaki antibiyotik

dirençliliğinin plazmid kökenli değil de kromozomal kökenli olduğuna işaret etmektedir.

Literatürde, *S. Heidelberg* izolatları ile gerçekleştirilen çalışmada, hindi eti (4 adet), domuz eti ve klinik *S. Heidelberg* izolatlarından VirB/D4 T4SS plazmidi taşıyan ve taşımayan izolatların *C. elegans* model sisteminde patojenite potansiyelleri arasında bir farka rastlanamamıştır [188]. Çalışmamızda, 19.9 kb büyüklüğünde bir adet plazmide sahip Infantis izolatı kullanılarak gerçekleştirilen *C. elegans* patojenite denemelerinde plazmid taşıyan ve plazmidi giderilmiş hali ile beslenen nematod grupları için belirlenen TD50 verileri aralarında anlamlı fark bulunmamış, 31.6 kb büyüklüğünde bir adet plazmide sahip Kentucky izolatı ve 42.4, 1.5 ve 1.2 kb büyüklüklerinde 3 adet plazmide sahip Infantis izolatı kullanılarak gerçekleştirilen *C. elegans* patojenite denemelerinde plazmid taşıyan ve plazmidi giderilmiş *Salmonella* suşları ile beslenen nematod grupları için belirlenen TD50 verileri aralarında anlamlı fark ortaya çıkmıştır. Bu durum çalışmadaki Kentucky ve Infantis izolatlarının taşıdıkları plazmidlerin nematodlar için patojenez faktörü genleri içerdiğini düşündürmektedir. Ayrıca Kentucky izolatının BALB/c fare model sisteminde de patojen olarak tanımlanması taşıdığı plazmidin BALB/c fare patojenitesi üzerine de etkili virülans genler taşıyabileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır. Bu konu üzerinde yapılacak ilerleyen çalışmalar, *Salmonella*'lardaki bu plazmidlerin ve taşıdıkları virülans genlerinin tanımlanması ve plazmid kökenli virülans genlerinin *C. elegans* ve BALB/c farelerde patojeniteye katkısının belirlenmesine imkan sağlayacaktır.

Salmonellozlar sadece olgu sayılarıyla değil aynı zamanda antimikrobiyallere dirençli suşların artmasıyla da önemli bir halk sağlığı sorunu olarak ortaya çıkmaktadır. Antibiyotiklerin tıp ve veterinerlikte yaygın kullanımı nedeniyle antimikrobiyallere dirençli varyant bakteriler ortaya çıkmaktadır [8, 9]. Tedavi gerektirmeyen gastroenterit olgularının yanı sıra özellikle çocuklarda, yaşlılarda ve immun yetmezliği olan hastalarda ortaya çıkan invazif *Salmonella* spp. enfeksiyonlarında antimikrobiyal terapi önerilmektedir [10, 11]. Salgınlar veya sporadik olarak ortaya çıkan salmonelloz olguları üzerinde yapılan çalışmalar enfeksiyonun şiddeti ile antimikrobiyal direnç arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur [116, 189].

Çalışmamızda yer alan gıda kökenli *Salmonella* izolatlarının tamamı en az bir antibiyotiğe karşı direnç taşımaktadır. Bu durum antibiyotiklerin hayvanlarda büyümeyi hızlandırmak için yem katkısı olarak kullanılmasının yanı sıra hayvan yetiştiriciliğinde ve veterinerlikte kullanımı nedeni ile çiftlik ve kümes hayvanlarındaki mikrobiyal populasyonlarda antibiyotik dirençli varyantların ortaya çıkmasının seçici seleksiyonun bir sonucudur [116]. Çalışmadaki *Salmonella* izolatlarının tamamı 1937'den beri terapötik olarak kullanımda olan sulfonamide karşı dirençlidir. Sulfonamid direnci ilk olarak 1930'ların sonunda rapor edilmiştir ve günümüzde de geçerliliğini korumaktadır [190]. İzolatlarımızda rastlanılan sulfonamid direnci bu duruma örnek olarak verilebilir. İzolatlarımızda yüksek oranda direnç gözlemlenen streptomisin (%84.4), tetrasiklin (%78.1) ve neomisin (%60.8) de veterinerlikte sıklıkla kullanılan ilaç grupları arasında yer almaları nedeniyle *Salmonella* izolatlarında direncin rastlandığı başlıca antibiyotikler arasındadır [191]. Çalışmadaki izolatlarda ayrıca yüksek oranda nalidiksik asit direnci bulunmuştur (%79). Yapılan çalışmalar florokinolonların veterinerlikte kullanımlarının *Salmonella*'da nalidiksik asit direncinin ortaya çıkmasında ve dirençli suşların hayvansal gıdalar yoluyla insana geçmesinde ve yayılmasında rol oynadığını ileri sürmektedir [192]. Florokinolonlar yetişkinlerde salmonellozların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Nalidiksik asit dirençli suşlarla enfekte olmuş bireylerde bu tedavi başarısızlıkla sonuçlanabilmektedir [193]. Bu durum, nalidiksik asite dirençli ve aynı zamanda *C. elegans* model sisteminde patojenite potansiyellerinin de yüksek olduğu belirlenen izolatların halk sağlığı açısından önemini arttırmaktadır. Elde edilen bir diğer önemli sonuç, Infantis ve Kentucky serotipinden 2 izolatın (%6.25) tedavide kullanılan florokinolon grubuna dahil siprofloksasine karşı dirençli olmalarıdır. Türkiye'de florokinolonlara karşı direnç henüz yüksek düzeylerde değildir [194, 195]. Bu suşlar, Kentucky serotipine dahil izolat (A10) için hem *C. elegans* hem de BALB/c fare model sisteminde, Infantis serotipine dahil izolat (A32) için ise *C. elegans* model sisteminde tanımladığımız yüksek patojenite potansiyelleri bakımından önem arz etmektedirler.

Çalışmamızda gıda kökenli *Salmonella* izolatlarının patojenite potansiyelleri Türkiye'de ilk kez *C. elegans* model sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen verilerimiz, gıda kökenli *Salmonella* izolatlarının birbirlerinden farklı patojenite fenotipleri gösterdiğini ortaya koymaktadır. *C. elegans* 1960'lı yıllardan bu yana genetik

model organizma olarak kullanılmaktadır. *C. elegans* NGM agarda üretilmiş patojen olmayan *E. coli* OP50 [147] ile beslendiği zaman oda sıcaklığında yaklaşık iki haftalık bir yaşam döngüsüne sahiptir [196]. Ancak, *C. elegans* insan patojenleri ile beslendiğinde kısa sürede mortalite görülmektedir. İnsanlarda patojen olan *Salmonella* Typhimurium, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, ve *Burkholderia pseudomallei* suşları besin kaynağı olarak verildiğinde *C. elegans*'ı öldürmektedir ve çeşitli bakteriyel virülans faktörlerinin nematodlar ve insanda patogenezin ortaya çıkmasında rol oynadığı belirlenmiştir [151, 152, 153, 154]. *C. elegans* N2 atasal suşunu model sistem olarak kullandığımız çalışmamızda, izolatların bu model sistemde patojeniteleri her bir deney grubundaki izolatlar için hesaplanan TD50 verileri ile belirlenmiştir. *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşunun nematodlarda patojen olduğu ve *E. coli* OP50 ile kıyaslandığında, çok daha kısa bir sürede mortalite görüldüğü bildirilmiştir [153]. Çalışmamızda, gıda kökenli izolatların bu model sistemde patojeniteleri belirlenirken bu iki suş kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, Infantis serotipine dahil 6 ve Enteritidis serotipine dahil 4 tane olmak üzere toplam 10 izolatın (%31.25) bu model sistemi için patojen olmadığı belirlenirken, Infantis, Kentucky ve Telaviv serotiplerine ait suşları içeren diğer 22 izolatın (%67.75) patojen olduğu görülmüştür. Daha önce yurtdışında yapılan çalışmalarda farklı *Salmonella* serovarlarının bu model sistemde farklı patojenite gösterdiği belirlenmiştir [197, 198]. Çalışmamızda izolatların antibiyotik direnç fenotipleri ve TD50 verileri arasında bir korelasyona rastlanmamıştır. Çalışmamızda, Türkiye'de ilk kez *C. elegans* deney hayvanı model sistemi kullanılarak *Salmonella* izolatlarının patojeniteleri incelenmiştir.

İzolatların *C. elegans* model sistemindeki patojenite fenotipleri BALB/c model sistemindeki patojenite potansiyelleri ile karşılaştırılmıştır. Bunun için, *C. elegans*'da patojen olan *S. Infantis* (A8, A32), *S. Kentucky* (A10), *S. Enteritidis* (A18), *S. Telaviv* (A22) ile patojen olmayan *S. Infantis* (A17) ve *S. Enteritidis* (A30) izolatları BALB/c fare model sistemi denemelerinde kullanılmıştır. Denemelerde, suşların BALB/c farelere i.p. enjeksiyonu (her bir fareye 10^6 cfu bakteri) sonrası hastalık belirtileri (hareketlerde azalma, uyuşukluk (letarji), bozulmuş kürk yapısı ve kambur duruş) gösteren farelere ve 21 günlük deney süresini tamamlayan farelere ötanazi uygulanmıştır. Ardından fare dokularındaki (karaciğer, dalak, ince bağırsak, çekum)

kolonizasyon miktarları belirlenmiştir. İzolatların BALB/c fare model sisteminde patojenite fenotipleri bu sistemde patojenitesi tanımlanmış ve kontrol olarak kullanılan *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşu ile elde edilen kolonizasyon miktarlarına göre belirlenmiştir. Kolonizasyon miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmeyen izolatlar BALB/c fare model sistemi için patojen olarak tanımlanmışlardır. *S. Telaviv* enjekte edilmiş fare grubunun %100'ünde, *S. Enteritidis* (A30) enjekte edilmiş fare grubunun %80'inde ve *S. Kentucky* enjekte edilmiş fare grubunun %60'ında hastalık belirtisi gözlemlenmiştir. Beklenildiği üzere dokulardaki kolonizasyon miktarı ile hastalık belirtisi gözlemlenen fare sayısı birbiriyle ilişkilidir.

Infantis serotipinin insanlarda enfeksiyona neden olan ve hastanelerden sıklıkla izole edilen serotipler arasında olduğu bilinmektedir [176, 199]. *S. Infantis* kullanılarak yapılan çalışmalarda bu suşun farelerde hastalığa neden olmadığı tespit edilmiştir [145]. Çalışmamızda kullandığımız 26 Infantis serotipinin %60'ı *C. elegans* için patojen olduğunu saptadık. Bunlar arasından fare model sisteminde patojenite belirlenmesi için seçtiğimiz 3 adet Infantis izolatından (A8, A17, A32) 2 tanesi *C. elegans* model sisteminde patojen iken hiçbirisi BALB/c fare model sistemde patojen değildir. Bu durum *C. elegans* model sisteminin, Infantis serotipinin patojenite potansiyelinin belirlenmesinde uygun olduğunu göstermiştir.

Enteritidis ve Kentucky serovarları da fare model sisteminde patojenitesi çalışılmış serovarlar arasındadır [200, 201, 202]. Çalışmamızdaki 2 adet Enteritidis (A18 ve A30) izolatının fare model sistemindeki patojenitelerinin farklı olduğunu belirledik; A30 fare model sisteminde patojen iken A18 patojen değildir. Bu iki izolatın *C. elegans* model sisteminde belirlenen patojenite fenotipleri ise fare model sisteminin tam tersidir. Çalışmamızda, Kentucky izolatı ise hem *C. elegans* model sistem için hem de BALB/c fare model sistemi için patojen olarak tanımlanmıştır.

Telaviv serotipinin hem nematod model hem de fare model sistemindeki patojenitesi hakkında literatürde daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Çalışmamızda *S. Telaviv* izolatı hem *C. elegans* model sistemi için hem de BALB/c fare model sistemi için patojen olarak tanımlanmıştır. Dolayısıyla, *S. Telaviv* izolatı ile elde ettiğimiz veriler bu serotipin bu iki farklı model sistemdeki patojenite fenotiplerine dair elde edilen ilk verilerdir. Ayrıca bu serovar için *C. elegans* model sisteminde

belirlediğimiz düşük TD50 değeri (4.8 ± 0.25), ilk 2 günde tüm BALB/c farelerde hastalık belirtisine neden olması ve dokulardaki kolonizasyon miktarının fazla olması, bu serovarin her iki model sistem için de yüksek virülansa sahip olduğunu göstermektedir.

Nematod ve fare model sistemlerinde patogenezi fenotipleri arasındaki farkın moleküler düzeyde de belirlenmesi amacı ile seçilen izolatlar için invazyon (*invA*), fimbriyal (*fimA*) ve enterotoksin (*stn*) genlerinin bu model sistemlerde ekspresyon farkları incelenmiştir. Bu denemeler için *S. Kentucky* (A10), *S. Enteritidis* (A17), *S. Telaviv* (A22) ve *S. Infantis* (A32) izolatları seçilmiştir. mRNA analizlerinde, farelerden ötanazi esnasında alınan kalp kanı ve *Salmonella* suşlarına maruz bırakılmalarının ardından 6 gün sonra nematodlardan kazanılan *Salmonella* suşlarının mRNA'ları kullanılmıştır.

"inv" genleri in vitro koşullarda intestinal epitel hücrelerine bakteriyel invazyon için gereklidir ve *Salmonella*'nın enfeksiyon sırasında intestinal epitel hücrelerine girişini sağlamaktadır. Murray ve Lee, yaptıkları çalışmalarında *S. Typhimurium*'un *invA* genini de içeren, SPI-1 tarafından kodlanan invazyon genlerinin fare model sistemi için gerekli olmadığını bulmuştur [203]. Tenor ve ark., *C. elegans* model sistemi ile yaptıkları çalışmalarında, *invH* genini de içeren invazyon genlerinin *S. Typhimurium*'da konakçı patojen etkileşimleri için gerekli olduğunu bulmuştur [204].

Tip 1 fimbriya *fimAICDHF* operonu tarafından kodlanmaktadır ve *Salmonella*'da in vitro koşullarda epitel hücre hatlarına tutunmada rol oynadığı bilinmektedir [205]. Weening ve ark., *S. Typhimurium* ile yaptıkları çalışmalarda "fim" fimbriyal operonunun CBA farelerde uzun süreli intestinal kalıcılık için gerekli olmadığını bulmuşlardır [141]. *Salmonella* enterotoksini (*stn*) olası virülans faktördür ve diyareye neden olan ajandır. *Salmonella*'da serotip ayrımı olmaksızın yer almaktadır. Chopra ve ark., *stn* genini klonlayarak fare ileum bağırsak modelinde enterotoksik aktivitesini göstermiştir [206]. Çalışmalarında *stn*'nin *Salmonella* için bir virülans faktör olduğunu ve enterotoksitiden sorumlu olduğunu bulmuşlardır. Fakat daha sonra gerçekleştirilen çalışmalar bu verileri desteklememektedir ve *Salmonella* virülansı ve *stn* arasında bir ilişkiye rastlanamamıştır [207, 208, 209]. Son olarak Nakano ve ark., doku kültürü

çalışmalarında in vivo ve in vitro olarak *stn* geninin bu sistemlerde *Salmonella* virülansına katkı sağlamadığını bulmuştur [210].

Çalışmamızda, *invA* geni Kentucky, Telaviv, Enteritidis ve Infantis serotiplerinde BALB/c fare modelinde eksprese edilmemiştir, fakat *C. elegans* nematod model sisteminde ifade edilmektedir. Bu veriler başka serotiplerden elde edilen literatür bilgileri ile paralellik göstermektedir. *fim* operonunun major alt ünitesini kodlayan *fimA* ve *stn* geni ise Kentucky, Enteritidis, Telaviv ve Infantis serotiplerinde BALB/c fare ve *C. elegans* nematod model sisteminin her ikisinde de eksprese edilmemektedir. Ancak virülans genlerinin ekspresyonları hem fare hem de nematod model sistemleri için belirlenen patojenite fenotipleri ile paralellik göstermemektedir.

Sonuç olarak;

- Bu çalışma Türkiye'de mikrobiyal gıda güvenliliğinin önemini ve antibiyotiklerin tıbbi kullanımlarının yanı sıra hayvan yetiştiriciliğinde ve veterinerlikte kullanımlarının da kontrol altında tutulmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.
- *Salmonella* izolatlarının patojenite fenotipleri ve virülans geni ekspresyonu açısından karşılaştırılması *C. elegans* nematod ve BALB/c fare model sistemleri kullanılarak ilk kez yapılmıştır. Dolayısıyla, *Salmonella* grubu bakteri izolatlarının, farklı canlı türlerinde in vivo patojenite determinantlarının anlatımı çalışmalarına katkı sağlamaktadır.
- Plazmid giderme çalışmalarında antibiyotik direnci ile plazmidler arasında bir ilişkiye rastlanamazken plazmid kaybının *C. elegans*'ta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde patojenitenin azalmasına yol açtığı bulunmuştur.
- Nadir izole edilen serotipler arasında yer alan Telaviv serotipinin patojenitesi, *C. elegans* nematod ve BALB/c fare model sisteminde ilk kez çalışılmıştır ve elde edilen verilerin bu alanda ilk olması bakımından önemlidir.

- *C. elegans* nematod ve BALB/c fare model sisteminde hem patojenite fenotipleri hem de virölans genlerin ekspresyonları incelendiğinde arada farklar görülmüştür. Bu durum izolatların patojenite durumlarının fenotipik ve moleküler düzeyde çalışılmasında tek bir model hayvan sistemi ile çalışmanın eksikliğini ortaya koymaktadır. Elde edilen verilerin tıp alanına uyarlamada ve kullanılabilir tanı kitlerinin geliştirilmesinde kullanılması için, *Salmonella* izolatlarının doğrudan insan numunelerinden elde edilmesinin gerekliliği çalışmamızda belirlenmiştir.

EKLER

EK-A. Deneylelerde kullanılan çözeltiler ve karışımların içerikleri

ERIC-PZR Karışımı (tek reaksiyon için)

Steril Distile Su	16 µL
10X Tampon (+ $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$)	2.5 µL
dNTP Mix (10 mM)	0.5 µL
Primer ERIC1 (100nmol/mL)	0.5 µL
ERIC2 (100nmol/mL)	0.5 µL
MgCl ₂	2 µL
Taq DNA Polimeraz (5u)	0.5 µL
gDNA (50ng/ µL)	3 µL

Serum Fizyolojik Su (SFS)

8.5 g NaCl 1000 mL distile suda çözülür. Elde edilen çözeltiler 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilir.

Kado Tampon Çözeltileri

Tris	0.6 g
EDTA	0.03 g
Steril distile su	100 mL

pH 8.0

Elde edilen çözeltiler 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilir.

Liziz Czeltisi

Steril distile su	11.5 mL
15% SDS	4 mL
250mM Tris	4 mL
5N NaOH	0.3 mL

Fenol/Kloroform Czeltisi

Fenol	50 mL
Kloroform	50 mL

S Tampon

0.05M K ₂ HPO ₄	129 mL
0.05M KH ₂ PO ₄	871 mL
NaCl	5.85g

Elde edilen tampon czelti 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilir.

Nematod reme Besiyeri (NGM) Agar

NaCl	3g
Peptone	2.5g
Agar	17g

975 mL distile suda czlr ve 121°C'de 15 dk otoklavlanır. Steril olan besiyeri 55°C'ye kadar soğutulur. Ardından 1 mL 1M CaCl₂ (filtre ile steril edilmiş), 1 mL 5 mg/mL kolesterol (etanolda hazırlanmış), 1 mL 1M MgSO₄ (filtre ile steril edilmiş) ve 25 mL KPO₄ tampon (filtre ile steril edilmiş) eklenir. İyice karıştırıldıktan sonra steril petrilere dökülür.

M9 Tampon

KH ₂ PO ₄	3g
Na ₂ HPO ₄	6g
NaCl	5g

1 lt distile su içerisinde çözülür ve 1mL 1M MgSO₄ eklenir. 121°C' de otoklavlanarak steril edilir.

cDNA Sentezi Reaksiyon Karışımı (1 örnek için)

Random primer	1 µL
dNTP Karışımı	1 µL
RNA izolatu	7,5 µL
Nuclease-free su	5 µL

cDNA Sentezi Reaksiyon Karışımı-2 (1 örnek için)

5X Tampon	4 µL
RNase OFF Ribonuclease Inhibitor	0.5 µL
EasyScript Plus RTase	1 µL

Virülans Primerleri için PZR Karışımı (tek reaksiyon için)

Steril Distile Su	9 µL
10X Tampon (+NH ₄) ₂ SO ₄)	2.5 µL
dNTP Mix (10 mM)	0.5 µL
Primer - F(100µmol)	2.5 µL
-R (100µmol)	2.5 µL
MgCl ₂	2.5 µL
Taq DNA Polimeraz (5u)	0.5 µL
gDNA veya cDNA	4 µL

EK-B. *Caenorhabditis elegans* patojenite deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (1. Deneme)

	A1			A2			A3			A4			A5		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	20	0	0	21	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0
2. Gün	16	2	1	19	2	0	14	2	4	12	5	3	12	6	2
3. Gün	14	2	0	18	1	0	13	1	0	12	0	0	12	0	0
4. Gün	14	0	0	18	0	0	12	1	0	11	1	0	12	0	0
5. Gün	11	2	1	15	3	0	11	1	0	9	2	0	9	3	3
6. Gün	10	1	1	13	2	0	7	4	0	9	0	0	9	0	0
7. Gün	6	4	0	11	2	0	5	2	0	7	2	0	6	3	0
8. Gün	3	3	0	8	3	0	4	1	0	6	1	0	3	3	0
9. Gün	2	1	0	4	4	0	4	0	0	6	0	0	3	0	0
10. Gün	2	0	0	2	2	0	4	0	0	5	1	0	1	2	0
11. Gün	0	2	2	2	0	0	1	3	0	4	1	0	0	0	1
12. Gün	0	0	0	1	1	0	1	0	0	4	0	0	0	1	0
13. Gün	0	0	0	1	0	0	0	1	0	3	1	0	0	0	0
14. Gün	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0
15. Gün	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
16. Gün	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-B. *Caenorhabditis elegans* patojenite deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (1. Deneme) (Devam)

	A6			A7			A8			A9			A10		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	20	0	1	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0
2. Gün	15	3	1	15	2	3	14	6	0	16	2	2	15	5	0
3. Gün	10	5	0	12	2	1	12	2	0	16	0	0	12	2	1
4. Gün	9	1	0	12	0	0	10	2	0	14	2	0	12	0	0
5. Gün	8	1	0	11	1	0	8	2	0	11	3	0	11	1	0
6. Gün	8	0	0	10	1	0	6	2	0	9	2	0	9	2	0
7. Gün	6	2	0	8	2	0	4	2	0	6	3	0	7	1	1
8. Gün	6	0	0	6	2	0	2	2	0	4	1	1	5	2	0
9. Gün	5	1	0	6	0	0	2	0	0	3	1	0	4	1	0
10. Gün	3	2	0	5	1	0	2	0	0	3	0	0	2	2	0
11. Gün	1	2	0	5	0	0	2	0	0	2	1	0	0	2	0
12. Gün	0	1	0	2	3	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0
13. Gün	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
14. Gün	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
15. Gün	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
16. Gün	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-B. *Caenorhabditis elegans* patojenite deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (1. Deneme) (Devam)

	A11			A12			A13			A14			A15		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	19	0	1	20	0	0	17	0	3	15	0	0	20	0	0
2. Gün	15	4	0	12	4	4	11	3	3	12	3	0	17	2	1
3. Gün	12	3	0	11	1	0	11	0	0	11	1	0	15	0	0
4. Gün	11	1	0	11	0	0	11	0	0	11	0	0	15	0	0
5. Gün	10	1	0	9	2	0	10	1	0	9	2	0	12	3	0
6. Gün	9	1	0	4	5	0	9	1	0	8	1	0	8	4	0
7. Gün	4	5	0	4	0	0	5	4	0	5	3	0	6	2	0
8. Gün	1	3	0	3	1	0	4	1	0	3	2	0	6	0	0
9. Gün	1	0	0	3	0	0	1	3	0	3	0	0	5	1	0
10. Gün	1	0	0	3	0	0	1	0	0	1	2	0	4	1	0
11. Gün	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0	1	0	4	0	0
12. Gün	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
13. Gün	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0
14. Gün	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0
15. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
17. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-B. *Caenorhabditis elegans* patojenite deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (1. Deneme) (Devam)

	A16			A17			A18			A19			A20		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	19	0	1	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0
2. Gün	8	3	8	18	1	1	8	5	7	18	2	0	13	2	5
3. Gün	8	0	0	17	0	0	7	1	0	15	3	0	11	2	0
4. Gün	6	2	0	17	0	0	7	0	0	15	0	0	11	0	0
5. Gün	5	1	0	17	0	0	6	1	0	15	0	0	7	3	1
6. Gün	4	1	0	14	3	0	4	2	0	9	6	0	7	0	0
7. Gün	3	1	0	9	5	0	3	1	0	7	2	0	6	1	0
8. Gün	3	0	0	8	1	0	0	3	0	6	1	0	3	3	0
9. Gün	2	1	0	5	2	0	0	0	0	2	4	0	3	0	0
10. Gün	1	1	0	3	2	0	0	0	0	2	0	0	2	1	0
11. Gün	1	0	0	1	2	0	0	0	0	2	0	0	1	1	0
12. Gün	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
13. Gün	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
14. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-B. *Caenorhabditis elegans* patojenite deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (1. Deneme) (Devam)

	A21			A22			A23			A24			A25		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0
2. Gün	16	3	1	13	5	2	15	4	1	16	3	1	10	6	4
3. Gün	16	0	0	13	0	0	13	2	0	16	0	0	10	0	0
4. Gün	15	1	0	12	1	0	13	0	0	15	1	0	9	0	1
5. Gün	14	1	0	11	1	0	13	0	0	14	1	0	8	1	0
6. Gün	11	3	0	9	2	0	10	3	0	12	2	0	8	0	0
7. Gün	8	3	0	6	3	0	8	2	0	11	1	0	7	1	0
8. Gün	2	6	0	3	3	0	6	2	0	5	6	0	5	2	0
9. Gün	0	2	0	1	2	0	3	3	0	3	2	0	2	3	0
10. Gün	0	0	0	0	1	0	2	1	0	3	0	0	2	0	0
11. Gün	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	2	0	1	1	0
12. Gün	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	1	0
13. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-B. *Caenorhabditis elegans* patojenite deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (1. Deneme) (Devam)

	A26			A27			A28			A29			A30		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	18	0	2	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0
2. Gün	13	2	3	14	4	2	16	3	1	15	5	0	15	2	3
3. Gün	13	0	0	12	0	2	13	3	0	15	0	0	15	0	0
4. Gün	11	2	0	10	2	0	10	3	0	15	0	0	14	0	1
5. Gün	10	1	0	9	1	0	9	1	0	15	0	0	14	0	0
6. Gün	9	1	0	6	2	1	6	3	0	8	5	2	12	1	1
7. Gün	7	2	0	3	3	0	5	1	0	8	0	0	9	2	1
8. Gün	3	4	0	2	1	0	2	3	0	5	3	0	7	2	0
9. Gün	2	1	0	1	1	0	2	0	0	5	0	0	5	2	0
10. Gün	2	0	0	1	0	0	1	1	0	4	0	1	3	2	0
11. Gün	1	1	0	0	1	0	0	1	0	2	2	0	3	0	0
12. Gün	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	1	0
13. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0
14. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
15. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
16. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-B. *Caenorhabditis elegans* patojenite deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (1. Deneme) (Devam)

	A31			A32			S. Typhimurium ATCC14028			E. coli OP50		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	19	0	1	20	0	0	20	0	0	20	0	0
2. Gün	12	5	2	12	5	3	9	6	5	14	2	4
3. Gün	9	1	2	10	2	0	8	1	0	14	0	0
4. Gün	9	0	0	10	0	0	8	0	0	13	1	0
5. Gün	8	1	0	9	1	0	7	0	1	12	0	1
6. Gün	6	1	1	8	1	0	6	1	0	12	0	0
7. Gün	4	2	0	7	1	0	5	1	0	8	2	2
8. Gün	3	1	0	4	3	0	1	4	0	6	2	0
9. Gün	2	1	0	3	1	0	0	1	0	6	0	0
10. Gün	1	1	0	2	1	0	0	0	0	4	2	0
11. Gün	1	0	0	2	0	0	0	0	0	4	0	0
12. Gün	0	1	0	2	0	0	0	0	0	4	0	0
13. Gün	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2	0
14. Gün	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
15. Gün	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
16. Gün	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
17. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
18. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
19. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

EK-B. *Caenorhabditis elegans* patojenite deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (2. Deneme)

	A1			A2			A3			A4			A5		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	20	0	0	20	0	0	18	0	2	18	0	2	18	0	2
2. Gün	11	5	4	18	2	0	15	2	1	13	3	2	13	4	1
3. Gün	11	0	0	16	2	0	12	3	0	13	0	0	10	3	0
4. Gün	10	1	0	14	2	0	10	2	0	13	0	0	10	0	0
5. Gün	9	1	0	14	0	0	8	2	0	12	1	0	10	0	0
6. Gün	7	2	0	10	3	1	8	0	0	10	2	0	9	1	0
7. Gün	4	3	0	6	4	0	7	1	0	6	3	1	3	4	2
8. Gün	3	1	0	5	1	0	6	0	1	5	1	0	2	1	0
9. Gün	2	1	0	3	2	0	5	1	0	5	0	0	2	0	0
10. Gün	1	1	0	1	2	0	3	2	0	2	3	0	2	0	0
11. Gün	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
12. Gün	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
13. Gün	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
14. Gün	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
15. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-B. *Caenorhabditis elegans* patojenite deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (2. Deneme) (Devam)

	A6			A7			A8			A9			A10		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	19	1	0	19	0	1	18	0	2	17	0	3	20	0	0
2. Gün	13	2	3	17	2	0	12	4	2	11	3	3	13	5	2
3. Gün	12	1	0	16	1	0	9	2	1	10	0	1	11	1	1
4. Gün	10	2	0	14	2	0	7	2	0	9	0	1	11	0	0
5. Gün	8	1	1	13	1	0	5	1	1	6	3	0	11	0	0
6. Gün	6	2	0	9	2	1	4	1	0	5	1	0	8	3	0
7. Gün	2	4	0	6	3	0	3	1	0	5	0	0	6	2	0
8. Gün	2	0	0	6	3	0	2	1	0	5	0	0	3	3	0
9. Gün	2	0	0	4	2	0	2	0	0	4	1	0	2	1	0
10. Gün	2	0	0	3	1	0	1	1	0	3	1	0	1	1	0
11. Gün	2	0	0	1	2	0	0	1	0	2	1	0	0	1	0
12. Gün	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
13. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
14. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
15. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-B. *Caenorhabditis elegans* patojenite deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (2. Deneme) (Devam)

	A11			A12			A13			A14			A15		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	18	0	2	19	0	1	20	0	0	16	0	4	17	0	3
2. Gün	14	3	1	13	4	2	14	1	5	9	3	4	14	0	3
3. Gün	13	1	0	10	3	0	14	0	0	8	1	0	9	3	2
4. Gün	10	1	2	10	0	0	14	0	0	6	2	0	9	0	0
5. Gün	10	0	0	9	1	0	12	1	1	6	0	0	7	1	1
6. Gün	8	2	0	8	1	0	7	5	0	4	1	1	5	2	0
7. Gün	6	2	0	7	1	0	5	1	1	3	1	0	4	1	0
8. Gün	4	2	0	7	0	0	3	1	1	2	1	0	2	2	0
9. Gün	2	2	0	4	3	0	3	0	0	1	1	0	1	1	0
10. Gün	1	1	0	2	2	0	2	1	0	0	1	0	0	1	0
11. Gün	1	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
12. Gün	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13. Gün	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-B. *Caenorhabditis elegans* patojenite deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (2. Deneme) (Devam)

	A16			A17			A18			A19			A20		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	20	0	0	16	0	4	17	0	3	20	0	0	15	0	5
2. Gün	12	4	4	14	1	1	10	5	2	17	2	1	10	3	2
3. Gün	10	2	0	12	2	0	9	1	0	15	0	2	8	2	0
4. Gün	9	1	0	11	1	0	7	2	0	15	0	0	6	2	0
5. Gün	9	0	0	10	1	0	5	2	0	10	1	4	5	1	0
6. Gün	6	3	0	9	1	0	4	1	0	9	1	0	5	1	0
7. Gün	4	2	0	8	1	0	3	1	0	6	3	0	5	0	0
8. Gün	3	1	0	7	1	0	2	1	0	3	3	0	2	2	1
9. Gün	3	0	0	4	3	0	0	2	0	2	1	0	1	1	0
10. Gün	2	1	0	0	4	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
11. Gün	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
12. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
13. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
14. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-B. *Caenorhabditis elegans* patojenite deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (2. Deneme) (Devam)

	A21			A22			A23			A24			A25		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	17	0	3	20	0	0	19	0	1	19	0	1	19	0	1
2. Gün	17	0	0	13	4	3	18	0	1	14	0	6	12	4	3
3. Gün	16	1	0	11	2	0	15	2	1	14	0	0	11	0	1
4. Gün	15	1	1	10	1	0	15	0	0	14	0	0	11	0	0
5. Gün	12	3	0	7	3	0	15	0	0	11	2	1	9	2	0
6. Gün	8	4	0	4	3	0	12	3	0	5	4	2	8	0	1
7. Gün	7	0	1	3	1	0	7	5	0	1	4	0	6	2	0
8. Gün	4	3	0	1	2	0	4	2	1	1	0	0	4	2	0
9. Gün	3	1	0	1	0	0	3	1	0	1	0	0	2	2	0
10. Gün	2	1	0	0	1	0	2	1	0	1	0	0	1	0	1
11. Gün	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
12. Gün	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
13. Gün	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
14. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-B. *Caenorhabditis elegans* patojenite deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (2. Deneme) (Devam)

	A26			A27			A28			A29			A30		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	18	0	2	19	0	1	20	0	0	20	0	0	16	0	4
2. Gün	15	0	3	13	4	2	12	3	5	15	2	3	13	1	2
3. Gün	12	2	1	12	0	1	11	1	0	14	1	0	12	1	0
4. Gün	11	1	0	10	2	0	11	0	0	10	3	1	12	0	0
5. Gün	10	1	0	8	1	1	7	4	0	9	1	0	12	0	0
6. Gün	7	3	0	7	1	0	6	1	0	7	1	1	9	3	0
7. Gün	6	1	0	4	3	0	4	2	0	5	2	0	6	3	0
8. Gün	4	2	0	3	1	0	3	1	0	3	2	0	5	1	0
9. Gün	4	0	0	2	1	0	0	3	0	2	0	1	2	3	0
10. Gün	2	2	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	1	1	0
11. Gün	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
12. Gün	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
13. Gün	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
14. Gün	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
15. Gün	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
16. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-B. *Caenorhabditis elegans* patojenite deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (2. Deneme) (Devam)

	A31			A32			S. Typhimurium ATCC14028			E. coli OP50		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	21	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0
2. Gün	15	4	2	15	3	2	15	5	0	10	3	7
3. Gün	13	0	2	15	0	0	13	0	2	10	0	0
4. Gün	12	1	0	10	3	2	11	1	1	10	0	0
5. Gün	12	0	0	7	2	1	9	2	0	9	1	1
6. Gün	7	5	0	5	2	0	7	1	1	8	0	1
7. Gün	5	2	0	4	1	0	5	2	0	5	3	0
8. Gün	4	1	0	3	1	0	4	1	0	4	1	0
9. Gün	3	1	0	3	0	0	3	1	0	3	1	0
10. Gün	2	1	0	2	1	0	1	2	0	1	2	0
11. Gün	0	2	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
12. Gün	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
13. Gün	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
14. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-C. Plazmidlerin *Caenorhabditis elegans* patojenitesi üzerine etkisinin araştırılması deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (1. Deneme)

	A10			A15			A16			<i>E.coli</i> OP50		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	20	0	0	20	0	0	19	0	1	20	0	0
2. Gün	18	2	0	18	2	0	18	1	0	19	1	0
3. Gün	17	1	0	17	1	0	18	0	0	18	1	0
4. Gün	15	0	2	17	0	0	15	1	2	15	1	2
5. Gün	12	3	0	13	4	0	14	1	0	14	1	0
6. Gün	10	2	0	9	4	0	7	7	0	10	3	1
7. Gün	9	1	0	7	2	0	5	2	0	9	1	0
8. Gün	4	5	0	4	3	0	4	1	0	6	2	1
9. Gün	3	1	0	0	4	0	4	0	0	4	2	0
10. Gün	2	1	0	0	0	0	1	3	0	3	1	0
11. Gün	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0
12. Gün	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

EK-C. Plazmidlerin *Caenorhabditis elegans* patojenitesi üzerine etkisinin araştırılması deneyinde her bir gruba ait canlı, ölü ve deney dışı nematod sayısı (2. Deneme)

	A10			A15			A16			<i>E.coli</i> OP50		
	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı	Canlı	Ölü	Deney Dışı
1. Gün	20	0	0	20	0	0	20	0	0	19	0	1
2. Gün	15	4	1	20	0	0	20	0	0	18	1	0
3. Gün	14	1	0	20	0	0	20	0	0	18	0	0
4. Gün	13	1	0	18	2	0	17	2	1	18	0	0
5. Gün	12	1	0	14	4	0	13	3	1	14	0	4
6. Gün	12	0	0	10	3	1	12	5	1	12	2	0
7. Gün	10	2	0	5	5	0	6	4	0	11	1	0
8. Gün	10	0	0	3	2	0	2	0	0	8	2	1
9. Gün	8	2	0	2	1	0	2	1	0	7	1	0
10. Gün	3	5	0	1	0	0	1	0	0	0	0	7
11. Gün	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
12. Gün	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13. Gün	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14. Gün	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-D. BALB/c fare patojenite deneyinde izolatların enjekte edildiği her bir fare grubundaki canlı ve ölü sayısı

Enjekte edilen Suşlar										
	S. Typhimurium ATCC14028		A8 - S. Infantis		A10 - S. Kentucky		A17 - S. Enteritidis		A18 - S. Infantis	
	HB (-)	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü
0. Gün	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0
1. Gün	3	2	5	0	3	2	5	0	5	0
2. Gün	0	3	5	0	2	3	5	0	5	0
3. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
4. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
5. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
6. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
7. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
8. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
9. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
10. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
11. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
12. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
13. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
14. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
15. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
16. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
17. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
18. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
19. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
20. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0
21. Gün	0	0	5	0	2	0	5	0	5	0

EK-D. BALB/c fare patojenite deneyinde izolatların enjekte edildiği her bir fare grubundaki canlı ve ölü sayısı (Devam)

Enjekte edilen suşlar										
	A22 - S. Telaviv		A30 - S. Enteritidis		A32 - S. Infantis		PBS Negatif Kontrol		E. coli OP50	
	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü
0. Gün	5	0	5	0	5	0	3	0	3	0
1. Gün	2	3	4	1	5	0	3	0	3	0
2. Gün	0	2	3	1	5	0	3	0	3	0
3. Gün	0	0	3	0	5	0	3	0	3	0
4. Gün	0	0	1	2	5	0	3	0	3	0
5. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
6. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
7. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
8. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
9. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
10. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
11. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
12. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
13. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
14. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
15. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
16. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
17. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
18. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
19. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
20. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0
21. Gün	0	0	1	0	5	0	3	0	3	0

EK-E. BALB/c fare patojenite deneyinde izolatların enjekte edildiği her bir gruptaki fare dokularında belirlenen kolonizasyon (log cfu/organ)

	Dokulardaki Kolonizasyon (log cfu/organ)				
	Karaciğer	Dalak	İnce Bağırsak	Kolon	Çekum
S. Typhimurium					
ATCC14028					
1. Fare	8,413	7,462	8,580	8,422	7,204
2. Fare	8,855	8,522	8,681	8,643	8,362
3. Fare	8,547	5,346	7,602	7,623	6,000
4. Fare	8,155	7,447	8,875	8,176	8,041
5. Fare	7,771	7,544	7,602	7,633	7,763
S. Infantis					
A8					
1. Fare	4,330	4,540	2,623	3,505	2,176
2. Fare	3,000	3,699	2,204	2,477	1,903
3. Fare	3,778	3,000	2,505	2,826	1,301
4. Fare	2,079	2,724	3,041	1,903	1,602
5. Fare	2,964	3,301	2,114	0,000	1,301
S. Kentucky					
A10					
1. Fare	7,954	8,517	8,079	8,000	8,312
2. Fare	8,580	8,519	8,740	8,477	8,519
3. Fare	6,301	6,000	4,531	6,954	6,699
4. Fare	3,548	3,365	3,477	3,699	4,342
5. Fare	3,568	4,152	4,217	5,521	5,944
S. Enteritidis					
A17					
1. Fare	0,000	0,000	0,000	2,380	0,000
2. Fare	0,000	2,903	0,000	0,000	0,000
3. Fare	0,000	1,778	0,000	1,903	0,000
4. Fare	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5. Fare	0,000	2,033	0,000	0,000	1,000
S. Infantis					
A18					
1. Fare	3,699	5,124	4,301	4,613	4,362
2. Fare	5,623	4,230	2,903	3,204	3,398
3. Fare	2,556	2,602	1,301	2,602	1,602
4. Fare	2,000	2,000	0,000	0,000	0,000
5. Fare	2,000	3,041	3,380	3,519	4,672

EK-E. BALB/c fare patojenite deneyinde izolatların enjekte edildiği her bir gruptaki fare dokularında belirlenen kolonizasyon (log cfu/organ) (Devam)

Dokulardaki Kolonizasyon (log cfu/organ)					
	Karaciğer	Dalak	İnce Bağırsak	Kolon	Çekum
S. Telaviv					
A22					
1. Fare	8,690	8,342	9,000	7,301	8,000
2. Fare	8,342	7,477	7,903	7,778	6,845
3. Fare	7,544	7,591	8,041	8,146	8,137
4. Fare	7,732	6,301	8,041	8,146	8,137
5. Fare	7,431	7,505	6,491	8,505	8,344
S. Enteritidis					
A30					
1. Fare	8,041	7,978	7,000	8,505	6,602
2. Fare	7,301	7,301	7,602	7,699	6,602
3. Fare	8,114	7,301	8,146	7,477	7,491
4. Fare	6,301	8,079	7,301	6,255	6,792
5. Fare	5,238	3,100	2,820	2,462	2,342
S. Infantis					
A32					
1. Fare	3,724	2,501	3,009	1,845	1,699
2. Fare	3,462	2,477	2,322	2,477	1,903
3. Fare	4,377	2,699	2,079	1,000	1,000
4. Fare	2,301	3,415	2,968	0,000	0,000
5. Fare	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

KAYNAKLAR

- [1] World Health Organization, *Salmonella (non-typhoidal) 2013*, WHO, Geneva. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>
- [2] J. Hur, C. Jawale, J. Hwa Lee, *Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: A review*. Food Res Int, 45, 819-830, (2012).
- [3] K. Hoelzer, A.I. Moreno, and M. Wiedmann, *Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis*. Vet Res, 42, 34, 1-28, (2011).
- [4] P. Antues, C. Reu, J.C. Sousa, L. Pexie, N. Pestana, *Incidence of Salmonella from poultry products and their susceptibility to animal agents*. Int J Food Microbiol, 82, 2, 97-103, (2003).
- [5] C. Zhao, B. Ge, De J. Villena, R. E. Sudler, S. Yeh Zhao, D.G. White, D. Wagner, J. Meng, *Prevalence of Campylobacter spp., Escherichia Coli, and Salmonella Serovars in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef from the Greater Washington, D.C., Area*, Appl Environ Microbiol, 67, 12, 5431-5436, (2001).
- [6] J.D. Greig, A. Ravel, *Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution*, Int J Food Microbiol, 130, 2, 77-87, (2009).
- [7] P.J. Panisello, R. Rooney, P.C. Quantick, R. Stanwell-Smith, *Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems*, Int J Food Microbiol, 59, 3, 221-234, (2000).
- [8] S.L. Foley and A.M. Lynne, *Food animal-associated Salmonella challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance*, J Anim Sci 86, 173-187, (2007).
- [9] S. Schwarz, C. Kehrenberg, T.R. Walsh, *Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production*, Int J Antimicro Ag 17, 6, 431-437, (2001).
- [10] L.M. Glenn, R.L. Lindsey, J.P. Folster, G. Pecic, P. Boerlin, M.W. Gilmour, H. Harbottle, S. Zhao, P.F. McDermott, P.J. Fedorka-Cray, and J.G. Frye, *Antimicrobial Resistance Genes in Multidrug-Resistant Salmonella enterica Isolated from Animals, Retail Meats, and Humans in the United States and Canada*, Microb Drug Resist 19, 3, 175-184, (2013).
- [11] A. Carattoli, *Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance in Salmonella enterica*, Curr Issues in Mol Biol, 5, 4, 113-122, (2003).

- [12] S.L. Foley, A.M. Lynne, R. Nayak, *Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens*, *Infect Genet Evol*, 9, 4, 430-440, (2009).
- [13] R.M. Tsolis, M.N. Xavier, R.L. Santos, A.J. Baumler, *How To Become a Top Model: Impact of Animal Experimentation on Human Salmonella Disease Research*, *Infect Immun* 79, 5, 1806–1814, (2011).
- [14] C.L. Kurz, J.J. Ewbank, *Caenorhabditis elegans for the study of host–pathogen interactions*, *TIM* 8, 3, 142-144, (2000).
- [15] W. Burrows, *Textbook of microbiology, 7th ed.* (The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa., 1959)
- [16] K.H. Darwin, and V.L. Miller, *Molecular Basis of the Interaction of Salmonella with the Intestinal Mucosa*. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 3, 405-428, (1999).
- [17] D. Hanes, *Nontyphoid Salmonella, International handbook of foodborne pathogens*, (Marcel Dekker, Inc., New York, 2003).
- [18] A.K. Bhunia, *Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis*, (Springer Science + Business Media, LLC., United States of America, 2008).
- [19] P.C.F. Wong, L.C. Chai, R. Tunung, P. Jeyaletchumi, M.S. Noor Hidayah, A. Ubong, M.G. Farinazleen, Y.K. Cheah, and R. Son, *Review Article Salmonella: A foodborne pathogen*, *International Food Research Journal*, 18, 465-473, (2011).
- [20] C.A. Scherer, and S.I. Miller, *Molecular pathogenesis of Salmonellae, Principles of bacterial pathogenesis*, (Academic Press., United States of America, 2001).
- [21] J.H. Crosa, D.J. Brenner, W.H. Ewing, and S. Falkow, *Molecular relationships among the salmonellae*, *J. Bacteriol.*, 115, 307–315, (1973).
- [22] M.W. Reeves, G.M. Evins, A.A. Heiba, B.D. Plikaytis, and J.J. Farmer III. *Clonal nature of Salmonella typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of Salmonella bongori comb. nov.*, *J. Clin. Microbiol.*, 27, 313–320, (1989).
- [23] M.Y. Popoff, and L. Le Minor, *Antigenic formulas of the Salmonella serovars, 7th revision*, World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Pasteur Institute, Paris, France, (1997).
- [24] F.W. Brenner, R.G. Villar, F.J. Angulo, R. Tauxe and B. Swaminathan, *Salmonella Nomenclature*, *Journal Of Clinical Microbiology*, 38, 7, 2465-2467, (2000).

- [25] H.L. Andrews, and A.J. Baumber, *Salmonella species, Foodborne pathogens: Microbiology and molecular biology*, (Horizon Scientific Press Ltd., United Kingdom, 2005).
- [26] S.L. Foley, T.J. Johnson, S.C. Ricke, R. Nayak, J. Danzeisen, *Salmonella Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77, 4, 582-607, (2013).
- [27] M.S. Donnenberg, *Pathogenic strategies of enteric bacteria*, *Nature*, 406, 768–774, (2000).
- [28] R.V. Tauxe, *An update on Salmonella*, *Health Environ. Dig.*, 10, 1–4, (1996).
- [29] B. Bouchrif, B. Paglietti, M. Murgia, A. F. Piana, N. Cohen, M. M. Ennaji, and M. Timinouni, *Prevalence and antibiotic-resistance of Salmonella isolated from food in Morocco*, *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3, 1, 35-40, (2009).
- [30] D.G. Newell, M. Koopmans, L. Verhoef, E. Duizer, A. Aidara-Kane, H. Sprong, J. v.d. Giessen, and H. Kruse, *Food-borne diseases-the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge*, *International Journal of Food Microbiology* 139, 3-15, (2010).
- [31] D.M.A. Wong, L.F. Hald, T. Wolf, P.J. v.d. and M. Swanenburg, *Epidemiology and control measures for Salmonella in pigs and pork*. *Livestock Production Science* 76, 3, 215-222, (2002).
- [32] G.A. Grassl, B.B. Finlay, *Pathogenesis of enteric Salmonella infections*, *Current Opinion Gastroenterol.* 24, 1, 22-26, (2008).
- [33] B.L. Bearson, L. Wilson, J.W. Foster, *A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects Salmonella typhimurium against inorganic acid stress*. *J. Bacteriol.*, 180, 2409–2417, (1998).
- [34] S.M. Bearson, B.L. Bearson, M.A. Rasmussen, *Identification of Salmonella enterica serovar Typhimurium genes important for survival in the swine gastric environment*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 2829–2836, (2006).
- [35] T. Ruby, L. McLaughlin, S. Gopinath, D. Monack, *Salmonella's long-term relationship with its host*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 36, 600-615, (2012).
- [36] P. Velge, A. Wiedemann, M. Rosselin, N. Abed, Z. Boumart, A.M. Chausse, O. Grepinet, F. Namdari, S.M. Roche, A. Rossignol, I. Virlogeux- Payant, *Multiplicity of Salmonella entry mechanisms, a new paradigm for Salmonella pathogenesis*, *Open Microbiol.* 1, 243–258, (2012).
- [37] A.J. van Asten, J.E. van Dijk, *Distribution of “classic” virulence factors among Salmonella spp.* *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 44, 251-259, (2005).

- [38] M.P. Stevens, T.J. Humphrey, D.J. Maskell, ***Molecular insights into farm animal and zoonotic Salmonella infections***, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 364, 2709-2723, (2009).
- [39] R.G. Gerlach, D. Jackel, N. Geymeier, M. Hensel, ***Salmonellapathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated within invasion genes in Salmonella enterica***, Infect Immun, 75, 10, 4697-4709, (2007).
- [40] F.M. Sanchez-Vargas, M.A. Abu-El-Haija, O.G. Gomez-Duarte, ***Salmonella infections: An update on epidemiology, management, and prevention***. Travel Medicine and Infectious Disease, 9, 263-277, (2011).
- [41] J.E. Galan, ***Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work***, Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 17, 53-86, (2001).
- [42] C.P. Lostroh, C.A. Lee, ***The Salmonella pathogenicity island-1 type III secretion system***,. Microbes Infect, 3, 1281-1291, (2001).
- [43] M.C. Schlumberger, W.D. Hardt, ***Salmonella type III secretion effectors: pulling the host cell's strings***, Curr. Opin. Microbiol., 9, 46-54, (2006).
- [44] T.S. Wallis, E.E. Galyov, ***Molecular basis of Salmonella-induced enteritis***. Mol. Microbiol. 36.997-1005, (2000).
- [45] A.J. Frost, A.P. Bland, T.S. Wallis, ***The early dynamic response of the calf ileal epithelium to Salmonella typhimurium***, Vet. Pathol., 34, 369-386, (1997).
- [46] L.A. Knodler, B.A. Vallance, J. Celli, S. Winfree, B. Hansen, M. Montero, O. Steele-Mortimer, ***Dissemination of invasive Salmonella via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia***, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 107, 17733-17738, (2010).
- [47] A. Tierrez, F. Garcia-del Portillo, ***New concepts in Salmonella virulence: the importance of reducing the intracellular growth rate in the host***, Cell. Microbiol. 7, 901-909, (2005).
- [48] M. Hensel, ***Salmonella pathogenicity island 2***, Mol. Microbiol., 36, 1015-1023, (2000).
- [49] S.L. Foley, A.M. Lynne, R. Nayak, ***Salmonella challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates***, J. Anim. Sci. 86, 149-162, (2008).
- [50] M.P. Stevens, T.J. Humphrey, D.J. Maskell, ***Molecular insights into farm animal and zoonotic Salmonella infections***, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 364, 2709-2723, (2009).

- [51] S.R. Waterman, D.W. Holden, *Functions and effectors of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system*, Cell. Microbiol., 5, 501-511, (2003).
- [52] L.A. Knodler, B.A. Vallance, J. Celli, S. Winfree, B. Hansen, M. Montero, O. Steele-Mortimer, *Dissemination of invasive Salmonella via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 107, 17733-17738, (2010).
- [53] M. Hensel, J.E. Shea, S.R. Waterman, R. Mundy, T. Nikolaus, G. Banks, A. Vazquez-Torres, C. Gleeson, F.C. Fang, D.W. Holden, *Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages*, Mol. Microbiol., 30, 163-174, (1998).
- [54] S.M. Bueno, S. Riquelme, C.A. Riedel, A.M. Kalergis, *Mechanisms used by virulent Salmonella to impair dendritic cell function and evade adaptive immunity*, Immunology, 137, 28-36, (2012).
- [55] M. Sundquist, A. Rydstrom, M.J. Wick, *Immunity to Salmonella from a dendritic point of view*, Cell. Microbiol., 6,1-11, (2004).
- [56] L.W. Riley, *Molecular epidemiology of infectious diseases: principles and practices*, (ASM Press, Washington, 2004).
- [57] M. Guibourdenche, P. Roggentin, M. Mikoleit, P.I. Fields, J. Bockemuhl, P.A.D. Grimont, and F.X. Weill, *Supplement 2003-2007 (no. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme*, Res. Microbiol., 161, 26-29, (2010).
- [58] P.A.D. Grimont, and F.X. Weill *Antigenic formulae of the Salmonella serovars. Institut Pasteur & WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*, (Paris, France. 2007).
- [59] Reeves, P. R., P.R. Reeves, M. Hobbs, M.A. Valvano, M. Skurnik, C. Whitfield, D. Coplin, N. Kido, J. Klena, D. Maskell, C.R.H. Raetz, P.D. Rick, *Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature*, Trends Microbiol., 4, 495-503, (1996).
- [60] J. Scaria, R.U. Palaniappan, D. Chiu, J.A. Phan, L. Ponnala, P. McDonough, Y.T. Grohna, S. Porwollikc, M. McClellandc, C.S. Chioud, C. Chu & Y.F. Chang, *Microarray for molecular typing of Salmonella enterica serovars*, Mol. Cell. Probes, 22, 238-243, (2008).
- [61] J.R. McQuiston, P.I. Fields, R.V. Tauxe, and J.M. Logsdon, Jr., *Do Salmonella carry spare tyres?*, Trends Microbiol., 16, 142-148, (2008).

- [62] A.P. Burnens, J. Stanley, I. Sechter, and J. Nicolet. *Evolutionary origin of a monophasic Salmonella serovar, 9,12:l,v:_, revealed by IS200 profiles and restriction fragment polymorphisms of the fljB gene*, J. Clin. Microbiol., 34, 1641-1645, (1996).
- [63] P. Wattiau, C. Boland, and S. Bertrand, *Methodologies for Salmonella enterica subsp. enterica Subtyping: Gold Standards and Alternatives*, Applied And Environmental Microbiology, 77, 22, 7877-7885, (2011).
- [64] E.J. Threlfall, & J.A. Frost, *The identification, typing and fingerprinting of Salmonella: laboratory aspects and epidemiological applications*, J Appl Bacteriol, 68, 5-16, (1990).
- [65] E.S. Anderson, and R.E. Williams. *Bacteriophage typing of enteric pathogens and staphylococci and its use in epidemiology*, J. Clin. Pathol., 9, 94-127, (1956).
- [66] D.L. Baggesen, G. Sorensen, E.M. Nielsen, and H.C. Wegener. *Phage typing of Salmonella Typhimurium—is it still a useful tool for surveillance and outbreak investigation?*, Euro Surveill., 15, 19471, (2010).
- [67] M.D. Olive, & P. Bean, *Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms*, Journal of Clinical Microbiology, 37, 6, 1661-1669, (1999).
- [68] K. Wolska, and P. Szwedra, *Genetic Diversity in Microorganisms*, (InTechOpen, Croatia, 2012).
- [69] V.L. Waters. *Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance*, Front. Biosci., 4, 416-439, (1999).
- [70] M.V. Francia, A. Varsaki, M.P. Garcillan-Barcia, A. Latorre, C. Drainas, F.A. de la Cruz. *Classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids*, FEMS Microbiol. Rev., 28, 79-100, (2004).
- [71] I. Rychlik, D. Gregorova, H. Hradecka, *Distribution and function of plasmids in Salmonella enterica*, Veterinary Microbiology, 112, 1–10, (2006).
- [72] F.C. Tenover, *Plasmid fingerprinting. A tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial and community-acquired infections*, Clinics in laboratory medicine, 5, 3, 413. (1985).
- [73] D.N. Taylor, I.K. Wachsmuth, Y.H. Shangkuan, E.V. Schmidt, T.J. Barrett, J.S. Schrader, C.S. Scherach, H.B. McGee, R.A. Feldman, & D.J. Brenner, *Salmonellosis associated with marijuana: a multistate outbreak traced by plasmid fingerprinting*, New England Journal of Medicine, 306, 21, 1249-1253, (1982).

- [74] A.D. Patrick, F. Grimont and P. Bouvet, *Taxonomy of the genus Salmonella, Salmonella in Domestic Animals*, (CABI Publishing, India, 2000).
- [75] D.C. Schwartz, and C.R. Cantor, *Separation of yeast chromosomal-sized DNAs by pulsed-field gradient gel electrophoresis*, Cell, 37, 67-75, (1984).
- [76] Garaizar, J., N. López-Molina, I. Laconcha, D.L. Baggesen, A. Rementeria, A. Vivanco, A. Audicana, and I. Perales, *Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR, and pulsed-field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of Salmonella enterica serovar Enteritidis*, Appl. Environ. Microbiol., 66, 5273-5281, (2000).
- [77] T. Murase, M. Nagato, K. Shirota, H. Katoh, and K. Otsuki. *Pulsedfield gel electrophoresis-based subtyping of DNA degradation-sensitive Salmonella enterica subsp. enterica serovar Livingstone and serovar Cerro isolates obtained from a chicken layer farm*. Vet. Microbiol., 99, 139-143, (2004).
- [78] J.E. Olsen, M.N. Skov, E.J. Threlfall, and D.J. Brown, *Clonal lines of Salmonella enterica serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing*, J. Med. Microbiol., 40, 15-22, (1994).
- [79] M.B. Weide-Botjes, C.L. Kobe, and S. Schwarz. *Molecular typing of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Hadar: evaluation and application of different typing methods*, Vet. Microbiol., 61, 215-227, (1998).
- [80] A.M. Dionisi, A. Carattoli, I. Luzzi, C. Magistrali, and G. Pezzotti, *Molecular genotyping of Salmonella enterica Abortusovis by pulsed field gel electrophoresis*, Vet. Microbiol., 116, 217-223, (2006).
- [81] S. Sivapalasingam, E. Barrett, A. Kimura, S. Van Duyn, W. De Witt, M. Ying, A. Frisch, Q. Phan, E. Gould, P. Shillam, V. Reddy, T. Cooper, M. Hoekstra, C. Higgins, J.P. Sanders, R.V. Tauxe, L. Slutsker, *A multistate outbreak of Salmonella enterica Serotype Newport infection linked to mango consumption: impact of waterdip disinfestation technology*, Clin. Infect. Dis., 37,12, 1585-1590, (2003).
- [82] E.J. Threlfall, M.D. Hampton, L.R. Ward, I.R. Richardson, S. Lanser, T. Greener, *Pulsed field gel electrophoresis identifies an outbreak of Salmonella enterica serotype Montevideo infection associated with a supermarket hot food outlet*, Commun. Dis. Public Health, 2, 207-209, (1999).
- [83] A. Kerouanton, M. Marault, R. Lailier, F.X. Weill, C. Feurer, E. Espié, A. Brisabois, *Pulsed-field gel electrophoresis subtyping database for foodborne Salmonella enterica serotype discrimination*, Foodborne Pathog. Dis., 4, 3, 293-303, (2007).

- [84] W. Pierre, B. Cecile, and B. Sophie, *Methodologies for Salmonella enterica subsp. enterica subtyping: gold standards and alternatives*, Applied and environmental microbiology, 77, 22, 7877-7885, (2011).
- [85] F. Grimont, and P.A.D. Grimont, *Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools*, Annales Institut Pasteur/Microbiologie, 137B, 165–175. (1986).
- [86] J. Stanley, and N. Baquar, *Phylogenetics of Salmonella enteritidis*, International Journal of Food Microbiology, 21, 79–87, (1994).
- [87] J.E. Olsen, M. Skov, Ø. Angen, E.J. Threlfall, and M. Bisgaard, *Genomic relationships between selected phage types of Salmonella enterica serovar Typhimurium defined by ribotyping, IS200 typing and PFGE*, Microbiology, 143, 1471–1479, (1997).
- [88] J.E. Olsen, *Molecular Typing of Salmonella. Salmonella in Domestic Animals*, (CABI Publishing, India, 2000).
- [89] S. Lam, & J.R. Roth, *IS200: a Salmonella-specific insertion sequence*, Cell, 34, 951-60, (1983).
- [90] E.J. Threlfall, E. Torre, L.R. Ward, A. Davalos-Perez, B. Rowe, & I. Gibert, *Insertion sequence IS200 fingerprinting of Salmonella typhi: an assessment of epidemiological applicability*, Epidemiol Infect, 112, 253- 61, (1994).
- [91] N.J. Jeffreys, G.S. James, R. Chiew, & G.L. Gilbert, *Practical evaluation of molecular subtyping and phage typing in outbreaks of infection due to Salmonella enterica serotype typhimurium*, Pathology, 33, 66-72. (2001).
- [92] J.G.K. Williams, A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey, *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers*, Nucleic Acids Research, 18, 6531-6535, (1990).
- [93] J. Welsh, and M. McClelland, *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*, Nucleic Acids Research, 18, 7213-7218, (1990).
- [94] J.J. Carraminana, F. Humbert, G. Ermel, and P. Colin, *Molecular epidemiological investigation of Salmonella Typhimurium strains related to an egg borne outbreak*, Research Microbiology, 148, 633-636, (1997).
- [95] L. Betancor, S.F. Felipe, A. Martinez, M. Pereira, G. Agotra, M.A. Rodríguez, R. Vignoli, and J.A. Chabalgoity, *Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of Salmonella enterica serovars Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002*. Journal of Clinical Microbiology, 42, 1155-1162, (2003).

- [96] S.M. Soto, B. Guerra, A. del Cerro, M.A. Gonzalez-Hevia, and M.C. Mendoza, *Outbreaks and sporadic cases of Salmonella serovar Panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance*, International Journal of Food Microbiology, 71, 35-43, (2001).
- [97] J. Versalovic, T. Koeuth, and J. R. Lupski, *Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes*, Nucl Acid Res., 19, 6823–6831, (1991).
- [98] J.L.W. Rademaker, F.J. Louws, and F.J.De Bruijn, *Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting*. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*, (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1-26, 1997).
- [99] L.A.J.T. Van Lith, and H.J.M. Aarts, *Polymerase chain reaction identification of Salmonella serotypes*, Appl Microbiol Lett, 19, 273–276, (1994).
- [100] H. Lim, K.H. Lee, C.H. Hong, G.J. Bahk, W.S. Choi, *Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of Salmonella spp.*, Int J Food Microbiol, 105, 411-418, (2005).
- [101] G. Nath, M. Pushpa, A.K. Gulati, *ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of Salmonella Typhi strains isolated over a period of two decades*, Infect Genet Evol, 10, 530-536, (2010).
- [102] W. Yuan, T.J. Chai, Z.N. Miao, *ERIC- PCR identification of the spread of airborne Escherichia coli in pig houses*, Sci Total Environ, 408, 1446-1450, (2010).
- [103] K. Rantsiou, V. Alessandria, L. Cocolin, *Prevalence of Shiga toxinproducing Escherichia coli in food products of animal origin as determined by molecular methods*, Int J Food Microbiol, 154, 37-43, (2012).
- [104] F. Adzitey, G.R. Rahmat Ali, N. Huda, T. Cogan, J. Corry, *Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of Listeria monocytogenes isolated from ducks, their rearing and processing environments in Penang, Malaysia*, Food Control, 32, 607-614, (2013).
- [105] L-H.Su, C-H.Chiu, C.Chu, and J.T. Ou, *Antimicrobial Resistance in Nontyphoid Salmonella Serotypes: A Global Challenge*, Clinical Infectious Diseases, 39, 546-51, (2004).
- [106] S. Chen, S.H. Zhao, D.G. White, C.M. Schroeder, R. Lu, H.C. Yang, P.F. McDermott, S. Ayers, J. Meng, *Characterization of multiple-antimicrobial-resistant Salmonella serovars isolated from retail meats*, Applied and Environmental Microbiology, 70, 1, 1-7, (2004).

- [107] W.A. Gebreyes, and S. Thakur, *Multidrug-resistant Salmonella enterica serovars Muenchen from pigs and humans and potential interserovar transfer of antimicrobial resistance*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49, 503–511. (2005).
- [108] S. Zhao, D.G. White, S.L. Friedman, A. Glenn, K. Blickenstaff, S.L. Ayers, J.W. Abbott, E. Hall-Robinson, P.F. McDermott, *Antimicrobial resistance in Salmonella enterica serovar Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006*, Applied and Environmental Microbiology, 74, 6656–6662, (2008).
- [109] M.R. Mulvey, D.A. Boyd, A.B. Olson, B. Doublet, and A. Cloeckaert, *The genetics of Salmonella genomic island 1*, Microbes and Infection, 8, 1915–1922, (2006).
- [110] K.E. Holt, N.R.Thomson, J. Wain, M.D. Phan, S. Nair, R. Hasan, Z.A. Bhutta, M.A. Quail, H. Norbertczak, D. Walker, G. Dougan, J. Parkhill, *Multidrug resistant Salmonella enterica serovar paratyphi A harbors IncHII plasmids similar to those found in serovar typhi*, Journal of Bacteriology, 189, 4257–4264, (2007).
- [111] N. Nògràdy, A. Tòth, A. Kostyák, J. Pàszi, and B. Nagy, *Emergence of multidrug resistant clones of Salmonella Infantis in broiler chickens and humans in Hungary*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 60, 3, 645–648, (2007).
- [112] M.G.Abatcha, Z.Zakaria, D.G. Kaur and K.L. Thong, *Review Article: A trends of Salmonella and antibiotic resistance*, Advances in Life Science and Technology, 17, 9–21, (2014).
- [113] P. McDermott, R. Walker, D. White, *Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance*, Int J Toxicol., 22, 135–43, (2003).
- [114] B. Catry, H. Laevens, L. Devriese, G. Opsomer, A. De Kruif, *Antimicrobial resistance in livestock*, J Vet Pharmacol Ther., 26, 2, 81–93, (2003).
- [115] S. Levy, *The antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative powers*, (Perseus Publishing, Cambridge, MA., 2002).
- [116] L. Tollefson, B.E. Karp, *Human health impact from antimicrobial use in food animals*, Méd maladies infect, 34, 11, 514–521, (2004).
- [117] S. B. Levy, *Microbial resistance to antibiotics. An evolving and persistent problem*, Lancet, 10, 83–88, (1982).
- [118] F.M. Aarestrup, *Monitoring of Antimicrobial Resistance Among Food Animals: Principles and Limitations*, J. Vet. Med., 51, 380–388, (2004).

- [119] E.J. Threlfall, *Antimicrobial drug resistance in Salmonella: problems and perspectives in food- and water-borne infections*, FEMS Microbiol. Rev., 26, 141-148, (2002).
- [120] E.J. Threlfall, L.R. Ward, J.A. Skinner, and B. Rowe, *Increase in multiple antibiotic resistance in nontyphoidal salmonellas from humans in England and Wales: a comparison of data for 1994 and 1996*, Microb. Drug. Resist., 3, 263-266, (1997).
- [121] S. Holmberg, J. Wells, M.Cohen, *Animal-to-man transmission of antimicrobial-resistant Salmonella: investigations of US outbreaks, 1971–1983*, Science, 225, 833–835, (1984).
- [122] S. Holmberg, S. Solomon, P. Blake, *Health and economic impacts of antimicrobial resistance*, Rev Infect Dis., 9, 1065–78, (1987).
- [123] World Health Organization. *Joint FAO/OIE/WHO expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: scientific assessment*, Geneva, 1–5 December, (2003).
- [124] R.L. Santos, S. Zhang, R.M. Tsohis, R.A. Kingsley, L.G. Adams, A.J. Bäumlner, *Animal models of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever*. Microbes Infect., 3, 14, 1335–1344, (2001).
- [125] F. Loeffler, *Ueber Epidemien unter den im hygienishcen Institute zu Greifswald gehaltenen Mäusen und über die Bekämpfung der Feldmausplage*, Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd., 11, 129–141, (1892).
- [126] R.M. Tsohis, R.A. Kingsley, S.M. Townsend, T.A. Ficht, L.G. Adams, A.J. Bäumlner, *Of mice, calves, and men. Comparison of the mouse typhoid model with other Salmonella infections*, Adv. Exp. Med. Biol., 473, 261–274, (1999).
- [127] H.W.Mittrücker and S.H.E. Kaufmann, *Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice*. Journal of Leukocyte Biology, 64, 4, 457-463, (2000).
- [128] J.M. Blackwell, T. Goswami, C.A.W. Evans, D. Sibthorpe, N. Papo, J.K. White, S. Searle, E.N. Miller, C.S. Peacock, H. Mohammed, M. Ibrahim, *SLC11A1 (formerly NRAMPI) and disease resistance*, Cellular Microbiology, 3, 12, 773–784. (2001).
- [129] S.K. Hoiseth, and B.A. Stocker, *Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines*, Nature, 291, 238–239, (1981).
- [130] C.O. Tacket, D.M. Hone, G.A. Losonsky, L. Guers, R. Edelman, M.M. Levine, *Clinical acceptability and immunogenicity of CVD 908 Salmonella typhi vaccine strain*, Vaccine, 10, 7, 443–446, (1992).

- [131] C.O. Tacket, M.B. Sztein, G.A. Losonsky, S.S. Wasserman, J.P. Nataro, R. Edelman, D. Pickard, G. Dougan, S.N. Chatfield, M.M. Levine, *Safety of live oral Salmonella typhi vaccine strains with deletions in htrA and aroC aroD and immune response in humans*, Infect. Immun., 65, 2, 452–456, (1997).
- [132] P. Mastroeni, B. Villarreal-Ramos, and C.E. Hormaeche, *Adoptive transfer of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in innately susceptible BALB/c mice requires both immune serum and T cells*, Infect. Immun., 61, 3981-3984, (1993).
- [133] H.L. Andrews-Polymenis, A.J. Baumler, B.A. McCormick, and F.C. Fang, *Taming the elephant: Salmonella biology, pathogenesis, and prevention*, Infect. Immun., 78, 2356-2369, (2010).
- [134] P.A. Gulig, and R. Curtiss III, *Cloning and transposon insertion mutagenesis of virulence genes of the 100-kilobase plasmid of Salmonella typhimurium*, Infect. Immun., 56, 3262-3271, (1988).
- [135] M. Hensel, J.E. Shea, C. Gleeson, M.D. Jones, E. Dalton, D.W. Holden, *Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection*, Science, 269, 3, 400-403, (1995).
- [136] H. Ochman, F.C. Soncini, F. Solomon, and E.A. Groisman, *Identification of a pathogenicity island for Salmonella survival in host cells*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93, 7800-7804, (1996).
- [137] D.E. Brown, M.W. McCoy, M.C. Pilonieta, R.N. Nix, and C.S. Detweiler, *Chronic murine typhoid fever is a natural model of secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis*, PLoS One, 5, e9441, (2010).
- [138] T.D. Lawley, K. Chan, L.J. Thompson, C.C. Kim, G.R. Govoni, & D.M. Monack, *Genome-Wide Screen for Salmonella Genes Required for Long-Term Systemic Infection of the Mouse*, PLoS Pathogens, 2,2, e11, (2006).
- [139] D.M. Monack, D.M. Bouley, and S. Falkow, *Salmonella typhimurium persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nramp1^{-/-} mice and can be reactivated by IFN γ neutralization*, J. Exp. Med., 199, 231-241, (2004).
- [140] C.W. Dorsey, M.C. Laarakker, A.D. Humphries, E.H. Weening, and A.J. Baumler. *Salmonella enterica serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin*. Mol. Microbiol., 57, 196–211, (2005).
- [141] E.H. Weening, J.D. Barker, M.C. Laarakker, A.D. Humphries, R.M. Tsolis, A.J. Bäumlner, *The Salmonella enterica serotype Typhimurium lpf, bcf, stb, stc, std, and sth fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice*, Infect. Immun., 73, 6, 3358-3366, (2005).

- [142] T.D. Lawley, D.M. Bouley, Y.E. Hoy, C. Gerke, D.A. Relman, D.M. Monack, ***Host transmission of Salmonella enterica serovar Typhimurium is controlled by virulence factors and indigenous intestinal microbiota***, Infect. Immun., 76, 1, 403-416, (2008).
- [143] A. Menendez, E.T. Arena, J.A. Guttman, L. Thorson, B.A. Vallance, W. Vogl, and B.B. Finlay, ***Salmonella infection of gallbladder epithelial cells drives local inflammation and injury in a model of acute typhoid fever***, J. Infect. Dis., 200, 11, 1703-1713, (2009).
- [144] R.W. Crawford, R. Rosales-Reyes, L. Ramírez-Aguilar Mde, O. Chapa-Azuela, C. Alpuche-Aranda, J.S.Gunn, ***Gallstones play a significant role in Salmonella spp. gallbladder colonization and carriage***, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 107, 9, 4353-4358, (2010).
- [145] M.C. Swearingen, S. Porwollik, P.T. Desai, M. McClelland, B.M. Ahmer ***Virulence of 32 Salmonella strains in mice***, PLoS One, 7, e36043, (2012).
- [146] J. Suez, S. Porwollik, A. Dagan, A. Marzel, Y.I. Schorr, P.T. Desai, V. Agmon, M. McClelland, G. Rahav, O. Gal-Mor, ***Virulence Gene Profiling and Pathogenicity Characterization of Non-Typhoidal Salmonella Accounted for Invasive Disease in Humans***, PLoS ONE, 8, 3, e58449, (2013).
- [147] S. Brenner, ***The genetics of Caenorhabditis elegans***, Genetics, 77, 71-94, (1974).
- [148] J.J. Ewbank, ***Tackling both sides of the host-pathogen equation with Caenorhabditis elegans***, Microbes Infect, 4, 247-256, (2002).
- [149] C.L. Kurz, M. Shapira, K. Chen, D.L. Baillie, & M.W. Tan, ***Caenorhabditis elegans pgp-5 is involved in resistance to bacterial infection and heavy metal and its regulation requires TIR-1 and a p38 Map Kinase cascade***, Biochem Biophys Res Commun, 63, 438-443, (2007).
- [150] http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro.html
- [151] M.W. Tan, S. Majahan-Miklos, F.M. Ausubel, ***Killing of Caenorhabditis elegans by Pseudomonas aeruginosa used to model mammalian bacterial pathogenesis***, Proc Natl Acad Sci USA, 96, 2 715-720, (1999).
- [152] A. Aballay, P. Yorgey, F.M. Ausubel, ***Salmonella typhimurium proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of Caenorhabditis elegans***, Curr Biol 10, 23, 1539-1542, (2000).
- [153] A. Labrousse, S. Chauvet, C. Couillault, C.L. Kurz, J.J. Ewbank, ***Caenorhabditis elegans is a model host for Salmonella typhimurium***, Curr Biol, 10, 23, 1543-1545, (2000).

- [154] C.L. Kurz, J.J. Ewbank, *Caenorhabditis elegans: an emerging genetic model for the study of innate immunity*, Nat Rev Genet, 4, 5, 380-390. (2003).
- [155] C.D. Sifri, J. Begun and F.M. Ausubel, *The worm has turned – microbial virulence modeled in Caenorhabditis elegans*, TRENDS in Microbiology, 2013, 3, 119-127, (2005).
- [156] K. Jia, C. Thomas, M. Akbar, Q. Sun, B. Adams-Huet, C. Gilpin, & B. Levine, *Autophagy genes protect against Salmonella typhimurium infection and mediate signaling-regulated pathogen resistance*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 106, 34, 14564-14569, (2009).
- [157] A. Aballay, E. Drenkard, L.R. Hilbun, F.M. Ausubel, *Caenorhabditis elegans innate immune response triggered by Salmonella enterica requires intact LPS and is mediated by a MAPK signaling pathway*, Curr. Biol., 13, 47-52, (2003).
- [158] J.L. Tenor, B.A. McCormick, F.M. Ausubel, A. Aballay, *Caenorhabditis elegans-based screen identifies Salmonella virulence factors required for conserved host-pathogen interactions*, Curr. Biol., 14, 1018-1024, (2004).
- [159] R.A. Alegado, M.W. Tan, *Resistance to antimicrobial peptides contributes to persistence of Salmonella typhimurium in the C. elegans intestine*, Cell. Microbiol., 10, 1259-1273, (2008).
- [160] E.K. Marsh and R.C. May, *Caenorhabditis elegans, a Model Organism for Investigating Immunity*, Applied and Environmental Microbiology, 78, 7, 2017-2081, (2012).
- [161] <http://genomes.urv.cat/UPGMA/index.php?entrada=Example2>
- [162] C.I. Kado, S.T. Liu, *Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids*, J Bacteriol, 145, 3, 1365-1373, (1981).
- [163] <http://www.gelalyzer.com/download.html>
- [164] Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-First Informational Supplement, M100-S21**, (CLSI, Wayne, PA., 2011).
- [165] I. Wiegand, K. Hilpert & R.E.W. Hancock, *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances*, Nat Protoc, 3, 2, 163-175, (2008).
- [166] T. Stiernagle, **Maintenance of C. elegans (February 11, 2006)**, <http://www.wormbook.org>.

- [167] T. Ikeda, C. Yasui, K. Hoshino, K. Arikawa, Y. Nishikawa *Influence of lactic acid bacteria on longevity of Caenorhabditis elegans and host defense against Salmonella enterica serovar Enteritidis*, Appl Environ Microbiol, 73, 20, 6404-6409, (2007).
- [168] M.A. Zaman, M.H. Pasha, M.Z. Akhter, *Plasmid Curing of Escherichia coli Cells with Ethidium Bromide, Sodium Dodecyl Sulfate and Acridine Orange*, Bangladesh J Microbiol., 27, 1. 28-31, (2010).
- [169] R. Kumar, P.K. Surendran, N. Thampuran. *Detection and Characterization of virulence factors in lactose positive and lactose negative Salmonella serovars isolated from seafood*, Food Control, 20, 376-380, (2009).
- [170] http://www.cdc.gov/salmonella/reportspubs/salmonella-atlas/serotyping_importance.html
- [171] O.Ş. Çelik, *İstanbul'da görülen tifo vakalarında tifo basili tipleri*. İst Seririyatı Mec, 18, 6, 92-7, (1936).
- [172] K. Töreci, Ö. Anđ, *Türkiye'de saptanmış olan Salmonella serovarlari ve salmonellozların genel değeriendirilmesi*, Türk Mikrobiyol Cem Derg, 21, 1, 118. (1991).
- [173] K. Töreci, B. Erdem, B. Öngen, *Türkiye'de 2011 Yılı Sonuna Kadar İzolasyonu Bildirilen Salmonella Serovarlari*. Mikrobiyol Bul, 47, 3, 442-460, (2013).
- [174] M. Velhner, G. Kozoderović, E. Grego, N. Galić, I. Stojanov, Z. Jelesić, C. Kehrenberg, *Clonal Spread of Salmonella enterica Serovar Infantis in Serbia: Acquisition of Mutations in the Topoisomerase Genes gyrA and parC Leads to Increased Resistance to Fluoroquinolones*, Zoonoses Public Health, 61, 5, 364-370, (2014).
- [175] E. Hauser, E. Tietze, R. Helmuth, E. Junker, R. Prager, A. Schroeter, W. Rabsch, A. Fruth, A. Toboldt, B. Malorny, *Clonal dissemination of Salmonella enterica serovar Infantis in Germany*, Foodborne Pathog Dis, 9, 4, 352-360, (2012).
- [176] K. Ozdemir, S. Acar, *Plasmid Profile and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis of Salmonella enterica Isolates from Humans in Turkey*, PLoS ONE, 9, 5, 1-7, (2014).
- [177] İ. Erol, *Ankara'da tüketime sunulan kıymalarda Salmonella'ların varlığı ve serotip dağılımı*, Turkish J Vet Anim Sci, 23, 321-5, (1999).
- [178] Ö. Küplülü, *Sığır karkaslarında Salmonella kontaminasyonu ve serotip dağılımı*, Ankara Üniv Vet Fak Derg, 46, 1, 25-34, (1999).

- [179] D. Gülmez, D. Gür, G. Haşçelik, R. Güleşen, B. Levent, *Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağına (UEPLA) Dâhil Olan Bir Üniversite Hastanesinin Deneyimleri: Dört Yıllık Salmonella, Shigella ve Campylobacter Verileri*, Türk Mikrobiyol Cem Derg, 42, 3, 85-92, (2012).
- [180] M. Costas, *Classification, identification and typing of bacteria by the analysis of their one-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic protein patterns*. Adv. Electrophor.. 5, 351-408, (1992).
- [181] M. Heyndrickx, K. Vandemeulebroecke, P. Scheldeman, K. Kersters, P. De Vos, N.A. Logan, A.M. Aziz, N. Ali, and R.C. W. Berkeley. *A polyphasic reassessment of the genus Paenibacillus, reclassification of Bacillus lautus (Nakamura 1984) as Paenibacillus lautus comb. nov. and of Bacillus peoriae (Montefusco et al. 1993) as Paenibacillus peoriae comb. nov., and emended descriptions of P. lautus and of P. peoriae*, Int. J. Syst. Bacteriol., 46, 988–1003, (1996).
- [182] G. Rasschaert, K. Houf, H. Imberechts, K. Grijspeerdt, L. De Zutter, and M. Heyndrickx, *Comparison of Five Repetitive-Sequence-Based PCR Typing Methods for Molecular Discrimination of Salmonella enterica Isolates*, Journal Of Clinical Microbiology, 43, 8, 3615-3623, (2005).
- [183] M. D. Burr, K.L. Josephson, and IL. Pepper, *An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating Salmonella serotypes*, Lett. Appl. Microbiol., 27:24–30, (1998).
- [184] Y. Milleman, M.C. Lesage-Descauses, J. P. Lafont, and E. Chaslus-Dancla, *Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiologic studies of Salmonella*, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 14, 129-134, (1996).
- [185] I. Fendri, A. Ben Hassena, N. Grosset, M. Barkallah, L. Khannous, V. Chuat, M. Gautier, R. Gdoura, *Genetic Diversity of Food-Isolated Salmonella Strains through Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR)*, PLoS ONE, 8, 12, e8135, (2013).
- [186] B. Erdem, S.S. Ercis, G. Hascelik, D. Gurc, A.D. Aysev, *Antimicrobial resistance of Salmonella enterica group C strains isolated from humans in Turkey, 2000–2002*, Int J Antimicro Ag, 26, 1, 33-37, (2005).
- [187] E. Us, B. Erdem, A. Tekeli, D. Gerçeker, B. Saran, M. Bayramova, F. Şahin, *Salmonella Serotip Enteritidis İzolatlarının Plazmid Profil Analizi ve “Pulsed Field” Jel Elektrofrezisi ile İncelenmesi*, Mikrobiyol Bul, 45, 2, 210-227, (2011).

- [188] M. Hoffmann, S. Zhao, J. Pettengill, Y. Luo, S.R. Monday, J. Abbott, S.L. Ayers, H.N. Cinar, T. Muruvanda, C. Li, M.W. Allard, J. Whichard, J. Meng, E.W. Brown, and P.F. McDermott, ***Comparative Genomic Analysis and Virulence Differences in Closely Related Salmonella enterica Serotype Heidelberg Isolates from Humans, Retail Meats, and Animals***, Genome Biol. Evol., 6, 5, 1046-1068, (2014).
- [189] L. Martin, M. Fyfe, K. Doré, A. Jane, B.F. Pollari, B. Henry, D. Middleton, R. Ahmed, F. Jamieson, B. Ciebin, S.A. McEwen, ***Increased burden of illness associated with antimicrobial-resistant Salmonella enterica serotype typhimurium infections***, The J of Infec Dis, 189, 3, 377-384, (2004).
- [190] J. Davies, D. Davies, ***Origins and Evolution of Antibiotic Resistance***, Microbiol Mol Biol Rev, 74, 3, 417-433, (2010).
- [191] S.A. McEwen, P.J. Fedorka-Cray, ***Antimicrobial Use and Resistance in Animals***, Clinical Infectious Diseases, 34, 3, 93-106, (2002).
- [192] F. Angulo, V. Nargund, T. Chiller, ***Evidence of an Association Between Use of Anti-microbial Agents in Food Animals and Anti-microbial Resistance Among Bacteria Isolated from Humans and the Human Health Consequences of Such Resistance***, J Vet Med, 51, 8-9, 374-379, (2004).
- [193] J. Stevenson, K. Gay, T. Barrett, F. Medalla, T. Chiller, F. Angulo, ***Increase in Nalidixic Acid Resistance among Non-Typhi Salmonella enterica Isolates in the United States from 1996 to 2003***, Antimicrob Agents Chemother, 51, 1, 195-197, (2007).
- [194] F. Albayrak, F. Cokca, B. Erdem, A.D. Aysev, ***Predictive value of nalidixic acid resistance for detecting salmonellae with decreased ciprofloxacin susceptibility***, Int J Antimicro Ag, 23, 4, 332-336, (2004).
- [195] S. Ercis, B. Erdem, G. Hasçelik, D. Gür, ***Nalidixic acid resistance in Salmonella strains with decreased susceptibility to ciprofloxacin isolated from humans in Turkey***, Jpn J Infect Dis., 59, 2, 117-9, (2006).
- [196] D.A. Garsin, C.D. Sifri, E. Mylonakis, X. Qin, K.V. Singh, B.E. Murray, S.B. Calderwood, and F.M. Ausubel, ***A simple model host for identifying grampositive virulence factors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, 98, 10892-10897, (2001).
- [197] K. Chai-Hoon, S. Jiun-Horng, Shiran MS, R. Son, S. Sabrina, A. Salleh, N.L. Learn Han, C.Y. Kqueen, ***Caenorhabditis elegans-based analysis of Salmonella enterica***, Int Food Res J, 17, 4, 845-852, (2010).

- [198] Hoffmann M, Zhao S, Pettengill J, Y. Luo, S.R. Monday, J. Abbott, S.L. Ayers, H.N. Cinar, T. Muruvanda, C. Li, M.W. Allard, J. Whichard, J. Meng, E.W. Brown, P.F. McDermott, ***Comparative Genomic Analysis and Virulence Differences in Closely Related Salmonella enterica Serotype Heidelberg Isolates from Humans, Retail Meats, and Animals***, Genome Biol. Evol., 6, 5, 1046-1068, (2014).
- [199] L.A. Merino, M.C. Ronconi, M.M. Navia, J. Ruiz, J.M. Sierra, N.B. Cech, N.S. Lodeiro, J. Vila, ***Analysis of the clonal relationship among clinical isolates of Salmonella enterica serovar Infantis by different typing methods***, Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 45, 119-123, (2003).
- [200] M. Suar, J. Jantsch, S. Hapfelmeier, M. Kremer, T. Stallmach, P.A. Barrow, W.D. Hardt, ***Virulence of broad- and narrow-host-range Salmonella enterica serovars in the streptomycin-pretreated mouse model***, Infect Immun, 74, 1, 632–644, (2006).
- [201] C.A Silva, C.J. Blondel, C.P. Quezada, S. Porwollik, H.L Andrews-Polymenis., C.S.S. Toro, M. Zaldívar, I. Contreras, M. McClelland, and C.A. Santiviagoa, ***Infection of Mice by Salmonella enterica Serovar Enteritidis Involves Additional Genes That Are Absent in the Genome of Serovar Typhimurium***, Infection and Immunity, 80, 2, 839–849, (2012).
- [202] K.M. Osman, I.M.I. Moussa, A.M.M. Yousef, M.M. Aly, M.I. Radwan and H.A. Alwathnani, ***Pathogenicity of Some Avian Salmonella Serovars in Two Different Animal Models: SPFChickens and BALB/c Mice***, Environment & We An International Journal of Science & Technology, 5, 65-78, (2010).
- [203] R.A. Murray, and C.A. Lee, ***Invasion Genes Are Not Required for Salmonella enterica Serovar Typhimurium To Breach the Intestinal Epithelium: Evidence That Salmonella Pathogenicity Island 1 Has Alternative Functions during Infection***, Infection And Immunity, 68, 9, 5050-5055, (2000).
- [204] J.L. Tenor, B.A. McCormick, F.M. Ausubel, and A. Aballay, ***Caenorhabditis elegans-Based Screen Identifies Salmonella Virulence Factors Required for Conserved Host-Pathogen Interactions***, Current Biology. 14, 1018-1024, (2004).
- [205] R.L. Wilson, J. Elthon, S. Clegg, and B.D. Jones, ***Salmonella enterica serovars gallinarum and pullorum expressing Salmonella entericaserovar Typhimurium type 1 fimbriae exhibit increased invasiveness for mammalian cells***, Infect. Immun., 68:, 4782-4785, (2000).
- [206] A.K. Chopra, J. H. Huang, X. Xu, K. Burden, D.W. Niesel, M.W. Rosenbaum, V.L. Popov, and J.W. Peterson, ***Role of Salmonella enterotoxin in overall virulence of the organism***, Microb. Pathog., 27, 155-171, (1999).

- [207] S.W. Lindgren, , I. Stojiljkovic, and F. Heffron, ***Macrophage killing is an essential virulence mechanism of Salmonella typhimurium***, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 4197-4201, (1996).
- [208] P.R. Watson, E.E. Galyov, S.M. Paulin, P.W. Jones, and T.M. Wallis, ***Mutation of invH, but not stn, reduced Salmonella-induced enteritis in cattle***, Infect. Immun., 66, 1432-1438, (1998).
- [209] T.S.M. Wallis, M. Wood, P. Watson, S. Paulin, and M. Jones, ***Sips, Sops, and SPIs but not stn influence Salmonella enteropathogenesis***, Adv. Exp. Med. Biol., 473, 275-280, (1999).
- [210] M. Nakano, E. Yamasaki, A. Ichinose, T. Shimohata, A. Takahashi, J.K. Akada, K. Nakamura, J. Moss, T. Hirayama, H. Kurazono, & H. Kurazono, ***Salmonella enterotoxin (Stn) regulates membrane composition and integrity***. Disease models & mechanisms, 5, 4, 515-521, (2012).

ÖZGEÇMİŞ

26 Kasım 1986 yılında Ankara'da doğdum. Lise eğitimimi 2004 yılında Dr. Binnaz Ege-Dr. Rıdvan Ege Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2008 yılında Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden mezun oldum. Yüksek lisans eğitimimi Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda 2010 yılında tamamladım. 2011 yılında Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) kapsamında Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak başladığım görevime halen devam etmekteyim.

TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER

SCI Expanded Kapsamındaki Yayınlar

Aksoy, D., Şen, E., *Gıda Kökenli Salmonella enterica Suşlarının Patojenik Fenotiplerinin ve Virülans Determinantlarının Caenorhabditis elegans Deneysel Hayvan Modelinde İncelenmesi*, Mikrobiyoloji Bülteni, 49, 4, 513-524, (2015).

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Aksoy, D., Şen E., *Determination of Virulence of Food-Borne Salmonella Serotypes by Using Caenorhabditis elegans as a Model System*, 6. Congress of European Microbiologist, 7-11 June 2015. Maastricht, The Netherlands, (2015).

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Yüksel, D., Şen, E., *Edirne İlindeki Gıda Kökenli Salmonella Suşlarının Antimikrobiyal Direncinin Belirlenmesi*, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, (2014).