



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



ARO A DEFECTİF MUTANT SALMONELLA INFANTİS ELDE EDİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

İnci Başak KAYA

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI**

**ANKARA
2017**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AROA DEFEKTİF MUTANT SALMONELLA INFANTIS
ELDE EDİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

İnci Başak KAYA

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hakan YARDIMCI

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
16L0239005 proje numarası ile desteklenmiştir**

ANKARA

2017

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “AroA Defektif Mutant *Salmonella* Infantis Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: İnci Başak KAYA

Tarih: 03.10.2017

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Anabilim Dalında
İnci Başak KAYA tarafından hazırlanan
“AroA Defektif Mutant *Salmonella* Infantis Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu” adlı
tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile
kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Canlı Attenüe <i>Salmonella</i> Aşıları	6
1.2. İnaktif Aşılar	6
1.3. Subunit Aşılar	7
1.4. Gelecekte Aşı Teknolojisi	8
1.4.1. DNA Aşıları	8
1.4.2. Vektör Aşılar	9
1.4.3. Okzotrofik Mutant Aşılar (Aromatik Aminoasit Mutantları)	9
2. GEREÇ ve YÖNTEM	13
2.1. Gereç	13
2.1.1. Kullanılan Suşlar	13
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri	13
2.1.3. Biyokimyasal Testlerde Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar	17
2.1.4. Moleküler Analizlerde Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Solüsyonlar	19
2.2. Yöntem	20
2.2.1. Kullanılacak Suşun Hazırlanması	20
2.2.2. Bakteriyel Genom İzolasyonu	20
2.2.3. Hedef Genom Bölgesinin Belirlenmesi ve PCR ile Çoğaltılması	21
2.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme	22
2.2.5. PCR Ürününün Pürifikasyonu	23
2.2.6. PCR Ürününün Taşıyıcı Plazmide (Shuttle Plazmid) Klonlanması	23
2.2.7. pJETaroA Vektöründen <i>aroA</i> Gen Bölgesinin Kesilmesi ve Elde Edilmesi	25
2.2.8. Elde Edilen <i>aroA</i> Gen Bölgesi Ürününün Blunt-end Haline Dönüştürülmesi	26
2.2.9. GFP (Green Fluorescent Protein) Geni Elde Edilmesi ve Çoğaltılması	27
2.2.10. pJETaroA(-) Vektörü İçine GFP Gen Bölgesinin Yerleştirilmesi	27
2.2.11. pJETaroA(-)GFP Plazmidinin Doğrulanması	28
2.2.12. Rekombinant Bakterinin Oluşturulması	30
2.2.13. Rekombinant Bakterinin Doğrulanması	30
2.2.13.1. PCR Analizi	31
2.2.13.2. Plazmid Eliminasyonu	32
2.2.13.3. Sekans Analizi	32
2.2.13.4. Western Blot Analizi	33
2.2.14. Rekombinant Bakterinin Karakterizasyonu	34

2.2.14.1. Fenotipik Değerlendirme	35
2.2.14.1.1. Biyokimyasal ve Üreme Özellikleri	35
2.2.14.1.2. Hareket Özellikleri	35
2.2.14.1.3. Antibiyotik Duyarlılık Özellikleri	35
2.2.14.1.4. EDTA Duyarlılık Testi	36
2.2.14.1.5. <i>İn Vitro</i> Adezyon ve İnvazyon Testleri	37
2.2.14.2. Genotipik Değerlendirme	38
3. BULGULAR	41
3.1. Kullanılacak Suşun Seçimi ve Genom İzolasyon Bulguları	41
3.2. Hedef Genom Bölgesinin PCR Analiz Bulguları	41
3.3. Klonlama Bulguları	42
3.4. pJETaroA Vektöründen Elde Edilen Gen Bölgesi Bulguları	42
3.5. Bakteri Hücresinde İfade Olabilen Yeşil Floresan Protein (GFP) Kodlayan Gene Ait Bulgular	43
3.6. GFP Geni Klonlama Bulguları	44
3.7. Rekombinant Bakterinin Doğrulanması ve Analiz Bulguları	45
3.7.1. pJETaroA(-)GFP Plazmidinin <i>S. Infantis</i> Saha Suşuna Transformasyonu	45
3.7.2. Rekombinant <i>S. Infantis</i> Suşunun Doğrulanması	46
3.7.2.1. PCR Analizi	46
3.7.2.2. Sekans Analizi	47
3.7.3. Rekombinant <i>S. Infantis</i> Suşunda Plazmid Eliminasyonuna Ait Bulgular	47
3.7.3.1. Plazmid Eliminasyonunun Doğrulanması	48
3.7.3.1.1. PCR Analizi	48
3.7.3.1.2. Sekans Analizi	48
3.7.4. Western Blot Bulguları	48
3.7.5. Fenotipik Bulgular	49
3.7.5.1. Biyokimyasal Özellikleri ve Üreme Bulguları	49
3.7.5.2. Hareket Testi Bulguları	50
3.7.5.3. Antibiyotik Duyarlılık Test Bulguları	50
3.7.5.4. EDTA Duyarlılık Testi Bulguları	51
3.7.5.5. <i>İn vitro</i> Adezyon ve İnvazyon Test Bulguları	51
3.7.6. Genotipik Bulgular	51
4. TARTIŞMA	53
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	56
ÖZET	57
SUMMARY	58
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	64

ÖNSÖZ

Salmonella'lar kanatlı hayvanlarda önemli hastalık tablolarına neden olmaktadır. Etkenin zoonotik yayılması ve böylece insanlarda da hastalık oluşturması ise önemini arttırmaktadır. Türkiye'de paratifoid *Salmonella*'lar içinde *Salmonella* Infantis'in oranı diğer *Salmonella* serotiplerine göre artış göstermektedir. Kanatlı *Salmonella* infeksiyonlarının, broyler ve yumurta üretim aşamalarında, dolayısıyla zoonotik yayılmada kontrolün sağlanması gerektiği bu artış ile daha çok önem kazanmıştır. Kanatlı *Salmonella* infeksiyonlarının kontrolü amacı ile kullanılan biyogüvenlik uygulamaları, besleme, bakım programları yanında uygulanan yöntemlerden birisi de aşılama değildir. Kullanılan bazı konvansiyonel *Salmonella* aşılarda ekolojik ve etiyolojik özellikleri nedeni ile sorunlar yaşanmaktadır. Bu nedenle biyoteknolojik aşılarda geliştirilmesi ve kullanılması gündeme gelmiştir. Okzotrofik mutantların özellikle *Salmonella* serotiplerinde virülensi azalttığı 1980'lerden beri bilinmektedir. Birçok Gram negatif bakteride de aromatik aminoasit sentezinden sorumlu genlerde mutasyon oluşturularak, hayvanlarda oluşan infeksiyonlara karşı başarılı potansiyel canlı aşı uygulamaları bildirilmektedir. Bu çalışma kapsamında, Türkiye'de en çok izole edilen *Salmonella* Infantis suşlarına karşı aşı geliştirilebilmesine yönelik okzotrofik mutant *Salmonella* Infantis suşu oluşturulması amaçlanmıştır.

Tez çalışmam konusunda yardım ve ilgilerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Hakan YARDIMCI başta olmak üzere Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve öğretim üyelerine, tüm çalışma sürecimin her aşamasında bilgilerini, tecrübelerini ve değerli zamanını esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a, Viroloji Anabilim Dalı doktora yapan arkadaşlarım Touraj Aligholipour FARZANİ ve Ali Reza HANİFEHNEZHAD'a, bu süreçte desteklerini hep yanımda hissettiren ve en büyük şansım olan aileme çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Caco- 2	Human epithelial colorectal adenocarcinoma
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFU	Colony Forming Unit
cm	Santimetre
DAHPS	3-deoksi-D-arabinoheptulosanat 7-fosfat sentaz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EFSA	European Food Safety Authority
EPSPS	5-enolpiruvilşikimat 3-fosfat sentaz
EUCAST	European Comittee on Antimicrobial Susceptibility Test
g	Gram
GFP	Green Fluorescent Protein
Kb	Kilobaz
LB	Luria Bertani
M	Molar
MHC	Major Histocompatiblity Complex
MIK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
OD	Optik Dansite
PABA	Paraaminobenzoik Asit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEP	Fosfoenolpiruvat
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis
pH	Power of Hydrogen
Rpm	Rounds Per Minute

rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SP-I	Salmonella Patojenite Adası- I
SOC	Super Optimised Broth + Glukoz
°C	Santigrat derece
TBE	Tris Borat Edta
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline Tween 20
TE	Tris Edta
TSI	Triple Sugar Iron
UV	Ultraviyole
XLD	Xylose Lysine Deoxycolate

ŞEKİLLER

- Şekil 1.1.** Aromatik aminoasit biyosentez yolağı. 11
- Şekil 2.1.** Protein kalibrasyon eğrisi. 33
- Şekil 3.1.** *aroA* genine spesifik dizayn edilen primerler ile elde edilen iki suşa ait gradient PCR sonucu jel elektroforez görüntüsü (M: 1kb DNA Ladder; N: Negatif kontrol, A:50°C; B:51°C; C:52,3°C; D:54°C; E:56,1°C; F:58,6°C; G:60,8°C; H:62,4°C; I:63,9°C; J:64,6°C; K:65°C). 42
- Şekil 3.2.** Rastgele seçilen 19 adet bakteri kolonisine, *aroA* genine spesifik dizayn edilen primerler ile uygulanan PCR sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü (M:1 kb DNA Ladder; 1-19: örnek numaraları). 42
- Şekil 3.3.** pJETaroA vektörünün Sall restriksiyon enzimi ile kesimi sonrası jel görüntüsü (M: 1kb DNA Ladder). 43
- Şekil 3.4.** pGFPuv vektörünün transformasyonu sonucu UV ışık altında görüntüsü. 44
- Şekil 3.5.** pGFPuv vektörünün EcoRI ve PvuII restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrası jel görüntüsü (M: 1 kb DNA Ladder). 44
- Şekil 3.6.** pJETaroA(-)GFP vektörünün transformasyon sonucu UV ışık altında görüntüsü. 45
- Şekil 3.7.** pJETaroA(-)GFP vektörünün NotI restriksiyon enzimi ile kesimi sonrası jel görüntüsü (M: 1 kb DNA Ladder). 46
- Şekil 3.8.** pJETaroA(-)GFP vektörünün *S. Infantis* suşuna transformasyonu sonucu UV ışık altında görüntüsü. 46
- Şekil 3.9.** Rekombinant *S. Infantis* suşuna ait spesifik dizayn edilen primerler ile yapılan PCR sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü (M: 1kb DNA Ladder). 47
- Şekil 3.10.** Plazmid eliminasyonu yapılan suşa spesifik olarak dizayn edilen primerler ile yapılan PCR sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü (M: 1kb DNA Ladder; N: Negatif kontrol). 48
- Şekil 3.11.** Suşlara ait 37°C'de üreme eğrisi grafiğı. 49
- Şekil 3.12.** Suşlara ait 56°C'de üreme eğrisi grafiğı. 50
- Şekil 3.13.** PFGE Jel Elektroforezi görüntüsü (M: marker; Wild: *S. Infantis* saha suşu, 1: Plazmid eliminasyonu yapılmayan rekombinant *S. Infantis* suşu, 1M: Plazmid eliminasyonu yapılmış *S. Infantis* suşu; SE: *S. Enteritidis*; ST: *S. Typhimurium*). 52
- Şekil 3.14.** Dendogram analizi görüntüsü (M: marker; WT: *S. Infantis* saha suşu, P: Plazmid eliminasyonu yapılmayan rekombinant *S. Infantis* suşu, PC: Plazmid eliminasyonu yapılmış *S. Infantis* suşu; SE: *S. Enteritidis*; ST: *S. Typhimurium*). 52

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Rekombinant *S. Infantis* suşu ve *S. Infantis* saha suşunun antibiyotik disk difüzyon testi sonuçları. (NA; nalidiksikasıit, TE; tetrasiklin, AMP; ampisilin, W; trimetoprim, CTX; sefotaksim, C; kloramfenikol, RL; sulfametoksazol, CN; gentamisin, S; streptomisin, CIP; siprofloksasin).

50



1. GİRİŞ

Salmonella cinsi Enterobacteriaceae familyasının bir üyesi olup, Gram negatif, fakültatif anaerob ve sporsuz bakterileri içerir. Sadece iki türden oluşmaktadır; *Salmonella bongori* ve *Salmonella enterica*. *Salmonella enterica* altı alt türe ayrılmaktadır; *Salmonella enterica*, *Salmonella salamae*, *Salmonella arizonae*, *Salmonella diarizonae*, *Salmonella houtenae* ve *Salmonella indica*. *Salmonella*'lar somatik O, flagellar H ve Vi kapsül antijenine göre 2600'den fazla serotipe ayrılmaktadırlar (Guibourdenche ve ark., 2010).

Salmonella serotipleri, tüm dünyada hem insanları hem de hayvanları infekte ederek zoonotik hastalıklara neden olan fakültatif hücre içi bakterilerdir. (Ruby ve ark., 2012). Hücre içi çoğalma, enteritis ve sistemik infeksiyonların başlıca unsuru olup, hayvanlarda hastalığın ilerlediği dönemde daha yaygın olarak görülmektedir. Bunun yanı sıra hücre içi çoğalma, insan ve hayvanlarda tipik tifoid benzeri hastalık oluşturan serotiplerin neden olduğu infeksiyonlarda da temel mekanizmadır (Kabir, 2010).

Salmonella'ların bağırsak kolonizasyonu ve dışkı yoluyla saçılımı, özellikle gıda amaçlı kullanılan hayvanlarla insan besin zincirine girerek gastroenteritislere sebep olmaktadır. *Salmonella* infeksiyonları, gastroenteritisten sistemik infeksiyonlara kadar geniş bir hastalık aralığına sahiptir. Bu sistemik infeksiyonlar genellikle konak-spesifik özelliktedir (Kabir, 2010 ve Ruby ve ark., 2012).

Salmonella serovarları gösterdikleri konak prevalansı ve klinik tabloya göre üç gruba ayrılmaktadır: i) Bazı serovarlar sağlıklı erişkin hayvanlarda ciddi sistemik hastalık oluşturabilme yeteneğindedir. Bulaşma genellikle fekal-oral yolla olmakta, bakteriyel çoğalma ise ilk olarak makrofaj monosit hücrelerinde gerçekleşmektedir. Hastalığın sadece ileri safhalarında bazı *Salmonella* serovarları sindirim sisteminde patoloji oluşturmakta ve bu yüzden hastalığın

gözlenmediği durumlarda, bağırsakta azda olsa kolonize olarak kalabilmektedir. Bu tarz infeksiyonlara, insanlar da tifoid ateş oluşturan *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* ve *S. Paratyphi B*'nin bazı suşları, kanatlılarda ve diğer kuşlarda *S. Gallinarum* ve domuzlarda ise *S. Choleraesuis* neden olmaktadır. ii) Diğer *Salmonella* serovarlarının, özellikle memelilerde gebelik ya da kanatlılarda yumurtlama zamanında infeksiyon odağı sıklıkla üreme sistemidir. Aynı zamanda çok genç hayvanlarda daha yoğun, sistemik çoğalma gösterebilir ve enteritise neden olabilirler. Sığırlarda *S. Dublin*, koyunlarda *S. Abortusovis*, atlarda *S. Abortusequi* ve kanatlılarda *S. Pullorum* bu serovarlar içerisinde yer almaktadır. iii) Geriye kalan serovarların büyük çoğunluğu normal ve sağlıklı erişkin hayvanlarda sistemik infeksiyon oluşturmazlar. Bunlar, ancak sindirim sistemine kolonize olabilir ya da akut enteritis veya subklinik infeksiyon oluşturabilirler (Barrow, 2010).

Salmonella enterica subspecies *enterica*, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Pullorum* (*Salmonella Pullorum*) ve *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Gallinarum* (*Salmonella Gallinarum*) kanatlılarda sırasıyla *Pullorum* hastalığı ve kanatlı tifosunun etkenleri olarak bilinmektedir. Bu iki serotip, kanatlılarda hepatosplenomegali, anemi ve nadiren intestinal hemorajilerle seyreden, yüksek mortalite gösteren sistemik infeksiyonlara neden olmaktadır. Kanatlı sektöründe ciddi kayıplara neden olan bu *Salmonella* infeksiyonları 1900'lü yıllardan beri büyük bir problem olarak görülmektedir. *Salmonella Enteritidis* ve *Salmonella Typhimurium* kanatlılarda en çok izole edilen etkenler arasında bilinmesine rağmen *Salmonella Heidelberg*, *Salmonella Kentucky* ve *Salmonella Infantis* serotipleri de sıklıkla görülmektedir. Bu serovarlar hem insan hem de hayvanlarda konağa bağlı olmadan çeşitli infeksiyonlar oluşturabilme yeteneğindedir (Barrow, 2010).

Tifoidal *Salmonella enterica* serotiplerinin (*S. Typhi*, *S. Paratyphi*) neden olduğu Salmonellozis infeksiyonu 4 ile 72 saat içinde diyare, ateş ve karın ağrısı (gastroenteritis sendromu) ile kendini gösterip mortaliteye neden olabilmektedir. Sağlıklı insanlarda infeksiyon dozu, ağızdan alındığında 10^6 ile 10^8 olmasına

rağmen daha düşük bakteriyel dozda yenidoğan ve yaşlılarda infeksiyon oluşmaktadır (Antunes ve ark., 2016). İnsanlarda, non-tifoidal *Salmonella* serotiplerinin oluşturduğu gastroenteritis infeksiyonları nedeniyle, tüm dünyada hastalık sayılarında beklenmedik artışların yaşanacağı bildirilmiştir (Majowicz ve ark., 2010). *Salmonella* kontrolü ile ilgili yürütülen ulusal kontrol programlarının etkilerini gösteren bir diğer çalışmada ise, 2016 yılında European Food Safety Authority (EFSA)'nin raporunda Avrupa'da, gıda kaynaklı bulaşmanın neden olduğu Salmonellozis vakalarının son sekiz yıllık periyotta ciddi şekilde azaldığı belirtilmiştir (EFSA, 2016)

İnsanlarda ve çeşitli gıda maddelerinde görülen *Salmonella* serotiplerinin prevalansı ile ilgili dünya çapında elde edilen veriler ile, insanlarda görülen Salmonellozis ve kanatlı ürünleri arasında epidemiyolojik bir bağlantı kurulmuş ve kanatlı et ürünleri (tavuk ve hindi eti) ile insanlar arasında çeşitli serotiplerin benzediği görülmüştür. Avrupa'da insanlarda infeksiyona neden olan *Salmonella* serotiplerinin sıklığı rapor edilmiş ve bazı vakalarda, kanatlılarda gözlenen serotiplerle uyum gözlenmiştir. Avrupa'da 2013 yılında raporlanan verilere göre, kanatlı eti (tavuk ve hindi) tüketimine bağlı olarak insanlarda infeksiyona neden olan *Salmonella* serotiplerinin oranında artış gözlenmiştir. Bu serotipler arasında; *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Stanley ve *Salmonella* Kentucky bulunmaktadır. 2011-2013 yılları arasında Avrupa'da özellikle broyler tavuklarında ve broyler tavuk etlerinde insanlarda infeksiyona neden olan *S. Infantis*'in oranı %26,5 artmıştır (Antunes ve ark., 2016).

EFSA'nın 2014 raporunda *S. Enteritidis*'in %45,7 ve *S. Typhimurium*'un ise %15,8 oranında olduğu bildirilmiştir. Bu oranın *S. Enteritidis*'de arttığı, *S. Typhimurium*'da ise azaldığı gözlenmiştir. Dördüncü en çok görülen serovar olarak bilinen *S. Infantis*'in oranı ise 2015 yılında da artmaya devam etmiştir. Gıda kaynaklı bulaşmada *Salmonella*'ların en sıklıkla broyler (%6,5) ve hindi etlerinde (%4,6), en az ise domuz eti (%1,7) ve sığır etinde (%0,2) bulunduğu, bununla birlikte sofralık yumurtada % 0.9, hazır gıdalarda broyler etinde %1.1 domuz etinde ise %0.7 olduğu hindi ve sığır etinde ise hiç olmadığı 2016

raporunda bildirilmiştir. Tavuklardan en çok izole edilen serovarlar; ilk sırada *S. Infantis* (%33,6) daha sonra *S. Enteritidis* (%15,8) ve son olarak da *S. Mbandaka* (%6,7) olarak bildirilmiş ve bu üç serovarin son dört yılda tavuklardan en sık izole edilen serovarlar olduğu raporlanmıştır. Broyley tavuklara bakıldığında, yine *S. Infantis*'in (%38,7) ilk sırada, *S. Enteritidis*'in (%11,6) ikinci ve *S. Mbandaka*'nın (%7,2) üçüncü sırada olduğu görülmüştür. Broyley tavuk etinde *S. Infantis* (%54,1) ve *S. Enteritidis* (%12,4) serovarlarının en çok izole edilen serovarlar olduğu da raporda bildirilmektedir (EFSA, 2016)

2001 yılından itibaren Avrupa'da ve özellikle Almanya'da konak bağımlı olmayan *S. Infantis*, *S. enterica* serotipleri arasında insanlarda en çok izole edilen on serotipin başında gelmektedir. 1970'lerden beri bu serotip Arjantin, Avusturalya, Brezilya, Hollanda, Finlandiya, Kanada, Macaristan, Japonya, Yeni Zelanda ve Rusya gibi dünya ülkelerinde artarak rapor edilmektedir. *S. Infantis*, öncelikle küçük çocuklar olmak üzere yetişkin bireyleri de etkileyerek kimi zaman septisemik semptomlara kimi zamanda ölümlle sonuçlanan infeksiyonlara neden olarak hastanelerden de izole edilmiştir. İnsanlardaki bu *S. Infantis* Salmonellozis'inin en önemli rezervuarı olarak hayvanlar ve özellikle kanatlılar bildirilmektedir (Miller, 2010).

Salmonella türleri hem insanlarda hem de hayvanlarda potansiyel patojen olarak kabul edilmesi nedeniyle Salmonellozis'in halk sağlığı açısından önemi büyüktür. Bu nedenle *Salmonella* türlerinin kontrolü için uluslararası, ulusal ve lokal *Salmonella* izleme programları uygulanmaktadır (Kabir, 2010).

Salmonella Enteritidis ve *S. Typhimurium* tavuklardan en çok izole edilen serotipler olarak kabul edilmesine rağmen diğer serotipler de sıklıkla izole edilmektedir (Foley ve ark., 2011 ve Wales ve Davies, 2011). Bu serovarlar konak bağımlı olmayan serovarlardır ve hem insanlarda hem de hayvanlarda infeksiyonlara neden olmaktadır. Çoğunlukla bu serovarlar, tavuklarda asemptomatik olsa da uzun yıllar dışkıyla taşınır, saçılabilir ve sistematik infeksiyonlara neden olabilir (Van Immerseel ve ark., 2005). İnsanlarda bu

serovarlar gastrointestinal hastalıklara neden olur ve kaynağı ya direkt olarak kanatlı hayvanlar veya kümes hayvanları ürünleridir (Feasey ve ark., 2012). Antibiyotik tedavisi ve bazen hospitalizasyon gerektiren *S. Enteritidis*/*S. Typhimurium* infeksiyonları şiddetli hale gelmektedir. Bunun yanı sıra, çoklu antibiyotik direnci gösteren *Salmonella* suşlarının ortaya çıkmasıyla insanlarda antibiyotik tedavisi de güçleşmektedir. Bu yüzden, kanatlı hayvanlarda konak bağımlı olmayan *Salmonella* türlerinin efektif kontrolünün yapılması ciddi bir gereksinimdir (Desin ve ark., 2013).

Kanatlı aşılama programları içerisinde *Salmonella* aşılı canlı attenüe aşılardan, inaktif ve subunit aşılardan olmak üzere üç kategoriye ayrılmaktadır (Kabir, 2010).

Yirminci yüzyılın başlarında Pasteur ve Koch'un deneysel attenüasyon metotları geliştirilene kadar, birçok canlı virüs ve bakteri aşısı *in vitro* hücre kültürlerinde tekrarlanan pasajlarla yapılmaktaydı. İnaktif aşılardan ise geçmişten günümüze kadar kimyasal veya fiziksel yöntemlerle elde edilmiş olan ve nitekim kanatlılarda efektif bir koruma sağlayamamaktadırlar (Gamazo, 2007). Subunit aşılardan ise çoğunlukla bakteri hücre yüzeyinde bulunan ve bakteri için karakteristik virülens antijenlerini tek veya çoklu olarak bulunduran aşılardır. Subunit aşılardan da genellikle zayıf immunojen olan ve uygun adjuvant ile iyi formülize edilmesi gereken aşılardır (Desin ve ark., 2013).

Günümüzde Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da yaygın olarak kullanılan efektif moleküler yöntemlerle elde edilen canlı attenüe aşılardan bulunmaktadır. Almanya'da ve birçok Avrupa ülkesinde canlı *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* aşılardan kullanılmaktadır. Canlı *S. Enteritidis* aşılardan 0:9 (D1) grubu *Salmonella* serotiplerine karşı, canlı *S. Typhimurium* aşılardan da 0:4 (B) grubu *Salmonella* serotiplerine karşı koruma sağladığı bilinmektedir (Miller, 2010).

1.1. Canlı Attenüe *Salmonella* Aşıları

Canlı attenüe *Salmonella* aşıları etkenin konakta yaşamasını sağlayan virülens genlerinin veya metabolizması için gerekli olan genlerin mutasyonu ve delesyonunun yapılması ile elde edilmektedir. Bu tip aşılardan en büyük dezavantajının uzun süreler boyunca hem çevrede hem de hayvanlarda kalıp, insan sağlığı için potansiyel bir tehdit oluşturması olduğu düşünülmektedir. (Tan ve ark., 1997). Diğer bir dezavantaj ise, virülensi tekrar kazanabilme ihtimalidir. Canlı attenüe aşılardan uzun süre ortamda kalmasının avantajı ise, bireysel aşılanmanın yapıldığı sürülerde horizontal transfer ile diğer hayvanların da immunizasyonun sağlanmasıdır (Chappell ve ark., 2009; Foley ve ark., 2011 ve Gast, 2007).

Salmonella canlı aşılarının birçoğu lisanslı ve ticari olarak bulunabilmektedir. Bu aşılardan arasında; Avrupa'da *S. Gallinarum* ve *S. Enteritidis*'e karşı kullanılan *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Gallinarum 9R suşu (lipopolisakkarit modifikasyonu), esansiyel metabolik enzimleri sentezleyen gen mutanlığı *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium ve *S. Enteritidis*'e karşı kullanılan adenin-histidin okzotrofik mutanlığı suşları sayılabilir (Desin ve ark., 2013).

Özellikle civcivlerde *Salmonella*'nın kolonizasyon ve inhibisyonunu azaltmaya yönelik hazırlanan canlı attenüe *Salmonella* aşılarının kullanımının avantajlı olduğu bildirilmektedir (Methner ve ark., 2011 ve Van Immerseel ve ark., 2005).

1.2. İnaktif Aşılardan

Ölü aşılardan tüm bakterinin sıcaklık, formalin, aseton veya diğer maddelerle muamele edilerek elde edilmesi işlemine dayanır. Çoğu ölü *Salmonella* aşısı, intramusküler veya subkutenöz olarak verilen ve en az iki defa immunizasyon

gerektiren aşılardır. Bu aşıların en büyük avantajlarından birisi, canlı olmaması ve bu yüzden çevrede uzun süre kalıp insan sağlığı açısından risk taşımasıdır. Ancak, canlı aşıların aksine konak tarafından kısa sürede ortadan kaldırılabilirler ve sınırlı sayıda antijen eksprese edebilirler (Barrow, 2007 ve Gast, 2007).

Demir kısıtlaması ile oluşturulan *S. Enteritidis* inaktif aşısı, İngiltere, Avrupa ve dünyanın birçok yerinde kullanılmaktadır (Desin ve ark., 2013).

1.3. Subunit Aşılar

Subunit aşılar tek bir antijen veya çoklu antijen (özellikle protein) içeren aşılardır. Bu antijenler çoğunlukla bakterinin yüzeyinde bulunan ve önemli virülens özelliklerine sahiptirler. Başka türlü hazırlanmadıkça genel olarak subunit aşılar intramusküler veya deri altı yolla kullanılırlar. Subunit aşılar genellikle zayıf immunojenik ve uygun adjuvantlar ile formülasyon gerektirirler (Barrow, 2007 ve Mutwiri ve ark., 2011).

Salmonella fliC proteini, *Salmonella* tip 1 fimbria, subunit aşılar da kullanılan önemli yüzey antijenleridir (Toyota-Hanatani ve ark., 2009).

Tüm bu aşılar arasında bir sınıf aşının diğerinden daha iyi olduğunu söylemenin mümkün olmadığı düşünülmektedir. İngiltere’de yapılan bir çalışmada dörtlü aşı (üç canlı aşı ve bir inaktif aşı) geliştirilmiş ve *S. Enteritidis*’e karşı yumurta tavuklarında koruma sağladığı gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlar ışığında, araştırmacılar *Salmonella* aşılarının güvenilirliği ve geliştirilmeye ihtiyacı olduğu sonucuna vararak ve bu gelişimin subunit aşılar ile olacağını vurgulamışlardır (Desin ve ark., 2013).

1.4. Gelecekte Aşı Teknolojisi

Kanatlı hayvan sağlığı ve refahı için güvenli, etkili aşılarla artan talep ile hayvan sağlığı şirketleri aşı geliştirmede alternatif teknolojilere yönelmişlerdir. Bu aşılar, bakteriyel veya viral vektörler kullanılarak DNA aktarımını hedefleyen ve kanatlı endüstrisinde yaygın olarak kullanılan aşılardır (Desin ve ark., 2013).

1.4.1. DNA Aşıları

DNA aşıları, aşı antijenini kodlayan bakteriyel plazmidi içeren ve ekspresyonu ökoryotik promotör tarafından yapılan aşılardır. Bu aşı teknolojisi, antijenik yapının korunması, MHC sınıf I ve II moleküllerine daha iyi antijen sunumu, birden çok aşı antijenini bir arada bulundurabilmesi, daha az yan etkiye sahip olması, yüksek sıcaklıklarda stabil kalabilmesi ve kullanım kolaylığı gibi birçok avantaja sahiptir. Öte yandan DNA aşıları, koruma kapasitesi bakımından sınırlı olup konak genomuna entegre olma konusunda risk taşımaktadır. DNA aşılarının kanatlı sektöründe kullanımı oldukça faydalıdır. Çünkü altı haftalık tavuklarda farklı patojenlere karşı 5-8 canlı aşı uygulaması yapılmakta ve bu sayı 18 haftalık yaşta 12'ye çıkmaktadır. Buna ek olarak, aşı kullanımının artması, patojen virülensinin artması ihtimalini düşündürerek endişeye neden olmaktadır. Sonuç olarak, DNA aşıları konvansiyonel kanatlı aşılarına olası çözümler sunmaktadır. 2014 yılına kadar DNA aşısı üzerine sadece bir adet çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, *Salmonella* SPI-1 efektör proteinini kodlayan *SopB*'nin *S. Typhimurium* suşlarına karşı koruyuculuğu test edilmiştir. Aşılanan farelerin karaciğer ve dalaklarında *S. Typhimurium* oranının azaldığı belirlenmiştir. Bu çalışma daha ileri çalışmalar için umut verici olmuştur (Haygreen ve ark., 2005; Nagarajan ve ark., 2009 ve Saade ve Petrovsky, 2012).

1.4.2. Vektör Aşılar

Attenüe *Salmonella* aşıları, yirmi yıldan fazla bir süredir aşı platformunda kullanılmaktadır (Doggett ve Curtiss, 1992). Bu vektörler genellikle aşı antijenlerini plazmid üzerinde veya daha sıklıkla bakteriyel kromozomda bulundurmaktadırlar. Ayrıca, kolayca manüple edilebilir olması, uzun süreli hücresel veya humoral immun yanıt oluşumunu sağlaması, ucuz olması, oda ısısında saklanabilir olması ve enjektöre ihtiyaç duymadan kolay sistemlerle uygulanabilir olması bakımından birçok avantaja sahiptir (Hegazy ve Hensel, 2012 ve Kwon ve ark., 2007).

Salmonella aşıları kanatlı endüstrisinde, hastalıklara karşı korumada özellikle sadece antijene karşı değil *Salmonella* suşuna karşı da koruma sağlaması bakımından önem arz etmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar bulunduğu gibi 1990'ların ortalarından beri *Salmonella* suşlarına karşı kullanılan rekombinant adenovirüs aşıları da potansiyel aşı adayı olarak çalışılmaktadır (Desin ve ark., 2013).

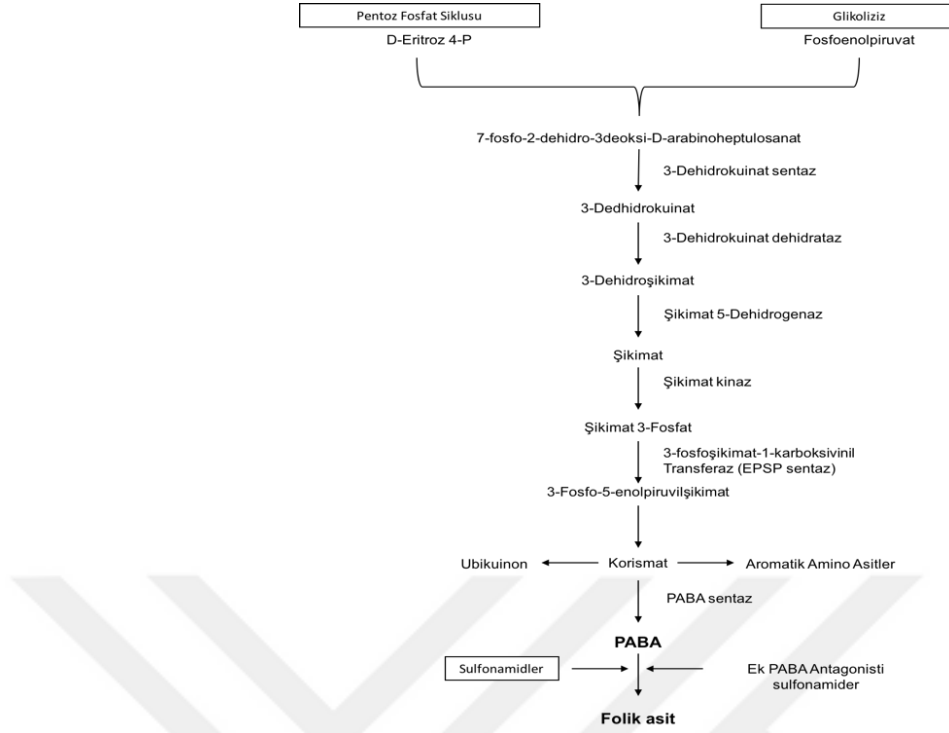
1.4.3. Okzotrofik Mutant Aşılar (Aromatik Aminoasit Mutantları)

1980'lerin başından beri aromatik aminoasitlerden yoksun okzotrofik *Salmonella* mutantlarının virülensinin hayvanlar için düşük olduğu bilinmektedir (Hoiseh ve Stocker, 1981). O zamandan beri farklı *Salmonella* serotiplerinde aromatik aminoasitlerin biyosentezinden sorumlu genlerdeki mutasyonlar virülensi azaltmak için kullanılmaktadır. *Salmonella enterica* serovar Typhi'nin *aroA* ve *aroD* mutantlarının insanlarda tifoya karşı aşı olarak başarılı olduğu belirlenmiştir (Tacket ve ark., 1997 ve Tacket ve ark., 2000). Benzer mutasyonlar farklı çiftlik hayvanlarının immunizasyonu için avirulent suşların oluşturulmasında kullanılmıştır (Cooper ve ark., 1994b; Everest ve ark., 1999 ve Robertsson ve ark., 1983). *Aro* mutantlarının, oldukça duyarlı olduğu bilinen gnotobiyotik farelerde bile avirulent olduğu görülmüştür. *Aro*

mutantlarında görülen virülens azalması temel olarak fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik aminoasitler ile aromatik metabolitlerin üretilmemesi şeklinde açıklanmaktadır. Konak içinde aminoasitler kolaylıkla sağlanamadığından *aro* mutantlarının hücre içerisinde replike olamamaları da beklenen bir sonuçtur. Ayrıca, yapılan çalışmalarda *aro* mutantlarının bakterilerde motiliteyi bozduğu da görülmüştür. Bununla birlikte gnotobiyotik farelerde *aroA* mutantlarının, immun yanıtı uyarmadığı gibi sitokin üretimini de uyarmadığı görülmüştür. Bu bulgularla birlikte *aro* mutantlarının sadece konak içinde replikasyonu değil, aynı zamanda sitoplazmik veya dış membran veya periplazmik membran fonksiyonlarını da bozduğu sonucuna varılmıştır (Bar-Tana ve ark., 1980 ve Sebkova ve ark., 2008). Son yıllarda yapılan bir çalışmada şikimat yolağına müdahale edilen *Salmonella* suşlarının sadece okzotrofik olmadığı aynı zamanda albümin ve EDTA'ya karşı duyarlılığının arttığı da gösterilmiştir (Felgner ve ark., 2016).

Şikimik asit, ilk defa 1885 yılında anasonlu meyvelerden (*Illicium anisatum*) elde edilmiş olup, şikimat yolağı adını *shikimi-no-ki* isimli bir Japon bitkisinden almıştır. Şikimat yolağı, korismat biyosentez yolağı olarak da bilinmektedir. Bu yolağın enzimatik aktivitesi sonucu iki metabolit oluşur; glikolizis yolağının fosfoenolpiruvatı (PEP) ve korismat içinde pentoz fosfat yolağının eritroz 4-fosfatı. Bu şikimat yolağı ve aromatik aminoasit biyosentezi, bitkiler, mikroorganizmalar ve mantarlar için oldukça önemlidir fakat memelilerde bulunmamaktadır (Priyat ve ark., 2010).

AroA geni aromatik aminoasit biosentez yolağının ilk basamağında bulunan gen olup paraaminobenzoik asit (PABA) sentezi için gereklidir ve şikimat yolağının (Şekil 1.1) aromatik aminoasit sentezi için gerekli olan glikolizis ile direkt bağlantılı olan bir parçasıdır (Felgner ve ark., 2016 ve Sebkova ve ark., 2008).



Şekil 1.1. Aromatik aminoasit biyosentez yolağı.

Şikimat yolağının yedi basamaklı enzimatik aktivitesinde en çok çalışılan iki enzim 3-deoksi-D-arabinoheptulosanat 7-fosfat sentaz (DAHPS) ve 5-enol piruvilşikimat 3- fosfat sentaz (EPSPS) dir (Hu ve ark., 2003).

Bakterilerde, aromatik aminoasit sentezi ortak şekilde başlar. Bu biyokimyasal yolda yedi adet enzimatik reaksiyondan 5-enolpiruvilşikimat 3-fosfataz sentezinden sorumlu gen olan *aroA*'nın mutasyona uğratılması ile pre-korismat yolağının bozulması birçok attenüasyon çalışmasında ortak bir strateji olarak kullanılmaktadır (McArthur ve ark., 2003).

Günümüzde *aroA* proteinleri Sınıf 1 ve Sınıf 2 enzimleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Sınıf 1 enzimler bütün bitkilerde ve çok düşük düzeylerde glikofosata duyarlı *Escherichia coli* ile *S. Typhimurium*'da bulunmaktadır. Sınıf 2 enzimler ise yüksek konsantrasyonda bile glikofosata tolere edebilen *Pseudomonas* sp. PG2982, *Agrobacterium tumefaciens* CP4, *Streptococcus*

pneumoniae ve *Staphylococcus aureus* türlerinde bulunmaktadır. Glikofosat PEP analogudur ve EPSPS aktivasyonunu inhibe eder (Liu ve Cao, 2015).

Birçok Gram negatif bakteride, özellikle *Salmonella* sp., *Bordetella pertusis*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* gibi solunum sistemi patojenlerinin aromatik aminoasit sentezinden sorumlu *aroA* geni mutasyonu son otuz yıldır hayvanlara karşı başarı ile sonuçlanmış potansiyel canlı aşı adayı olarak bildirilmektedir (Garside ve ark., 2002).

Bu tez çalışmasında, Türkiye’de en çok izole edilen *S. Infantis* suşlarına karşı aşı geliştirilebilmesine yönelik, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*’a karşı daha önce kullanılmış olan *aroA* gen mutasyonunun, kanatlılardan en sık izole edilen *S. Infantis*’te oluşturulması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Suşlar

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda yer alan, daha önce kümes altlık ve tozundan Anabilim Dalı'nda izole edilmiş olan, rRNA operonunun (5S, 16S, 23S) spesifik restriksiyon enzimiyle (PvuII) kesilmesi sonucu ortaya çıkan bant profillerinin (ribopatern) analizine dayanan ribotiplendirme metodu ile identifiye edilmiş ve bu ribotiplendirme kütüphanesinde en çok ribopatemi olan *S. Infantis* suşu kullanıldı.

Oluşturulan mutant suşun fenotipik ve genotipik özelliklerinin karşılaştırılmasında, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda yer alan *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* suşları kullanıldı.

Transformasyon için, ticari olarak tedarik edilmiş One Shot TOP10 Chemically Competent *Escherichia coli* (Invitrogen) hücresi kullanıldı.

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri

Luria Bertani Agar/Broth (MILLER)

Bileşim

Pepton	5 g
Kazein pepton	5 g

Sodyum klorid	10 g
Agar	12 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

- 37 g LB agar 1 litre suda çözdürüldü.
- 121°C’de 15 dakika otoklavlandı.
- 45-50°C’ye soğutulduktan sonra 5-10 ml olacak şekilde 60 mm x 15 mm büyüklüğünde petri kaplarına dağıtıldı.
- Antibiyotikli besiyeri için; 100 mg/ml hazırlanmış stok antibiyotikten 100 µg/ml kullanıldı.

Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD Agar)

Bileşim

Maya ekstraktı	3 g
Sodyum klorür (NaCl)	5 g
Ksiloz	3,75 g
Laktoz	7,5 g
Sukroz	7,5 g
L-lizin hidroklorid	5 g
Sodyum tiyosülfat	6,8 g
Demir (III) amonyum asetat	0,8 g
Fenol kırmızısı	0,08 g
Sodyum deoksikolat	1 g
Agar	9,18 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

- Agar eriyene kadar kaynar su banyosunda bekletildi.
- Sterilizasyon işlemi kaynar su banyosunda otoklavlanmadan gerçekleştirildi.
- 5-10 ml olacak şekilde 60 mm x 15 mm büyüklüğünde petri kaplarına dağıtıldı.

MacConkey Agar

Bileşim

Pepton	20 g
Laktoz	10 g
Safra tuzu	5 g
Sodyum klorid	5 g
Nötr Kırmızı	0,075 g
Agar	12 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

- Agar 1 litre su içinde eritilerek homojenize hale getirildi.
- 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.
- 45-50°C'ye soğutulduktan sonra 5-10 ml olacak şekilde 60 mm x 15 mm büyüklüğünde petri kaplarına dağıtıldı.

Nutrient Agar

Bileşim

Et ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
Agar	9-18 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

- Agar 1 litre su içinde eritilerek homojenize hale getirildi.
- 121°C’de 15 dakika otoklavlandı.
- 45-50°C’ye soğutulduktan sonra 5-10 ml olacak şekilde 60 mm x 15 mm büyüklüğünde petri kaplarına dağıtıldı.

Mueller-Hinton Agar

Bileşim

Et ekstraktı	300 g
Kazein hidrolizati	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Agar	17 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

- Agar 1 litre su içinde çözdürüldü.
- 121°C’de 15 dakika otoklavlandı.

- 45-50°C'ye soğutulduktan sonra 5-10 ml olacak şekilde 60 mm x 15 mm büyüklüğünde petri kaplarına dağıtıldı.

Motility Test Medium

Bileşim

Triptoz	10 g
Sodyum klorid	5 g
Agar	5 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

- Agar 1 litre su içinde çözdürüldü.
- 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.
- 45-50°C'ye soğutulduktan sonra 5-10 ml olacak şekilde vida kapaklı tüplere dağıtıldı.

2.1.3. Biyokimyasal Testlerde Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Triple Sugar/Iron Agar /TSI Agar)

Bileşim

Et ekstraktı	3 g
Maya ekstraktı	3 g
Pepton	20 g
Sodyum klorür (NaCl)	5 g
Laktoz	10 g

Sukroz	10 g
Glukoz	1 g
Demir (III) sitrat	0,3 g
Sodyum tiyosülfat	0,3 g
Fenol kırmızısı	0,024 g
Agar	9,18 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

- Agar tüplere 10 ml olacak şekilde dağıtılıp 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.
- Tüpler, dibindeki agar 2-2,5 cm olacak şekilde yatık pozisyonda donduruldu.

Üre Agar (Christensen)

Bileşim

Pepton	1 g
Glukoz	1 g
Sodyum klorür (NaCl)	5 g
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	2 g
Fenol kırmızısı	0,012 g
Agar	9-18 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

- Agar 1 litre su içinde çözdürüldü.
- 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

İndol Test Ayıracı

Kovaks

4-Dimetilaminobenzaldehid	5 g
Hidroklorik asit	25 ml
2-Metilbütan-2-ol	75 ml

2.1.4. Moleküler Analizlerde Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Solüsyonlar

PCR Cihazı: ARKTIK Thermal Cycler (Thermo Scientific) ve Thermocycler (Biometra) cihazları kullanıldı.

Spektrofotometre: NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) cihazı kullanıldı.

Jel Elektroforez Görüntüleme Ünitesi: G:BOX (Syngene) kullanıldı.

Sekans Cihazı: Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer cihazı kullanıldı.

Dikey Elektroforez Ünitesi: Mini-PROTEAN Tetra Handcast Systems (Bio-Rad) kullanıldı.

Protein Blotting Sistemi: Trans-Blot Turbo Transfer Systems (Bio-Rad) kullanıldı.

Pulsed Field Jel Elektroforezi: CHEF-DR III Variable Angle System (Bio-Rad) kullanıldı.

Santrifüj: MICROCL 21 (Thermo Scientific) kullanıldı.

10x TBE (Tris-borate-EDTA): 1 litre hazır TBE (Thermo Scientific) kullanıldı.

Ethidium Bromide Boya Solüsyonu: 10 mg/ml stok solüsyonu 100 ml distile su içinde 1 g Ethidium Bromide ilave edilerek hazırlandı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Kullanılacak Suşun Hazırlanması

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda yer alan daha önce kümes altlık ve tozundan izole edilmiş olan ve ribotiplendirme kütüphanesinde en çok ribopatemi olan toplam 15 *S. Infantis* suşu seçildi ve kültüre edildi.

2.2.2. Bakteriyel Genom İzolasyonu

Kültüre edilmiş olan *S. Infantis* suşlarından bir ve/veya iki koloni (koloni büyüklüğüne göre) olacak şekilde, 200 µl nükleaz-free buffer bulunan ependorf tüplerinde toplandı. DNA ekstraksiyonu için ependorf tüpüne toplanan örnekler 5000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. GeneJet Genomic DNA Purification kit (Thermo Scientific) ile üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde DNA ekstraksiyonu yapıldı.

DNA ekstraksiyon aşamaları aşağıdaki gibidir;

- 180 µl Digestion solusyonu içinde peletler süspanse edildi. Üzerine 20 µl Proteinase K enzimi eklenip, vortekslendi.
- 56°C'de peletler eriyene kadar (yaklaşık 30 dakika) inkübe edildi.
- İnkubasyon sonrası 20 µl RNase A enzimi eklenip, vortekslendi ve 10 dakika oda ısısında bekletildi.
- Üzerine 200 µl Lysis solusyonu eklenip 15 saniye homejen görüntü elde edilene kadar vortekslendi.
- 400 µl %50 etanol eklenip vortekslendi.
- Lizat GeneJET Genomic DNA Purification Column tüplerine aktarıldı. 6000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.

- Santrifüj sonrası toplama tüpleri boşaltılıp column tüpleri üzerine 500 µl Wash Buffer I eklenip 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Tekrar toplama tüpleri boşaltılıp column tüpleri üzerine 500 µl Wash Buffer II eklenip maksimum (12000 x g) hızda 3 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpleri atılıp yerine 1,6 ml eppendorflar yerleştirilip column tüpleri üzerine 50 µl Elution Buffer eklenip 2 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası eppendorflarda DNA ekstraktı toplandı.

Elde edilen ekstraktlardaki DNA miktarı spektrofotometre (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) ile ölçüldü. DNA miktarı ve 260/280 oranı en uygun olan iki örnek seçildi.

2.2.3. Hedef Genom Bölgesinin Belirlenmesi ve PCR ile Çoğaltılması

Olasz ve ark. (2015)'nin yayınladığı Macaristan ve İngiltere'de sağlıklı broyler tavuklardan izole edilen üç adet *S. Infantis* suşunun genom sekansı çalışmasına ait Gen Bankası (NCBI, GenBank) arşivine giren *S. Infantis* suşunun genom dizisinden (GenBank Acc. Number: LN649235.1) yararlanılarak, delesyonu yapılacak olan *aroA* gen bölgesinin yaklaşık 200'er nükleotid up-stream ve down-stream flanking sekanslarını da içerecek şekilde sekans dizisi belirlendi. Belirlenen diziye göre bilgisayar programı ile (CLC Main WorkBench, Danimarka) *aroA*-F/0384 5'-TCT TTC CGG TCT GGT GTT-3' *aroA*-R/2451 5'-GAC GTT TGG TGT ATT TGC TT-3' primerleri yaklaşık 2000 bp'lik kısmı çoğaltacak şekilde tasarlandı. Tasarlanan bu primerler ile Phusion High-Fidelity DNA Polimerase (Thermo Scientific) kullanılarak PCR analizi gerçekleştirildi. Uygulanan PCR reaksiyon karışımı ve amplifikasyon koşulları aşağıdaki gibidir.

Reaksiyon karışımı;

5x Phusion HF Buffer	10 µl
10 mM dNTPs	1 µl
Forward primer, 10 pmol	0,5 µl
Reverse primer, 10 pmol	0,5 µl
DMSO	1,5 µl
Phusion DNA Polimeraz	0,5 µl
H ₂ O	34 µl
Template DNA	2 µl

olacak şekilde ve toplam 50 µl'lik hacimde hazırlandı.

Amplifikasyon koşulları:

98°C	2 dakika	
98°C	10 saniye	
50-65°C	20 saniye	40 siklus
72°C	45 saniye	
72°C	7 dakika	

Primerlerin Ta (bağlanma sıcaklığı) derecesinin optimal koşullarının belirlenmesi amacıyla gradient PCR uygulandı. Uzama süresi beklenen PCR ürününün büyüklüğüne (baz çifti uzunluğu) göre ayarlandı.

2.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme

Amplifikasyon sonrası ürünlerin değerlendirilmesi amacıyla %1'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla 200 ml 0,5 TBE ve 2 g agaroz mikrodalga fırında eritildikten sonra, 8 µl ethidium bromide ilave edildi. 20 cm'lik yatay jel elektroforezi tablasına dökülüp dondurulduktan sonra örnekler agaroz jele yüklendi. 180 voltta 60 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu. İşlem sonrası

jel UV transillüminatör görüntüleme sistemine yerleştirilerek görüntülendi (Sambrook ve Russell, 2001).

2.2.5. PCR Ürününün Pürifikasyonu

Görüntüleme işlemi sonrası örneklerin istenen yerde bant göstermesiyle çalışmaya tek örnekle devam edildi. Elde edilen PCR ürünü QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) ile kitin önerdiği koşullar doğrultusunda pürifiye edildi. Uygulanan aşamalar aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

- 1:5 oranında Buffer PB PCR ürünü üzerine eklenip vortekslendi.
- Karışım QIAquick column tüplerine aktarıldı. 17900 x g'de 30-60 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpünde biriken sıvı boşaltıldı.
- 0,75 ml Buffer PE ile yıkanıp, 30-60 saniye 17900 x g'de santrifüjlendi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpü değiştirilip tekrar 17900 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası QIAquick columnları yeni 1,5 ml ependorflara alındı.
- Üzerine 30 µl Buffer EB eklenip 1 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 17900 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Pürifikasyonu yapılan PCR ürünleri santrifüj sonrası 1,5 ml ependorfta toplandı.

2.2.6. PCR Ürününün Taşıyıcı Plazmid (Shuttle Plazmid) Klonlanması

Pürifiye edilen PCR ürünü CloneJet PCR Cloning kit (Thermo Scientific) ile aşağıda belirtilen kitin önerdiği koşullar doğrultusunda pJET1.2/blunt klonlama vektörü içine yerleştirildi.

Klonlama Protokolü;

2x Reaksiyon Buffer	10 µl
pJET 1.2/blunt Cloning Vector	1 µl
Pürifiye PCR ürünü	1 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
H ₂ O	7 µl

olarak 20 µl reaksiyon karışımı hazırlanıp 3-5 saniye vortekslendikten sonra 22°C’de 5 dakika bekletildi.

Klonlama işleminin confirmasyonu amacıyla *aroA* geni yerleştirilmiş pJET1.2/blunt vektörü kompetan hücreye transforme edildi. Transformasyon için ticari olarak tedarik edilmiş One Shot TOP10 Chemically Competent *Escherichia coli* (Invitrogen) hücresi kullanıldı.

Transformasyon işlemi Sambrook ve Russell (2001)’in yöntemine göre; 50 ng vektör 50 µl hücre içine aktarılıp 30 dakika buzda bekletildi. Buzdan çıkarılan örnekler 42°C sıcak su banyosunda 90 saniye bekletildikten sonra tekrar buza alınıp 1-2 dakika soğutuldu. Soğutma işleminden sonra üzerine 800 µl SOC medium eklenip 37°C’de 45 dakika 225 rpm’de çalkalanarak bekletildi. Daha sonra uygun antibiyotik eklenmiş LB medium hazırlanmış petrilere 50-100 ve 150 µl olacak şekilde bütün örnek yayma ekim yapılarak ekildi. 37°C’de 1 gece inkubasyona bırakıldı.

İnkubasyon sonrası üremelerden rastgele 19 adet koloni confirmasyon için seçilerek koloni PCR’ına tabi tutuldu. PCR işlemi için reaksiyon karışımı Phusion High-Fidelity DNA Polimerase (Thermo Scientific) kullanılarak daha önce bu enzimle uygulanan reaksiyon karışımı ile aynı şekilde 20 µl’lik hacimde hazırlandı.

Amplifikasyon koşulları:

98°C	10 dakika	
98°C	10 saniye	
65°C	30 saniye	40 siklus
72°C	90 saniye	
72°C	7 dakika	

PCR analizi yapılan her bir koloni, antibiyotik eklenmiş LB broth besiyerlerinde saklandı.

Koloni PCR sonucu ürünler, jel elektroforezine tabi tutularak UV ışık altında incelendi. Beklenen yerde bant gösteren örnekler klonlamann gerçekleştiği pozitif örnekler olarak kabul edilip, saklandıkları LB broth besiyerinde 37°C’de bir gece üretildikten sonra -80°C’de saklandı. Bu işlemden sonra pozitif örnekler pJETaroA olarak isimlendirildi.

2.2.7. pJETaroA Vektöründen *aroA* Gen Bölgesinin Kesilmesi ve Elde Edilmesi

AroA geni yerleştirilmiş ve konfirmasyonu yapılmış pJETaroA vektöründen 5’-...G/TCGAC...-3’ bölgesinden Sall restriksiyon enzimi ile *aroA* gen bölgesinin bir kısmı kesildi. Kesim işlemi sonrasında ürün %0,8’lik jelde yürütüldü. Elektroforez sonucu *aroA* genini çevreleyen (up-stream ve down-stream flanking) sekansları içeren yaklaşık 4000 bp büyüklüğünde ana iskelet (büyük parça) jelden QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) ile kitin önerdiği şekilde uygulanarak ekstrakte edildi. Jel ekstraksiyon aşamaları aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

- Ekstraksiyonu yapılacak olan kısım jelden bir bisturi yardımıyla kesildi.

- Kesilen jel hassas tartıda tartılıp 1:3 oranında üzerine Buffer QG eklendi.
- 50°C’de 10 dakika jel tamamen eriyene kadar 2-3 dakikada bir vortekslenerek inkübe edildi.
- Jel tamamen eridikten sonra QIAquick 2 ml toplama tüplerine aktarıldı.
- 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri boşaltıldıktan sonra 0,5 ml Buffer QG eklenip 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
- Yıkama işlemi column tüplere 0,75 ml Buffer PE eklenip 1 dakika 13000 rpm’de santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri atılıp yerine 1,5 ml eppendorf yerleştirildi ve column tüpleri üzerine 30 µl Buffer EB eklendi. 1 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 1 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
- Santrifüj işlemi sonrası jel ekstraktı eppendorfta toplandı.

2.2.8. Elde Edilen *aroA* Gen Bölgesi Ürününün Blunt-end Haline Dönüştürülmesi

Jel ekstraksiyonu sonucu elde edilen *aroA* genini çevreleyen büyük parça bir sonraki ligasyon aşamasında kullanılmak üzere T4 DNA Polymerase (Thermo Scientific) ile blunt-end haline dönüştürüldü.

Blunt-end Reaksiyonu;

5x Reaksiyon Buffer	4 µl
pJETaroA Vektörü	10 µl
2mM DNTPs	1 µl
T4 DNA Polymerase	0,2 µl
H ₂ O	4,8 µl

olarak 20 µl hacimde hazırlanıp vortekslendikten sonra oda ısısında 5 dakika, 75°C’de 10 dakika bekletildi. Elde edilen yeni plazmid pJETaroA(-) olarak isimlendirildi.

2.2.9. GFP (Green Fluorescent Protein) Geni Elde Edilmesi ve Çoğaltılması

Bu amaçla ticari olarak temin edilen pGFPuv vector (Clontech, ABD) kullanıldı. pGFPuv plazmidi kompetan hücreye daha önce yukarıda belirtildiği şekilde transforme edilerek LB broth besiyerinde 50 ml hacimde üretildi. Hazırlanan kültürden istenilen miktarda çoğaltılmış plazmid saf olarak elde edildikten sonra GFP kaseti EcorI (G/AATTC) ve PvuII (CAG/CTG) restriksiyon enzimleri ile kesilerek plazmid gövdesinden ayrıldı. Kesim işlemi sonrasında karışım %0,8’lik jelde yürütüldü. Elektroforez sonucu jelden, GFP geninin yaklaşık 950 bp klonlanacak bölümü QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) kullanılarak elde edildi.

2.2.10. pJETaroA(-) Vektörü İçine GFP Gen Bölgesinin Yerleştirilmesi

pJETaroA(-) vektörü içine elde edilen GFP geni T4 DNA Ligaz (Thermo Scientific) enzimi kullanılarak yerleştirildi.

Ligasyon Reaksiyonu;

5x Reaksiyon Buffer	4 µl
pJETaroA Vektörü	1 µl
GFP Vektörü	3 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
H ₂ O	11 µl

olarak 20 µl hacimde hazırlanıp vortekslendikten sonra oda ısısında 5 dakika bekletildi.

Ligasyon işleminin konfirmasyonu için yukarıda belirtildiği şekilde Sambrook ve Russell (2001)'in yöntemine göre transformasyon yapıldı. Transformasyon işlemi sonucu uygun antibiyotik eklenmiş besiyerlerinde üretilen hücreler UV ışık altında incelenerek yeşil renkte parıldama gösterip göstermediklerine bakıldı. Yeşil renkte parlayan bu koloniler ligasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini belirtmiş oldu. Elde edilen bu son plazmid pJETaroA(-)GFP olarak isimlendirildi.

2.2.11. pJETaroA(-)GFP Plazmidinin Doğrulaması

Ligasyon sonucu doğrulaması yapılan ve besiyerinde yeşil renkte parlayan kolonilerden rastgele beş tanesi seçilerek sekans analizi gerçekleştirildi. Bu amaçla seçilen koloniler, uygun antibiyotik eklenmiş LB medium besiyerlerine pasajlandı. 37°C'de bir gece inkubasyon sonucu plazmid ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Plazmid ekstraksiyonu GeneJET Plazmid Miniprep kit (Thermo Scientific) ile kitin önerdiği koşullara uygun olarak yapıldı. Kitin uygulama koşulları aşağıda özetlendi.

- Bakteri kültürleri 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldıktan sonra peletler üzerine 250 µl Resuspension solüsyonu eklenip vortekslendi.
- Üzerine 250 µl Lysis solüsyonu eklenip 4-6 kez tüpler ters yüz edildi.
- Üzerine 350 µl Neutralization solüsyonu eklenip tüpler tekrar 4-6 kez ters yüz edildikten sonra 5 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant Thermo Scientific GeneJET Spin Column tüplerine aktarılıp 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi.

- 500 ml Wash solüsyonu eklenip 30-60 saniye 14000 rpm’de 2 kez santrifüjlenerek yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra toplama tüpleri atılıp 1,5 ml ependorflar yerleştirildi.
- 30 µl Elution buffer eklenip 2 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 14000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası plazmid DNA ekstraktı ependorflarda toplandı.

Ekstraksiyon sonucu örneklerin DNA miktarı spektrofotometre ile belirlendi. Sekans analizi için reaksiyon karışımı ve amplifikasyon koşulları aşağıda belirtildiği şekilde sekans PCR’ı uygulandı.

Reaksiyon karışımı:

BigDye Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	4µl
BigDye Terminator 3.1 5x Sequencing Buffer	2 µl
Forward primer, 3.2 pmol	2 µl
Reverse primer, 3.2 pmol	2 µl
Template	150-300 ng
H ₂ O	8-10 µl

Amplifikasyon Koşulları:

96°C	1 dakika	
96°C	10 saniye	
50°C	5 saniye	25 siklus
60°C	4 dakika	

PCR ürünlerinin pürifikasyonu Sephadex (Sigma-Aldrich) ile yapıldı. Pürifikasyondan sonra örnekler 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) cihazına yüklenip sekans analizi gerçekleştirildi. Sekans analizi sonucu

değerlendirme CLC Main Workbench programı ile incelendi ve konfirmasyonu sağlandı.

2.2.12. Rekombinant Bakterinin Oluşturulması

Doğrulan pJETar0A(-)GFP plazmidi öncelikle NotI restriksiyon enzimi ile kesilerek linearize hale getirildi. Takiben uygun replikasyon döneminde (OD₆₀₀ 0.4-0.6) seçilen *S. Infantis* suşu içerisinde yukarıda bahsedilen Sambrook ve Russell (2001)'in yöntemine göre transforme edildi. Seçilen *S. Infantis* suşu kimyasal transformasyon için Sambrook ve Russell (2001)'in yöntemine göre hazırlandı. Bu amaçla bakteriyi kompetan hale getirmek için öncelikle seçilen *S. Infantis* suşu LB agarda 37°C'de bir gece inkübe edildi. Üreyen kolonilerden yaklaşık 2-3 mm büyüklüğünde tek koloni seçilerek LB broth'a pasajlandı ve 37°C, 225 rpm'de inkubasyona bırakıldı. OD₆₀₀ değeri 0,4'e ulaştığı zaman kültür, önceden buz üzerinde soğutulmuş 50 ml falkonlara aktarıldı ve 10 dakika buzda soğutuldu. Ardından 2700 x g hızında, 4°C ısıda, 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra kalan pelet 1 dakika kurumaya bırakıldı. Daha sonra pelet, buz üzerinde soğutulmuş 30 ml MgCl₂-CaCl₂ solüsyonunda süspansiyon edildi. Süspansiyon olan kültür tekrar 2700 x g hızında, 4°C ısıda, 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp kalan pelet 1 dakika kurumaya bırakıldı. Son aşamada buz üzerinde soğutulmuş 2 ml 0,1M CaCl₂ ile süspansiyon edildi. Transformasyon sonucu genin aktarım durumu UV ışık altında incelendi.

2.2.13. Rekombinant Bakterinin Doğrulanması

Oluşturulan rekombinant bakteride GFP geninin plazmitte mi taşındığı veya bakteri kromozomuna mı entegre olduğunu ortaya koymak için PCR analizi, plazmid eliminasyonu, sekans analizi ve Western Blot analizi yapıldı.

2.2.13.1. PCR Analizi

Beklenen mutant bakteri dizisine özel primerler tasarlanarak PCR analizi gerçekleştirildi. Primerler, bakteri kromozomunda *aroA* geninin önünde bulunan geni ve GFP genini kapsayarak yaklaşık 1400 bp'lik kısmı çoğaltacak şekilde MaroA-F 5'-CTC CTT AAT ATC CCC TCC AAC-3' MaroA-R 5'-ATC ACC TTC ACC CTC TCC-3' olarak tasarlandı. Bu amaçla, ilk olarak bakteri DNA ekstraksiyonu GeneJet Genomic DNA Purification kit (Thermo Scientific) ile kitin talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi. Uygulanan PCR (gradient) reaksiyon karışımı ve amplifikasyon koşulları aşağıdaki gibidir.

Reaksiyon karışımı;

5X Phusion HF Buffer	5 µl
10 mM dNTPs	0,5 µl
Forward primer, 10 pmol	0,25 µl
Reverse primer, 10 pmol	0,25 µl
DMSO	0,75 µl
Phusion DNA Polimeraz	0,25 µl
H ₂ O	17 µl
Template DNA	1 µl

olarak 25 µl'lik hacimde hazırlandı.

Amplifikasyon koşulları:

98°C	2 dakika	
98°C	10 saniye	
54-60°C	20 saniye	40 siklus
72°C	45 saniye	
72°C	7 dakika	

PCR ürünleri jel elektroforezine tabi tutularak UV ışık altında incelendi.

2.2.13.2. Plazmid Eliminasyonu

İkinci aşamada oluşturulan rekombinant *S. Infantis* suşu, aktarılan plazmidin taşıdığı antibiyotik direnç genine sahip olduğu için ancak çalışmanın başında kullanılan, mutasyona uğratılmamış olan saha suşunda direnç bulunmadığından oluşturulan rekombinant bakteride plazmid eliminasyonu gerçekleştirildi. Plazmid eliminasyonu Carlton ve Brown (1981)'in yöntemine göre normal üreme sıcaklığının 5-7°C üzerinde (42-43°C) beş gün boyunca LB medium besiyerinde pasajlama ile gerçekleştirildi. Beşinci günün sonunda pasajlanan koloniler, plazmitte bulunan direnç geniyle aynı antibiyotiğin eklendiği LB medium besiyerlerine ekildi ve 37°C'de bir gece inkubasyona bırakıldı. 18-24 saat sonunda, antibiyotik eklenen besiyerinde üremenin olmaması sorgulandı.

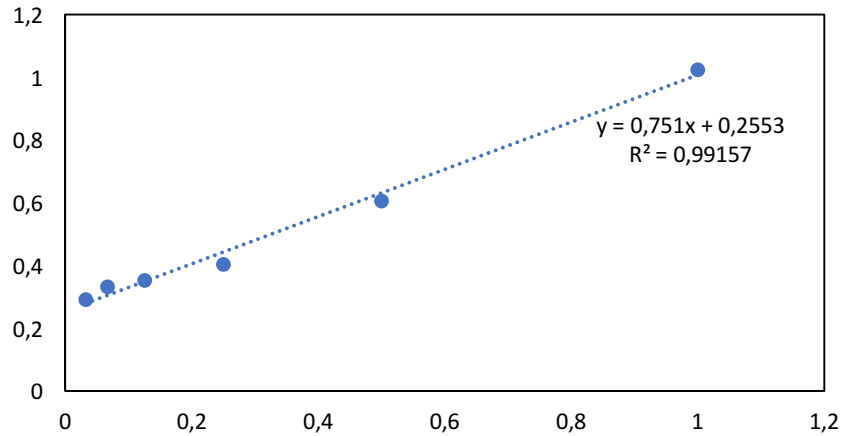
Beş gün süren plazmid eliminasyonu sonucu, kolonilerde UV ışık altında parlama olmaması nedeniyle, GFP geninin kromozomda bulunup bulunmadığı tekrar konfirme edildi. Konfirmasyon için, daha önce UV ışık altında yeşil floresan parlama gösteren ilk rekombinant bakteride olduğu gibi bakteri kromozomunda *aroA* geninin önünde bulunan geni ve GFP genini kapsayacak şekilde MaroA-F 5'-CTC CTT AAT ATC CCC TCC AAC-3' MaroA-R 5'-ATC ACC TTC ACC CTC TCC-3' olarak tasarlanan primerlerle, yukarıda belirtilen koşullarla aynı olarak DNA ekstraksiyonu, PCR analizi ve jel elektroforezi gerçekleştirildi. Jel elektroforezi sonucu GFP geninin bakteri kromozomunda bulunduğu saptandı.

2.2.13.3. Sekans Analizi

Plazmid eliminasyonu yapılan rekombinant bakteride sekans analizi gerçekleştirildi. Sekans analizi için reaksiyon karışımı, amplifikasyon koşulları ve pürifikasyon aşaması yukarıda belirtildiği şekilde uygulandı. Dizi analizi sonuçları CLC Main Workbench 7 programında incelendi ve GFP geninin bakteri kromozomunda entegre olarak bulunduğu bir kez daha doğrulandı.

2.2.13.4. Western Blot Analizi

Oluşturulan rekombinant bakteride GFP geninin ekspresyonunu ortaya koymak için Western Blot analizi gerçekleştirildi (Sambrook ve Russell, 2001). Bu amaçla, plazmid eliminasyonu yapılan rekombinant bakteri, plazmid eliminasyonun yapılmadığı yani antibiyotikli besiyerinde üreyip UV ışık altında yeşil floresan parlama gösteren suş ve saha suşu kullanıldı. Suşlar OD₆₀₀ değeri 0,5 olana kadar LB broth besiyerinde üretildikten sonra protein ekstraksiyonu için 16000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pelet 50 µl buzda soğutulmuş lysis buffer (Bio-rad) içinde süspanse edildi. 95°C'de 10 dakika bekletildikten sonra 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantta bulunan protein ekstraktından 40 µl yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı. Protein miktarı Bradford analizi ile ölçüldü. Bu aşamada, Bradford reagent kit (Thermo Scientific) ile kitin önerdiği şekilde mikropate'lerde 10 µl örneğe ait protein ekstraktı ile 300 µl Coomassie Plus Reagent karıştırıldı. 10 dakika oda ısısında çalkalanarak bekletildi. Protein miktarı 595 nanometre dalga boyuyla ölçülerek kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 2.1). Bradford analizi için standart olarak Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich) kullanıldı.



Şekil 2.1. Protein kalibrasyon eğrisi.

Protein miktarı ayarlandıktan sonra, analiz için 10 µl protein ekstraktı ile 10 µl 2X laemmlı sample buffer (Bio-rad) karıştırılıp 95°C'de 5 dakika

bekletildi. Mini-protean TGX Stain-free Precast Gel (bio-rad) kuyucuklarına 10 µl örnekler yüklendi ve 200V ile 45 dakika dikey elektroforez yapıldı. Elektroforez sonucu jel, Commasie Blue (Thermo Scientific) ile boyandı.

Western Blot analizi için 10 µl protein ekstraktı ile 10 µl 2X laemmlı sample buffer (Bio-rad) karıştırılıp 95°C'de 5 dakika bekletildikten sonra Mini-protean TGX Stain-free Precast Gel (Bio-rad) kuyucuklarına 10 µl örnekler yüklendi ve 200V ile 45 dakika dikey elektroforez yapıldı. Elektroforez sonucu jel Trans-Blot Turbo PVDF (Bio-rad) membranına Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-rad) kullanılarak aktarıldı. Daha sonra membran, Ponceau S (Thermo Scientific) ile boyanarak transfer kalitesi kontrol edildi. Ponceau S boyası döküldükten sonra membran Tris Buffered Saline (Bio-rad) ve Tween-20 (Bio-rad) (TBST) ile üç kere yıkandı. Ardından 1X Tris Buffered Saline (TBS) ile %5 süt tozu ve Tween-20 karıştırılarak Blocking buffer hazırlandı. Membran blocking buffer ile bir saat oda ısısında çalkalanarak yıkandı. Daha sonra birer dakikadan iki kez TBST ile yıkandı. Blotlama için kullanılan polyclonal anti-green fluorescent protein, rabbit IgG fraction (Invitrogen) 1:1000 oranında sulandırılıp membrana aktarıldı, bir saat oda ısısında çalkalanarak bekletildi. Birinci antikor döküldükten sonra birer dakikadan iki kez TBST ile yıkandı. İkinci antikor Anti-Rabbit IgG (whole molecule) (Sigma-Aldrich) 1:80000 oranında sulandırılıp membrana aktarıldı ve yaklaşık bir saat oda ısısında çalkalanarak bekletildi. Son olarak üç kez 5-10 dakika TBST ile yıkamadan sonra 1:1 oranında hazırlanan Western ECL Substrate (Bio-rad) eklenip 5 dakika bekletildikten sonra ChemiDoc MP System (Bio-rad) kullanılarak görüntüleme işlemi tamamlandı.

2.2.14. Rekombinant Bakterinin Karakterizasyonu

Oluşturulan rekombinant *S. Infantis* suşu ile *S. Infantis* saha suşu, *S. Enteritidis* saha suşu ve *S. Typhimurium* saha suşu fenotipik ve genotipik yöntemler ile karşılaştırıldı.

2.2.14.1. Fenotipik Değerlendirme

Rekombinant *S. Infantis* suşu ve saha suşu *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* farklı besiyerlerine ekilerek H₂S oluşumu, koloni morfolojisi, biyokimyasal test analizleri, üreme profili, antibiyotik direnç profilleri ve antimikrobiyal madde duyarlılığı karşılaştırıldı.

2.2.14.1.1. Biyokimyasal ve Üreme Özellikleri

Besi yerindeki üreme özelliklerinin belirlenmesi için, Kanlı agar, MacConkey agar, XLD agar, Nutrient agar, TSI agar, O/F medium ve üre agara ekimler yapıldı. Üreme profilinin belirlenmesi için ise BioScreen C MBR (Finland) cihazı kullanıldı. Bu amaçla selektif olmayan besiyerinde suşlar tek koloni düşecek şekilde üretilip cihaza uygun plate'lere 400 µl içinde tek koloni süspanse edilerek 37°C'de 24 saat ve her saat başı ölçüm yapılacak şekilde ayarlanıp cihaza yüklendi ve OD₆₁₀ dalga boyunda ölçümler yapıldı.

2.2.14.1.2. Hareket Özellikleri

Oluşturulan rekombinant bakterinin hareket yeteneğinde meydana gelen değişiklikleri incelemek amacıyla hareket testi uygulandı. Bu amaçla, Tittsler ve Sandholzer (1936)'in metodu temel alınarak yarı katı besiyeri (Motility test medium) hazırlandı. Rekombinant suş, saha suşları *S. Infantis*, *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* iğne uçlu öze yardımıyla hazırlanan besiyerinin orta hattından olacak şekilde ekildi ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

2.2.14.1.3. Antibiyotik Duyarlılık Özellikleri

Antibiyotik direnç profillerinin incelenmesi için Mueller-Hinton agara ekimler yapılarak disk difüzyon yöntemiyle Çizelge 2.1.'de belirtilen

antibiyotikler European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterlerine uygun olarak test edildi. Bu amaçla, 1 gece önce LB medium besiyerinde üretilmiş bakterilerden, serum fizyolojik içinde, McFarland 0,5 bulanıklık standardı yoğunluğunda inokulum hazırlandı. McFarland 0,5, dansitometre (Grant Bio DEN-1 McFarland Densitometer) ile ölçülerek ayarlandı. Daha sonra steril pamuk uçlu eküvyon inokulum içine batırılıp, kalınlığı yaklaşık 5 mm olarak hazırlanmış Muller-Hinton agar plaklarına üç yönde sürerek yayıldı. Antibiyotik diskleri agarlara yerleştirildi. Bütün testlerde pozitif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

Çizelge 2.1. Kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları.

Antibiyotik	Konsantrasyon
Ampisilin (Oxoid)	10 µg
Gentamisin (Oxoid)	10 µg
Streptomisin (Oxoid)	10 µg
Siprofloksasin (Oxoid)	5 µg
Nalidiksik asit (Oxoid)	30 µg
Trimetoprim (Oxoid)	5 µg
Trimetoprim sülfametoksazol (Oxoid)	300 µg
Kloramfenikol (Oxoid)	30 µg
Tetrasiklin (Oxoid)	30 µg
Sefotaksim (Oxoid)	5 µg

2.2.14.1.4. EDTA Duyarlılık Testi

Oluşturulan rekombinant *S. Infantis* suşunun antimikrobiyal maddelere karşı değişen özelliklerini incelemek amacıyla EDTA duyarlılık testi yapıldı. Bu amaçla, Sebkova ve ark. (2008)'nin kullandığı antibiyotik MIK değerlendirme yöntemine benzer olan metot uygulandı. Bu yöntemde göre; bir litre distile su içerisinde çözdürülen 4096 mg EDTA (Sigma-Aldrich) süspansiyonu eşit

miktarda LB broth ile karıştırıldı. Bu karışımdan daha sonra 96 gözlü mikropleytte, ilk gözde 2048 mg/L olacak şekilde 16 mg/L'ye kadar LB broth ile iki katlı dilüsyonları hazırlandı. Rekombinant *S. Infantis* suşu ve *S. Infantis* saha suşu hazırlanan bu mikropleyte eşit oranda ilave edilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

2.2.14.1.5. *In Vitro* Adezyon ve İnvazyon Testleri

Rekombinant *S. Infantis* suşunun bağırsak hücresinde adezyon ve invazyonunun belirlenmesi amacı ile Şap Enstitüsü'nden temin edilen Caco-2/An 1 (human epithelial colorectal adenocarcinoma) hücre kültürüne Salehi ve ark. (2017) ile Giannasca ve ark. (1996)'nın yöntemine göre ekimler yapıldı. Caco-2 hücreleri, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) içine %10 fetal bovine serum eklenerek 37°C'de %5 karbondioksitli etüvde inkübasyona bırakıldı. Adezyon ve invazyon analizi için, Caco-2 hücreleri 24 gözlü hücre kültürü pleytlerine ekildi.

Adezyon analizi için, LB broth besiyerinde, çalkayıcılı etüvde 37°C'de üretilmiş, taze, rekombinant *S. Infantis* ve saha suşu *S. Infantis* OD₆₀₀ değeri 0,6 (6×10^8 CFU/ml) olacak şekilde ayarlandı. 24 gözlü hücre kültürü pleytinin her bir gözünde yeteri kadar bakteri (yaklaşık 10^7 cfu/ml) olacak şekilde 100:1 oranında bakteri inokulumu hazırlandı. İnokulasyondan önce Caco-2 hücreleri iki kez phosphate-buffered saline (PBS) ve bir defa da oda ısısındaki DMEM medium ile yıkandı. Bakteri inokulasyonundan 1 ml hücre kültürü pleytine eklendikten sonra, pleyt 800 rpm'de bir dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra pleyt, 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 45 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra inokulum atılarak adezyonu gerçekleştirmiş bakterileri ortadan kaldırmak için pleytler beş kez ısıtılmış PBS ile yıkandı. Daha sonra Caco-2 hücreleri soğutulmuş %0,1 Triton X-100 (Sigma-Aldrich) ile parçalandı ve bakteri hücre sayısının belirlenmesi için 10 katlı dilüsyonlar

hazırlanarak, her bir dilüsyondan iki adet LB medium besiyeri plaklarına ekimler yapıldı.

İnvazyon analizi için, yukarıda anlatıldığı şekilde, hazırlanan inokulum hücrelere verildikten sonra bir saat bekletildi. Daha sonra medium içerisinde 100 µg/ml gentamisin bulunan taze medium ile değiştirildi. İki saatlik inkubasyon sonrasında süspansiyon aspire edildi. Daha sonra hücreler iki kez PBS ile yıkanarak üzerine soğutulmuş %0,1 Triton X-100 eklendi. İnvaze olmuş bakteri hücre sayısının belirlenmesi için 10 katlı dilüsyonlar hazırlanarak, her bir dilüsyondan iki adet LB medium besiyeri plaklarına ekimler yapıldı. Bütün bu işlemler dört defa tekrar edildi. Tekrarların aritmetik ortalaması alınarak yüzde invazyon oranı ($[\text{hücre içi bakteri sayısı}/\text{inokule edilen bakteri sayısı}] \times 100$) ve yüzde aderans oranı ($[\text{yıkama sonrası bakteri sayısı}/\text{inokule edilen bakteri sayısı}] \times 100$) hesaplandı.

2.2.14.2. Genotipik Değerlendirme

Genotipik değerlendirme amacıyla Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) uygulandı. Bu amaçla, rekombinant *S. Infantis* suşu plazmid eliminasyonu yapılan ve yapılmayan olarak iki suş, saha suşu *S. Infantis*, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* kullanıldı.

Her bir suş Nutrient agar besiyerlerine ekilerek 37°C'de 18-24 saat inkubasyona bırakıldı. Üreme sonunda Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'in protokolüne göre önerilen koşullarda jel elektroforezine hazırlandı. Protokole göre uygulanan aşamalar aşağıdaki gibidir:

- Kültüre edilen örnekler OD₆₁₀ 0,8-1,0 arasında olacak şekilde Cell Suspension Buffer (100 ml 1M Tris, 200 ml 0,5 M EDTA, 700 ml Ultrapure su) içinde süspanse edildi.

- Her bir süspansiyon edilen örnekten 400 µl alınarak 20 µl Proteinase K (20 mg/ml stok) ve 400 µl %1'lik SeaKem Gold agarose ile karıştırılıp pluglar hazırlandı.
- Hazırlanan pluglar Cell Lysis Buffer (50 mM Tris: 50mM EDTA, pH 8,0 + %1 Sarcosyl) ve Proteinase K eklenmiş mix içinde 54-55°C su banyosunda 1,5-2 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonucu pluglar, 54-55°C'de 10-15 dakika olacak şekilde ilk olarak 10-15 ml Ultrapure suda 2 kez yıkandı.
- Su ile yıkama işlemi sonrası pluglar, 54-55°C'de 10-15 dakika olacak şekilde TE Buffer ile üç kez yıkandı.
- Yıkama işleminden sonra pluglar XbaI (50U) restriksiyon enzimi kullanılarak kesim işlemine tabi tutuldu. Kesim için; pluglar öncelikle 2,0-2,5 mm büyüklüğünde bistüri yardımıyla kesildi ve ependorf tüplerine aktarıldı. Her bir örnek üzerine 180 µl Ultrapure su ve 20 µl 10X Restriction buffer eklenip 37°C su banyosunda 5-10 dakika bekletildi. İnkübasyon sonunda buffer atılıp üzerine 175 µl Ultrapure su, 20 µl 10X Restriction buffer ve 5 µl XbaI (10U/µl) enzimi eklenip 37°C su banyosunda 1,5-2 saat bekletildi.
- Kesim işlemi sonrası jel elektroforezi için öncelikle 100 ml 10X TBE ve 1900 ml Ultrapure su karıştırılarak buffer hazırlandı. Aynı zamanda 100 ml 0,5X TBE ile 1 g SeaKem Gold agaroz karıştırılıp mikrodalgada eritildikten sonra 55-60°C sıcaklığa soğutuldu.

Kesim sonrası pluglar jel içine yerleştirilip CHEF DR-III cihazında elektroforez gerçekleştirildi.

Elektroforez koşulları

Initial switch time: 2,2 s

Final switch time: 63,8 s

Voltage: 6 V

Included Angle: 120°

Run time: 18-19 saat
olarak ayarlandı.

- Elektroforez işlemleri sonucu jel 20-30 dakika 400 ml Ultrapure su içine 40 µl (10 mg/ml) ethidium bromide eklenerek boyandı. Daha sonra 500 ml Ultrapure su ile 20 dakikada bir değiştirilerek 60 dakika daha yıkandı.
- Elde edilen DNA fragmanları UV ışığı altında görüntülendi.
- Fragmanların benzerliği GelCompar II vs. 6.6.11 (Applied Maths) yazılımı kullanılarak değerlendirildi.
- PFGE sonucu elde edilen bantlar UPGMA (Unweighted pair group method with mathematical averaging) metodu ve Dice benzerlik (Dice similarity coefficient) katsayısı kullanılarak dendrogram analizi yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Kullanılacak Suşun Seçimi ve Genom İzolasyon Bulguları

Çalışmada kullanılacak olan suşun seçimi için Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda yer alan, daha önce kümes altlık ve tozundan izole edilmiş ve ribotiplendirme kütüphanesinde en çok ribopatemi olan suşlardan seçim yapıldı. Ribotiplendirme sonuçlarına göre ribotiplendirme kütüphanesinde toplam 170 *S. Infantis* suşunun dahil olduğu, altı adet ribopatern içinde en çok sayıda (n: 98) *S. Infantis*'i içeren ribopaternden rastgele 15 adet *S. Infantis* suşu seçildi ve kültüre edildi. Kültüre edilen suşlardan yapılan bakteriyel genom izolasyonu sonucu ekstraksiyonlardaki DNA miktarı, spektrofotometre (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) ile ölçüldü. DNA miktarı ve 260/280 oranı sırasıyla; birinci suşta 27,2 ng/µl ile 1,98, ikinci suşta 28,8 ng/µl ile 2,01 olarak optimum değerlere sahip olan iki suş seçildi.

3.2. Hedef Genom Bölgesinin PCR Analiz Bulguları

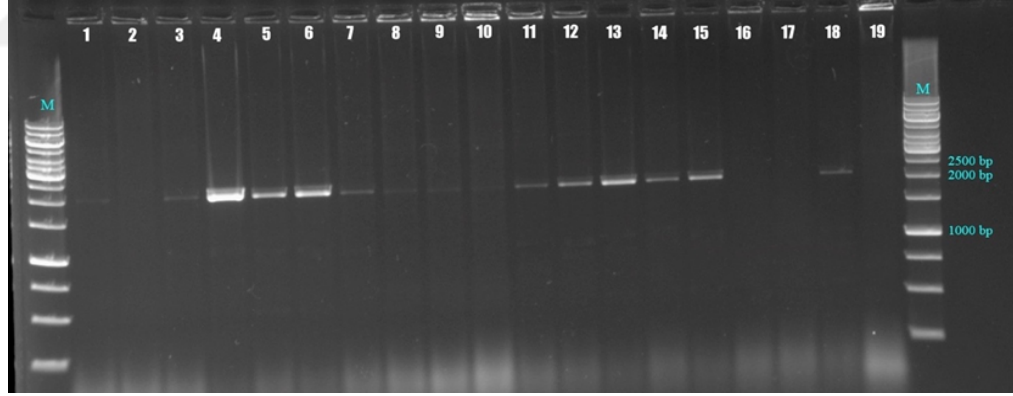
DNA ekstraksiyonu yapılan *S. Infantis* suşlarında *aroA* geninin varlığı uygulanan gradient PCR ile *aroA*-F/0384 5'-TCT TTC CGG TCT GGT GTT-3' *aroA*-R/2451 5'-GAC GTT TGG TGT ATT TGC TT-3' primerleri kullanılarak saptandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *aroA* genine spesifik dizayn edilen primerler ile elde edilen iki suşa ait gradient PCR sonucu jel elektroforez görüntüsü (M: 1kb DNA Ladder; N: Negatif kontrol, A:50°C; B:51°C; C:52,3°C; D:54°C; E:56,1°C; F:58,6°C; G:60,8°C; H:62,4°C; I:63,9°C; J:64,6°C; K:65°C).

3.3. Klonlama Bulguları

Hedef genom bölgesi çoğaltılıp pürifikasyonu yapılan PCR ürünü, CloneJet PCR Cloning kit ile shuttle plazmide klonlandıktan sonra pJETaroA vektörünün, kompetan hücreye transformasyonu ve daha sonra PCR analizi ile klonlama işleminin confirmasyonu yapıldı. Klonlama işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiği belirlendi (Şekil 3.2).

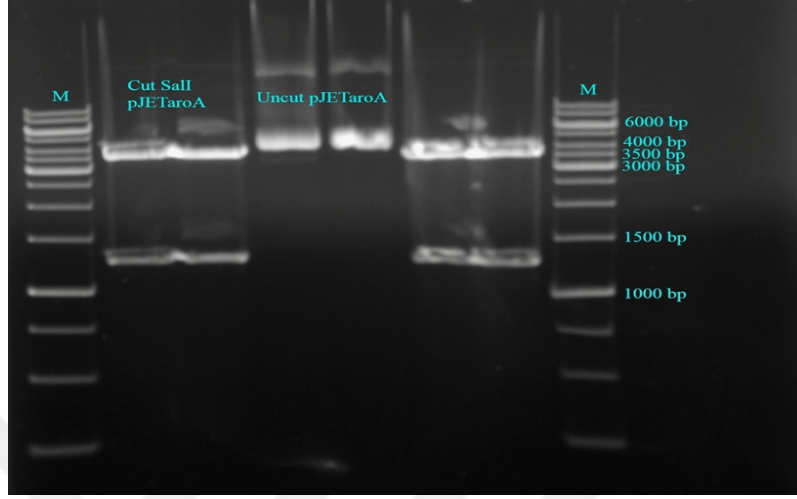


Şekil 3.2. Rastgele seçilen 19 adet bakteri kolonisine, *aroA* genine spesifik dizayn edilen primerler ile uygulanan PCR sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü (M:1 kb DNA Ladder; 1-19: örnek numaraları).

3.4. pJETaroA Vektöründen Elde Edilen Gen Bölgesi Bulguları

Konfirmasyonu yapılan pJETaroA vektöründen SallI restriksiyon enzimi ile kesim işlemi yapıldıktan sonra jel elektroforezi ile kesim işleminin doğru

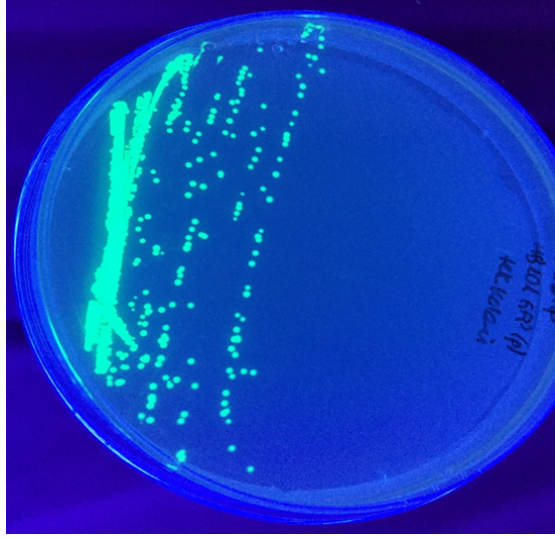
şekilde gerçekleştiği saptandı ve bu doğrultuda büyük parça (pJETaroA(-)) jelden ekstrakte edildi (Şekil 3.3).



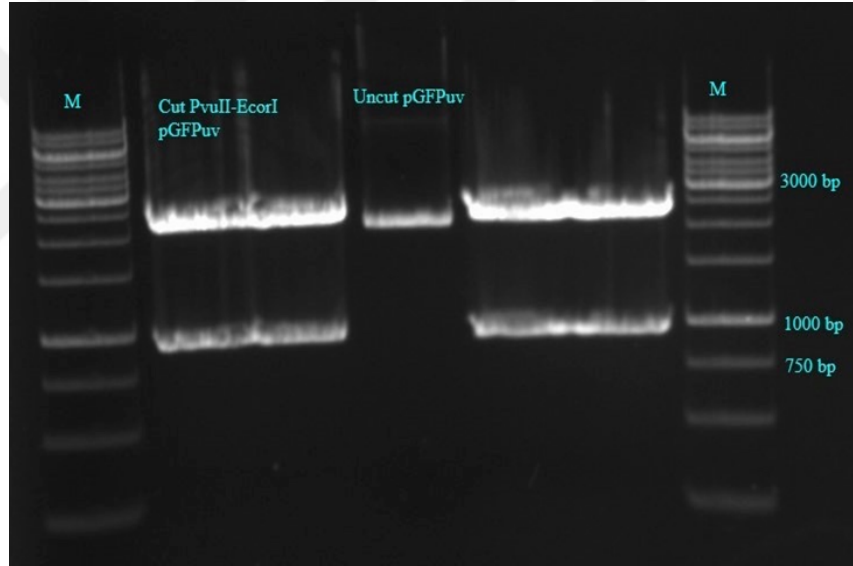
Şekil 3.3. pJETaroA vektörünün Sall restriksiyon enzimi ile kesimi sonrası jel görüntüsü (M: 1kb DNA Ladder).

3.5. Bakteri Hücrelerinde İfade Olabilen Yeşil Floresan Protein (GFP) Kodlayan Gene Ait Bulgular

Ticari olarak temin edilen pGFPuv vektörü kompetan hücreye transforme edildikten sonra UV ışık altında bakıldı ve kolonilerin yeşil floresan renkte parlamasıyla transformasyonun gerçekleştiği saptandı (Şekil 3.4). Transformasyon sonucu GFP geni ekstrakte edildikten sonra EcorI ve PvuII restriksiyon enzimleri ile kesildi ve jel elektroforezi kesim işlemi doğrulandı (Şekil 3.5).



Şekil 3.4. pGFPuv vektörünün transformasyonu sonucu UV ışık altında görüntüsü.

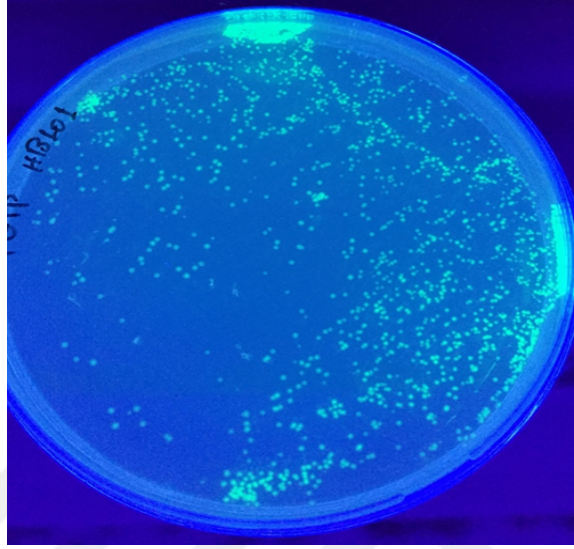


Şekil 3.5. pGFPuv vektörünün EcoRI ve PvuII restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrası jel görüntüsü (M: 1 kb DNA Ladder).

3.6. GFP Geni Klonlama Bulguları

pJETaroA(-) vektörü içine GFP geni yerleştirildikten sonra kompetan hücreye transforme edilerek UV ışık altında bakıldı ve kolonilerin yeşil renkte parıldama göstermesi ile GFP geninin pJETaroA(-) vektörüne yerleştirildiği belirlendi (Şekil 3.6).

Parıldama gösteren kolonilerden rastgele seçilen beş tanesinden plazmid ekstraksiyonu yapılarak sekans analizi gerçekleştirildi ve sekans analizine göre GFP geninin varlığı belirlendi.

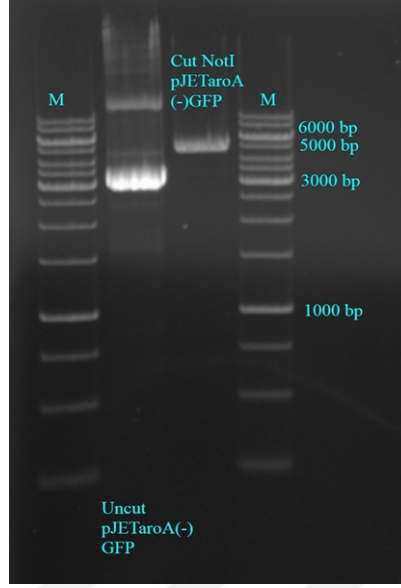


Şekil 3.6. pJETaroA(-)GFP vektörünün transformasyon sonucu UV ışık altında görüntüsü.

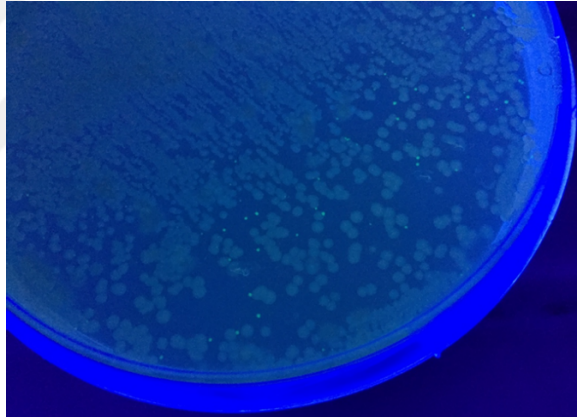
3.7. Rekombinant Bakterinin Doğrulanması ve Analiz Bulguları

3.7.1. pJETaroA(-)GFP Plazmidinin *S. Infantis* Saha Suşuna Transformasyonu

pJETaroA(-)GFP plazmidi NotI restriksiyon enzimi ile kesilip linearize hale geldiği elektroforez yapılarak saptandı (Şekil 3.7). Linearize hale getirilen plazmid *S. Infantis* suşuna transforme edilerek UV ışık altında bakıldı ve kolonilerin yeşil renkte parıldama göstermesi ile transformasyonun gerçekleştiği, böylece GFP geninin aktarıldığı dolayısıyla *aroA* geninin söndürülerek delesyon mutasyon sonucun pozitif olduğu anlaşıldı. (Şekil 3.8).



Şekil 3.7. pJETaroA(-)GFP vektörünün NotI restriksiyon enzimi ile kesimi sonrası jel görüntüsü (M: 1 kb DNA Ladder).

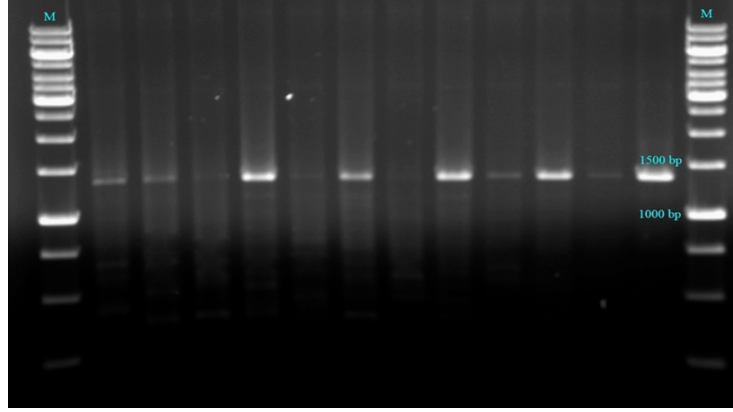


Şekil 3.8. pJETaroA(-)GFP vektörünün *S. infantis* suşuna transformasyonu sonucu UV ışık altında görüntüsü.

3.7.2. Rekombinant *S. infantis* Suşunun Doğrulanması

3.7.2.1. PCR Analizi

Oluşturulan rekombinant bakteride GFP geninin bakteri kromozomuna entegre olduğu, PCR analizi ile saptandı. Beklenen yerde bant görülmesi GFP geninin bakteri kromozomuna entegre olduğunu ortaya koymuş oldu (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Rekombinant *S. Infantis* suşuna ait spesifik dizayn edilen primerler ile yapılan PCR sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü (M: 1kb DNA Ladder).

3.7.2.2. Sekans Analizi

PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ürün aynı primerler ile iki yönlü olarak sekans analizi ile konfirme edildi ve GFP geninin varlığı saptandı.

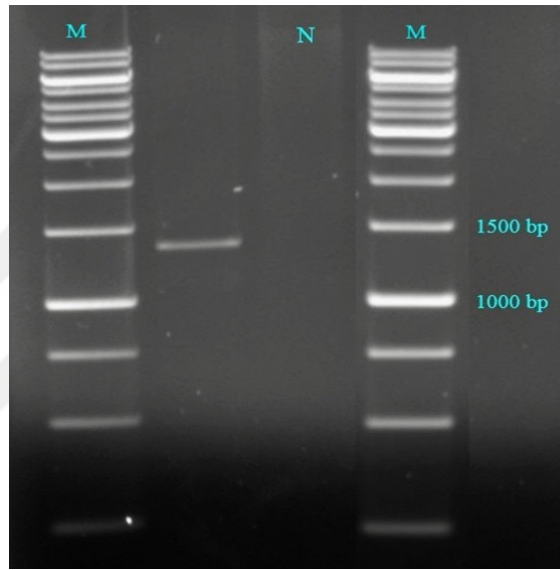
3.7.3. Rekombinant *S. Infantis* Suşunda Plazmid Eliminasyonuna Ait Bulgular

Rekombinant *S. Infantis* suşu, aktarılan plazmidin taşıdığı antibiyotik direnç genine sahip olduğu için ancak çalışmanın başında kullanılan, mutasyona uğratılmamış olan saha suşunda direnç bulunmadığından, oluşturulan rekombinant bakteride 42°C’de beş gün boyunca LB medium besiyerinde pasajlama ile beş günün sonunda antibiyotikli LB medium besiyerinde üreme olmamasıyla plazmid eliminasyonu gerçekleştiği belirlendi.

3.7.3.1. Plazmid Eliminasyonunun Doğrulanması

3.7.3.1.1. PCR Analizi

Plazmid eliminasyonu sonucu UV ışık altında kolonilerin yeşil floresan parıldama göstermemesi sonucu, GFP geninin varlığı PCR ve sekans analizi ile belirlendi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Plazmid eliminasyonu yapılan suşa spesifik olarak dizayn edilen primerler ile yapılan PCR sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü (M: 1kb DNA Ladder; N: Negatif kontrol).

3.7.3.1.2. Sekans Analizi

Plazmid eliminasyonu yapıldıktan sonra konfirme edilen PCR ürünü sekans analizi ile doğrulandı ve GFP geninin varlığı belirlendi.

3.7.4. Western Blot Bulguları

Blotlama yöntemi ile plazmid eliminasyonu yapılan ve yapılmayan iki rekombinant suş ve saha suşu test edilerek GFP antikorunun plazmid

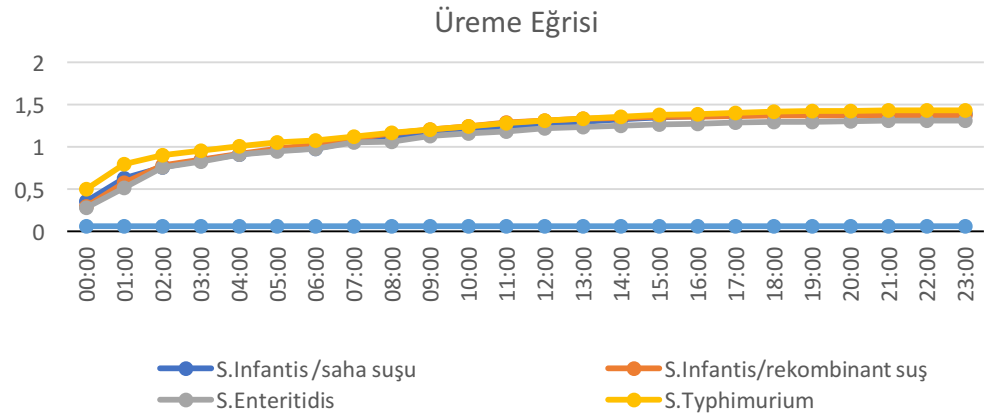
eliminasyonu yapılan sušta ve saha suşunda bağlanmaması, plazmid eliminasyonu yapılmayan sušta ise antikorun bağlanması ile protein ekspresyonu belirlendi. Plazmid eliminasyonu yapılan sušta GFP geninin eksprese olmadığı görüldü.

3.7.5. Fenotipik Bulgular

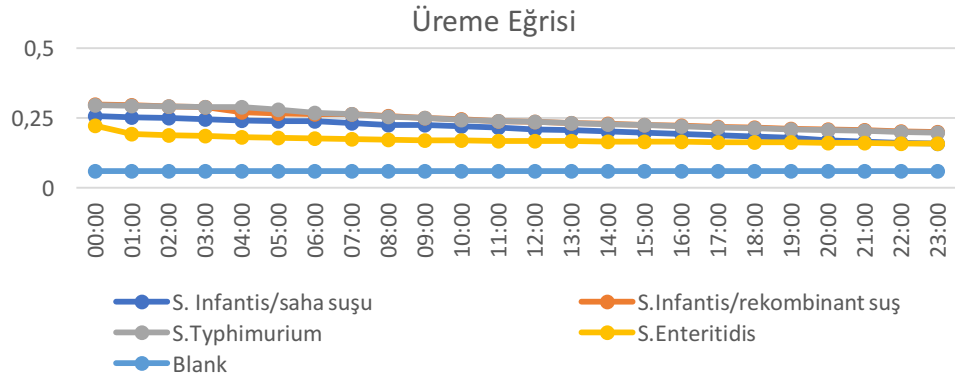
3.7.5.1. Biyokimyasal Özellikleri ve Üreme Bulguları

İn vitro analizlerde; rekombinant bakteri ile saha suşları *S. Infantis*, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*'un fenotipik özelliklerinde herhangi bir farklılık bulunmadığı belirlendi. Tüm suşlarda besi yerinde üreme özellikleri ile biyokimyasal test analiz sonuçlarının aynı olduğu belirlendi.

Suşların 37°C (Şekil 3.11) ve 56°C'deki (Şekil 3.12) üreme eğrisi grafikleri karşılaştırıldığında suşların üreme grafikleri arasında farklılık belirlenmedi.



Şekil 3.11. Suşlara ait 37°C'de üreme eğrisi grafiği.



Şekil 3.12. Suşlara ait 56°C'de üreme eğrisi grafiği.

3.7.5.2. Hareket Testi Bulguları

Hareket özellikleri incelendiğinde, rekombinant bakteri ile saha suşlarının yarı katı besiyerindeki üreme şekillerinde herhangi bir farklılık saptanmadı.

3.7.5.3. Antibiyotik Duyarlılık Test Bulguları

Rekombinant *S. Infantis* ve saha suşu *S. Infantis* suşlarının antibiyotik direnç profillerine bakıldığında; rekombinant bakterinin nalidiksik asite, tetrasikline, trimetoprim duyarlı hale geldiği ve siprofloksasin, kloramfenikol, ampisilin ve streptomisine karşı da rekombinant bakteride duyarlılığın arttığı saptandı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Rekombinant *S. Infantis* suşu ve *S. Infantis* saha suşunun antibiyotik disk difüzyon testi sonuçları. (NA; nalidiksikasit, TE; tetrasiklin, AMP; ampisilin, W; trimetoprim, CTX; sefotaksim, C; kloramfenikol, RL; sulfametoksazol, CN; gentamisin, S; streptomisin, CIP; siprofloksasin).

Antibiyotik	NA	TE	AMP	W	CTX	C	RL	CN	S	CIP
Diski/Zon çapı										
Rekombinant suş	23	15	18	29	33	33	0	22	16	30
Saha suşu	0	0	9	0	33	20	0	20	10	20

3.7.5.4. EDTA Duyarlılık Testi Bulguları

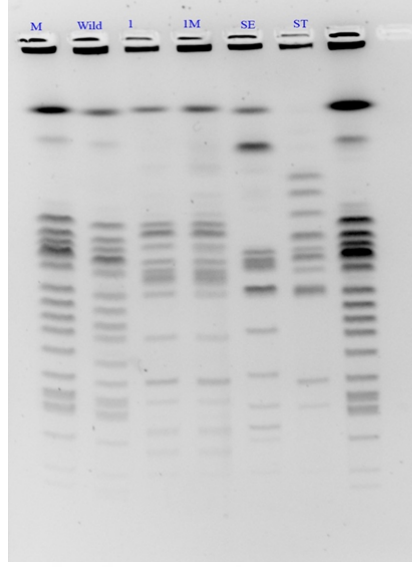
MIK değerlerine göre rekombinant suşun saha suşundan yaklaşık sekiz kat daha duyarlı olduğu tespit edildi. Buna göre, saha suşunun MIK değeri >1024 µg/ml iken mutant suşun MIK değeri 128 µg/ml olarak bulundu.

3.7.5.5. *İn vitro* Adezyon ve İnvazyon Test Bulguları

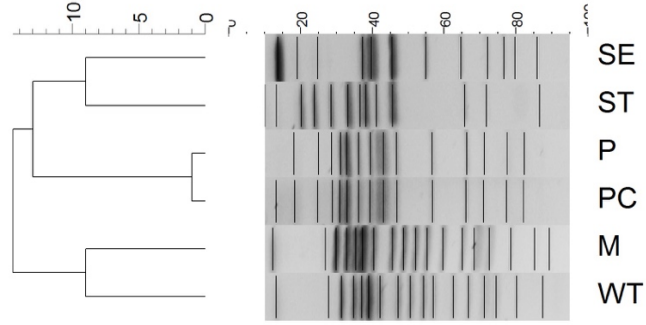
Hücre kültürü analizi sonucu mutant suş adezyon oranı %0,07; invazyon oranı ise %0,03 olarak bulunurken saha suşu adezyon oranı %0,77; invazyon oranı ise %0,4 olarak bulundu. Elde edilen bu sonuçlar mutant suşun saha suşuna kıyasla 10 kat daha az invazyon ve adezyon yeteneğine sahip olduğu belirlendi.

3.7.6. Genotipik Bulgular

Genotipik analizlerde ise, PFGE sonucu rekombinant suş ile *S. Infantis* saha suşunun gen profillerinin birbirinden farklı olduğu belirlendi (Şekil 3.13). Dendogram analizi sonucu rekombinant suş ile saha suşu *S. Infantis*'in farklı taksonlarda yer aldığı gözlenmesi mutant suş ile saha suşunun birbirinden farklı olduğunu ortaya koydu (Şekil 3.14).



Şekil 3.13. PFGE Jel Elektroforezi görüntüsü (M: marker; Wild: *S. Infantis* saha suşu, 1: Plazmid eliminasyonu yapılmayan rekombinant *S. Infantis* suşu, 1M: Plazmid eliminasyonu yapılmış *S. Infantis* suşu; SE: *S. Enteritidis*; ST: *S. Typhimurium*).



Şekil 3.14. Dendrogram analizi görüntüsü (M: marker; WT: *S. Infantis* saha suşu, P: Plazmid eliminasyonu yapılmayan rekombinant *S. Infantis* suşu, PC: Plazmid eliminasyonu yapılmış *S. Infantis* suşu; SE: *S. Enteritidis*; ST: *S. Typhimurium*).

4. TARTIŞMA

Avrupa'da ve diğer ülkelerde, tavuk eti ile besin yoluyla insanlarda infeksiyonlara neden olan *Salmonella* Infantis, son yıllarda ciddi oranda artış göstermesi ile önem kazanmaktadır. Giderek artan *Salmonella* prevalansının azaltılması hem halk sağlığı hem de hayvan sağlığı açısından büyük öneme sahiptir. Bu amaçla uygulanan kontrol programları yanında aşılama programları da oldukça önemlidir. Günümüzde Amerika Birleşik Devletleri'nde, Avrupa'da ve birçok ülkede moleküler yöntemlerle elde edilen aşılar kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, Türkiye'de en çok izole edilen *S. Infantis* suşlarına karşı aşı geliştirilebilmesine yönelik birçok hayvanda ve hatta insanda attenüe olduğu iyi bilinen *aroA* mutanti oluşturularak bu suşun *in vitro* analizleri yapıldı.

1980'lerden beri aromatik aminoasitlerden yoksun mutantlar birçok farklı bakteri türünde çalışılmış ancak *S. Infantis* suşlarında çalışılmamıştır. Bu doğrultuda okzotrofik mutant *S. Infantis* suşu oluşturulması, dünyada yapılan ilk çalışmadır.

Hoiseith ve Stocker (1981)'in çalışmasında, transpozon insersiyonu ile aromatik aminoasit sentezini engelleyerek avirüent *S. Typhimurium* suşu elde etmişken bu çalışmada gen insersiyonu transpozon kullanılmadan gerçekleştirilerek *aroA* geni *S. Infantis*'te söndürülmüştür. Çalışmada kullanılan suşta *aroA* genine spesifik tasarlanan primerler ile yapılan PCR analizi sonucu beklenen yerde ve tek bir bant görülmesi bununla birlikte negatif kontrolün doğru çalışması primerlerin oldukça spesifik olduğunu ortaya koydu.

Rekombinant bakterinin fenotipik incelemelerinde saha suşu ile aynı özellikler taşıdığı ancak bazı farklı özelliklere sahip olduğu görüldü. *Salmonella* spesifik besiyerlerine yapılan ekimlerde rekombinant suş ile saha suşu *S. Infantis*, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* suşlarının üremelerinde bir fark olmadığı belirlendi.

Cooper ve ark. (1994a)'nın oluşturduğu *aroA* mutanını *S. Enteritidis* suşunun triple sugar iron (TSI) besiyerinde H₂S oluşturmadığını bildirmişlerdir. Bunun aksine yapılan tez çalışmasında oluşturulan *aroA* mutanını *S. Infantis* suşunda TSI besiyerinde H₂S oluşumu gözlemlendi. Cooper ve ark. (1994a) H₂S oluşumunu *aroA* mutasyonu ile ilişkilendirmişlerdir ancak bu konuyla ilgili daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Ocallaghan ve ark. (1988)'nin yaptığı çalışmada, esansiyel aminoasitlerin besiyerinden sağlanarak *aroA* mutanını *Salmonella* suşlarının saha suşları gibi üreyebildiği belirtilmektedir. Bu tez çalışmasında, benzer olarak 37°C ve 56°C'de 24 saat boyunca suşlara ait üreme eğrisi grafikleri incelendiğinde suşlar arasında bir farklılık olmadığı belirlenmesi yapılan çalışmayı destekler nitelikte bulundu.

Sebkova ve ark. (2008) yaptığı çalışmada *S. enterica*'nın bazı serotiplerinin *aro* mutantlarının serum, albümin, EDTA, sistein, tripsin, lizozim gibi antimikrobiyal etkisi olduğu bilinen maddelere duyarlılığının arttığını bildirmişlerdir. Sebkova ve ark. (2008), artan bu duyarlılığı *aro* mutantlarında hücre zarı yapısının bozulmasından kaynaklandığını öne sürmüşlerdir. Bu tez çalışmasında da hücre membranına etki ettiği bilinen EDTA duyarlılığı incelendiğinde mutant suşun saha suşuna kıyasla EDTA'ya duyarlılığının sekiz kat arttığı belirlendi. Elde edilen bu sonuç Sebkova ve ark. (2008)'nin sonucunu destekler nitelikte bulundu.

Antibiyotik direnç profili karşılaştırıldığında ise mutant suşun saha suşuna kıyasla bazı antibiyotiklere daha duyarlı hale geldiği, bazılarında ise tamamen dirençli halden duyarlı hale geldiği görüldü. Özellikle aminoglikozid (streptomisin), kloramfenikol, ikinci kuşak kinolonlara (siprofloksasin) ve ampisiline duyarlılığı artarken birinci kuşak kinolonlar (nalidiksik asit), tetrasiklin ve trimethoprime tamamen duyarlı hale geldiği görüldü. Felgner ve ark. (2016), *aroA* mutant *S. Typhimurium* suşunda mutant suşun ampisiline karşı duyarlılığının arttığını bildirmiştir. Araştırmacılar ampisiline karşı gelişen bu

duyarlılığın *aroA* mutant *S. Typhimurium* suşunda dış membranın yapısının bozulmasından kaynaklanabileceğini düşünmüşlerdir. Bu çalışmada da *aroA* mutant *S. Infantis* suşunda ampisilin duyarlılığının artması bu sonucu destekler niteliktedir. Mutant suşta trimetoprimine karşı kazanılan duyarlılık trimetoprimin etki mekanizması ve *aroA* mutasyonu ile örtüşmektedir. Trimetoprimin, PABA antagonisti olarak çalıştığı bilinmektedir. *aroA* ise PABA sentezi için gerekli olan bir gen olup bu gendeki mutasyonun PABA sentezini engellediği düşünülmektedir (Smith ve Powell, 2000). Bu duruma benzer şekilde, tez çalışmasında oluşturulan *S. Infantis* mutant suşunda PABA sentezi gerçekleşemediği için trimetoprimine duyarlı hale geldiği düşünüldü.

Bazı bakterilerin, flagella üretmesinde ubikuinona ihtiyaç duyduğu bilinmektedir (Hertz ve Bar-Tana, 1977). Bu bakterilerden, *S. Typhimurium*'un da flagella üretmesinde ve bakteriyel üremesinde alifatik veya aromatik karboksilik asitlerin varlığında ubikuinon sentezine ihtiyaç duydukları ortaya konmuştur (Bar-Tana ve ark., 1980). Bununla birlikte, Sebkova ve ark. (2008) *aro* mutantlarında hareketin bozulduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu tez çalışmasında, şikimat yolağında görev alan *aroA* geninin söndürülmesi sonucu aynı yolağın son ürünlerinden biri olan ubikuinonun, oluşturulan rekombinant bakteri de sentezlenemeyeceği sonucuna varılarak hareket testi uygulandı. Ancak, elde edilen sonuçlar rekombinant suş ile saha suşu arasında hareket özelliği açısından bir fark olmadığını gösterdi. Elde edilen bu sonuç flagella üretilmesinde *S. Infantis* suşlarında farklı bir mekanizmanın olabileceğini düşündürdü.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye’de oranı gittikçe artan *S. Infantis* suşlarına karşı geliştirilmiş aşı bulunmamaktadır. Bu amaçla, dünyada ilk defa, 1980’lerden beri virülensinin oldukça düşük olduğu bilinen okzotrofik *S. Infantis* mutanı oluşturuldu ve oluşturulan suşun karakterizasyonu incelendi.

Elde edilen mutant suşun, bazı antibiyotik ve antimikrobiyal maddelere direnç göstermediği, hücre kültürüne inokulasyonda adezyon ve invazyonun saha suşuna göre 10 kat daha az olduğu saptandı.

Bu tez çalışması ile; Türkiye’de farklı bölgelerden izole edilen yeni serotiplere karşı aşı adayları çalışması yapılabileceği öngörülmektedir. *Salmonella* Kontrol Programı çerçevesinde sıklıkla izole edilebilecek diğer serotiplere karşı da rekombinant aşı adayları oluşturulabileceği bu doğrultuda, aşı adayları oluşturmak için rekombinant DNA teknolojisi kullanımı önerilmiştir. Oluşturulan suşun fenotipik ve genotipik karakterizasyonu yapılarak uygunluğu belirlenebilir.

Bu çalışmada oluşturulan okzotrofik *S. Infantis* mutant suşu aşı adayları olarak görülüp, daha sonra yapılacak olan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar için saklanmıştır.

ÖZET

***AroA* Defektif Mutant *Salmonella* *Infantis* Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu**

Salmonella türleri, bağırsak kolonizasyonu ve dışkı ile saçılması gıda amaçlı kullanılan kanatlı hayvanlarla kolayca insan besin zincirine girerek insanlarda gastroenteritisten sistemik infeksiyonlara kadar birçok hastalığın nedeni olabilmektedir. Kanatlı aşılama programları *Salmonella* kontrol programları içinde önemli bir yere sahiptir. Günümüzde, en çok izole edilen türler arasında bulunan *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* ve *S. Typhi*'ye karşı geliştirilmiş aşılar bulunmaktadır. Ancak Türkiye'de de oranı giderek artan *S. Infantis* suşlarına karşı bir aşı bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında Türkiye'de kanatlı yetiştiriciliklerinde sıklıkla izole edilen *S. Infantis* suşlarına karşı bir aşı prototipi geliştirilebilmesine yönelik olarak, *aroA* gen bölgesi silinmiş rekombinant *S. Infantis* suşu geliştirilmesi ve elde edilen mutant bakterinin *in vitro* karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

Bu kapsamda, dünyada ilk defa okzotrofik *S. Infantis* mutant suşu *aroA* gen bölgesi silinerek oluşturulmuş olup oluşturulan suşun *in vitro* analizlerinde bazı antibiyotiklere ve bazı antimikrobiyal maddelere karşı duyarlı hale geldiği ve saha suşuna kıyasla hücre kültüründe yapılan testlerle adezyon ve invazyonunun 10 kat daha az olduğu tespit edilmiştir.

Salmonella Kontrol Programı çerçevesinde, Türkiye'de farklı bölgelerden sıklıkla izole edilebilecek serotiplere karşı aşı prototipi geliştirilmesine yönelik olarak rekombinant DNA teknolojisinin kullanımının avantajlı olacağı önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: *aroA* geni, okzotrofik mutant, rekombinant aşı, *Salmonella* *Infantis*

SUMMARY

Achieve and Characterization of *aroA* Defective Mutant *Salmonella* Infantis

Salmonella species, by means of intestine colonization and feces spread of the food animals, *Salmonella* are known to be main cause of diseases varying from gastroenteritis to systemic infections in humans. Poultry vaccine programmes are important for control of *Salmonella* infections. There are vaccines for the most isolated serotypes of *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* and *S. Typhi*. Nevertheless, there are no vaccines for *S. Infantis* having increased rate in Turkey. Therefore, it was aimed to generate *aroA* gene region deleted mutant recombinant bacteria for the constitution of *S. Infantis* vaccine prototype and the *in-vitro* charecterisation of this mutant bacterium, in this PhD thesis.

In this content, for the first time in the world *S. Infantis* oxotrophic mutant has been constituted and it was determined that this mutant bacterium get suscepibility against some antibiotics and antimicrobial substances. In addition, it was observed that the adhesion and invasion rate of mutant strain tenfold decreased in comparison with the field strain in cell culture assay.

It can be concluded that within the frame of *Salmonella* Control Programmes the use of recombinant DNA technology for the vaccine prototype development against the serotypes frequently isolated from the different regions of Turkey is recommended.

Key Words: *aroA* gene, auxotrophic mutant, recombinant vaccine, *Salmonella* Infantis

KAYNAKLAR

- ANTUNES P, MOURAO J, CAMPOS J, PEIXE L (2016). Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clin Microbiol Infect*, **22**(2): 110-121.
- BAR-TANA J, HOWLETT BJ, HERTZ R (1980). Ubiquinone synthetic pathway in flagellation of *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol*, **143**(2): 637-643.
- BARROW PA (2007). *Salmonella* infections: immune and non-immune protection with vaccines. *Avian Pathol*, **36**(1): 1-13.
- BARROW PAJ, M. A.; THOMSON, N. (2010) *Pathogenesis of bacterial infections in Animals*, 4th edn; Ames, United States: Iowa State University Press.
- CARLTON BC, BROWN BJ (1981) *Gene Mutation in Manual of Methods for General Bacteriology*, Washington, DC: American Society for Microbiology.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2013). Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. Eriřim adresi: [<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>]. Eriřim tarihi: 19/08/2017.
- CHAPPELL L, KAISER P, BARROW P, JONES MA, JOHNSTON C, WIGLEY P (2009). The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Vet Immunol Immunopathol*, **128**(1-3): 53-59.
- COOPER GL, VENABLES LM, WOODWARD MJ, HORMAECHE CE (1994a). Invasiveness and Persistence of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, and a Genetically Defined *Salmonella*-Enteritidis Aroa Strain in Young Chickens. *Infect Immun*, **62**(11): 4739-4746.
- COOPER GL, VENABLES LM, WOODWARD MJ, HORMAECHE CE (1994b). Vaccination of chickens with strain CVL30, a genetically defined *Salmonella* enteritidis aroA live oral vaccine candidate. *Infect Immun*, **62**(11): 4747-4754.
- DESIN TS, KOSTER W, POTTER AA (2013). *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. *Expert Rev Vaccines*, **12**(1): 87-96.
- DOGGETT TA, CURTISS R (1992). Delivery of Antigens by Recombinant Avirulent *Salmonella* Strains. *Adv Exp Med Biol*, **327**: 165-173.
- EFSA (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, **14**(12): 4634.

- EUCAST (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*, **20**: 0255-266.
- EVEREST P, KETLEY J, HARDY S, DOUCE G, KHAN S, SHEA J, HOLDEN D, MASKELL D, DOUGAN G (1999). Evaluation of *Salmonella* Typhimurium mutants in a model of experimental gastroenteritis. *Infect Immun*, **67**(6): 2815-2821.
- FEASEY NA, DOUGAN G, KINGSLEY RA, HEYDERMAN RS, GORDON MA (2012). Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet*, **379**(9835): 2489-2499.
- FELGNER S, FRAHM M, KOCIJANCIC D, ROHDE M, ECKWEILER D, BIELECKA A, BUENO E, CAVA F, ABRAHAM WR, CURTISS R, HAUSSLER S, ERHARDT M, WEISS S (2016). *aroA*-Deficient *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Is More Than a Metabolically Attenuated Mutant. *Mbio*, **7**(5).
- FOLEY SL, NAYAK R, HANNING IB, JOHNSON TJ, HAN J, RICKE SC (2011). Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. *Appl Environ Microbiol*, **77**(13): 4273-4279.
- GAMAZO C (2007). *Salmonella* Vaccines. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, A.Mendez-Vilas, p.:518-524.
- GARSDIE LH, COLLINS M, LANGFORD PR, RYCROFT AN (2002). *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 carrying the defined *aroA* mutation is fully avirulent in the pig. *Res Vet Sci*, **72**(2): 163-167.
- GAST RK (2007). Serotype-specific and serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. *Avian Dis*, **51**(4): 817-828.
- GIANNASCA KT, GIANNASCA PJ, NEUTRA MR (1996). Adherence of *Salmonella* Typhimurium to Caco-2 cells: identification of a glycoconjugate receptor. *Infect Immun*, **64**(1): 135-145.
- GUIBOURDENCHE M, ROGGENTIN P, MIKOLEIT M, FIELDS PI, BOCKEMUHL J, GRIMONT PAD, WEILL FX (2010). Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol*, **161**(1): 26-29.
- HAYGREEN L, DAVISON F, KAISER P (2005). DNA vaccines for poultry: the jump from theory to practice. *Expert Rev Vaccines*, **4**(1): 51-62.
- HEGAZY WAH, HENSEL M (2012). *Salmonella enterica* as a vaccine carrier. *Future Microbiol*, **7**(1): 111-127.
- HERTZ R, BAR-TANA J (1977). Anaerobic electron transport in anaerobic flagellum formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **132**(3): 1034-1035.

- HOISETH SK, STOCKER BAD (1981). Aromatic-Dependent *Salmonella* Typhimurium Are Non-Virulent and Effective as Live Vaccines. *Nature*, **291**(5812): 238-239.
- HU C, JIANG P, XU J, WU Y, HUANG W (2003). Mutation analysis of the feedback inhibition site of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J Basic Microbiol*, **43**(5): 399-406.
- KABIR SML (2010). Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. *Int J Environ Res Public Health*, **7**(1): 89-114.
- KWON YM, COX MM, CALHOUN LN (2007). *Salmonella*-based vaccines for infectious diseases. *Expert Rev Vaccines*, **6**(2): 147-152.
- LIU F, CAO YP (2015). Cloning and characterization of 5-enopyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Pantoea* sp. *Genet Mol Res*, **14**(4): 19233-19241.
- MAJOWICZ SE, MUSTO J, SCALLAN E, ANGULO FJ, KIRK M, O'BRIEN SJ, JONES TF, FAZIL A, HOEKSTRA RM, INTERNATIONAL COLLABORATION ON ENTERIC DISEASE 'BURDEN OF ILLNESS S (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis*, **50**(6): 882-889.
- McARTHUR JD, WEST NP, COLE JN, JUNGNITZ H, GUZMAN CA, CHIN J, LEHRBACH PR, DJORDJEVIC SP, WALKER MJ (2003). An aromatic amino acid auxotrophic mutant of *Bordetella bronchiseptica* is attenuated and immunogenic in a mouse model of infection. *FEMS Microbiol Lett*, **221**(1): 7-16.
- METHNER U, HAASE A, BERNDT A, MARTIN G, NAGY B, BARROW PA (2011). Exploitation of Intestinal Colonization-Inhibition Between *Salmonella* Organisms for Live Vaccines in Poultry - Potential and Limitations. *Zoonoses Public Health*, **58**(8): 540-548.
- MILLER TP, R.; RABSCH, W.; FEHLHABER, K.; VOSS, M. (2010). Epidemiological relationship between *Salmonella* Infantis isolates of human and broiler origin. *Lohmann Information*, **45**(2): 27.
- MUTWIRI G, GERDTS V, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, AURAY G, ENG N, GARLAPATI S, BABIUK LA, POTTER A (2011). Combination adjuvants: the next generation of adjuvants? *Expert Rev Vaccines*, **10**(1): 95-107.
- NAGARAJAN AG, BALASUNDARAM SV, JANICE J, KARNAM G, ESWARAPPA SM, CHAKRAVORTTY D (2009). *sopB* of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is a potential DNA vaccine candidate in conjugation with live attenuated bacteria. *Vaccine*, **27**(21): 2804-2811.
- OCALLAGHAN D, MASKELL D, LIEW FY, EASMON CSF, DOUGAN G (1988). Characterization of Aromatic-Dependent and Purine-Dependent *Salmonella*

Typhimurium - Attenuation, Persistence, and Ability to Induce Protective Immunity in Balb/C Mice. *Infect Immun*, **56**(2): 419-423.

OLASZ F, NAGY T, SZABO M, KISS J, SZMOLKA A, BARTA E, VAN TONDER A, THOMSON N, BARROW P, NAGY B (2015). Genome Sequences of Three *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis Strains from Healthy Broiler Chicks in Hungary and in the United Kingdom. *Genome Announc*, **3**(1).

PRIBAT A, NOIRIEL A, MORSE AM, DAVIS JM, FOUQUET R, LOIZEAU K, RAVANEL S, FRANK W, HAAS R, RESKI R, BEDAIR M, SUMNER LW, HANSON AD (2010). Nonflowering Plants Possess a Unique Folate-Dependent Phenylalanine Hydroxylase That Is Localized in Chloroplasts. *Plant Cell*, **22**(10): 3410-3422.

ROBERTSSON JA, LINDBERG AA, HOISETH S, STOCKER BAD (1983). *Salmonella* Typhimurium Infection in Calves - Protection and Survival of Virulent Challenge Bacteria after Immunization with Live or Inactivated Vaccines. *Infect Immun*, **41**(2): 742-750.

RUBY T, MCLAUGHLIN L, GOPINATH S, MONACK D (2012). *Salmonella's* long-term relationship with its host. *FEMS Microbiol Rev*, **36**(3): 600-615.

SAADE F, PETROVSKY N (2012). Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines*, **11**(2): 189-209.

SALEHI S, HOWE K, LAWRENCE ML, BROOKS JP, BAILEY RH, KARSI A (2017). *Salmonella enterica* serovar Kentucky Flagella Are Required for Broiler Skin Adhesion and Caco-2 Cell Invasion. *Appl Environ Microbiol*, **83**(2).

SAMBROOK J, RUSSELL DW (2001) *Molecular Cloning*, Chapter 3, Third edn; Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SEBKOVA A, KARASOVA D, CRHANOVA M, BUDINSKA E, RYCHLIK I (2008). *aro* mutations in *Salmonella enterica* cause defects in cell wall and outer membrane integrity. *J Bacteriol*, **190**(9): 3155-3160.

SMITH CL, POWELL KR (2000). Review of the sulfonamides and trimethoprim. *Pediatr Rev*, **21**(11): 368-371.

TACKET CO, SZTEIN MB, LOSONSKY GA, WASSERMAN SS, NATARO JP, EDELMAN R, PICKARD D, DOUGAN G, CHATFIELD SN, LEVINE MM (1997). 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.

TACKET CO, SZTEIN MB, WASSERMAN SS, LOSONSKY G, KOTLOFF KL, WYANT TL, NATARO JP, EDELMAN R, PERRY J, BEDFORD P, BROWN D, CHATFIELD S, DOUGAN G, LEVINE MM (2000). Phase 2 clinical trial of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi oral live vector vaccine CVD 908-htrA in U.S. volunteers. *Infect Immun*, **68**(3): 1196-1201.

- TAN S, GYLES CL, WILKIE BN (1997). Evaluation of an *aroA* mutant *Salmonella* Typhimurium vaccine in chickens using modified semisolid Rappaport Vassiliadis medium to monitor faecal shedding. *Vet Microbiol*, **54**(3-4): 247-254.
- TITSLER RP, SANDHOLZER LA (1936). The Use of Semi-solid Agar for the Detection of Bacterial Motility. *J Bacteriol*, **31**(6): 575-580.
- TOYOTA-HANATANI Y, KYOUMOTO Y, BABA E, EKAWA T, OHTA H, TANI H, SASAI K (2009). Importance of subunit vaccine antigen of major Fli C antigenic site of *Salmonella* Enteritidis II: a challenge trial. *Vaccine*, **27**(11): 1680-1684.
- VAN IMMERSEEL F, METHNER U, RYCHLIK I, NAGY B, VELGE P, MARTIN G, FOSTER N, DUCATELLE R, BARROW PA (2005). Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. *Epidemiol Infect*, **133**(6): 959-978.
- WALES AD, DAVIES RH (2011). A critical review of *Salmonella* Typhimurium infection in laying hens. *Avian Pathol*, **40**(5): 429-436.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı: İnci Başak

Soyadı: KAYA

Doğum yeri ve tarihi: Eskişehir/ 1989

Uyruğu: TC

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: ibkaya@ankara.edu.tr/ 533 448 42 05

II-Eğitimi

Doktora: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA 2012-2017

Staj: Frei Universität Klinik für Kleine Haustiere, Berlin ALMANYA 2013; Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Berlin ALMANYA 2013

Lisans: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, ANKARA 2007-2012

Lise: Çiğli Milli Piyango Anadolu Lisesi, İZMİR 2003-2007

Yabancı Dili: İngilizce, Almanca

III- Ünvanları

Araştırma Görevlisi

Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

- Frei Universitat Klinik für Kleine Haustiere, Berlin ALMANYA
2013- Stajyer
- Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Berlin ALMANYA
2013- Stajyer
- Başak Veteriner Kliniği, İZMİR 2011- stajyer

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti

Veteriner Hekimler Derneği

Veteriner Tavukçuluk Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yerel Hakemli Dergideki Yayınlar

MÜŞTAK HK, TORUN E, **KAYA İB**, ERGÜVEN KAYA E, DİKER Ş, ANADOL E, GÜNAYDIN E (2013). Wistar ırkı ratlardan izole edilen Escherichia coli'lerin filogenetik analizi. Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 24, 60-63.

KAYA İB, YARDIMCI H (2014). Quorum sensing. Etlik Vet. Mikrobiyol Derg, 25 (1): 25-31.

OMEROVİC M, MÜŞTAK HK, **KAYA İB** (2017). Escherichia coli Patotiplerinin Virülens Faktörleri. Etlik Vet. Mikrobiyol Derg, 28(1): 1-6.

Poster-Tebliğler

MÜŞTAK HK, TORUN E, **KAYA İB**, ERGÜVEN KAYA E, DİKER Ş, ANADOL E, GÜNAYDIN E. Wistar ırkı ratlardan izole edilen Escherichia coli'lerin filogenetik analizi. Laboratuvar Hayvanları Bilimi 3. Ulusal kongresi (Uluslararası Katılımlı) 26- 28 Eylül 2013, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

MUSTAK HK, **KAYA I**, OZDAL M, BILGEN N, HASCELİK G, DIKER K. Phylo-typing of Escherichia coli isolated from blood samples. 114th American Society for Microbiology General Meeting. 17-20 May 2014, Boston, Massachusetts, ABD.

MÜŞTAK HK, **KAYA İ**, ÖZDAL M, BİLGEN N, HASÇELİK G, DİKER KS. Kan Kültürlerinden İzole Edilen Escherichia coli Suşlarının Filo-Gruplandırılması. 8'inci Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 4-7 Haziran 2014, Swiss Otel, Ankara.

KAYA İB, KARACAN N, ÖZDAL M, METE Ş, DİKER KS. Veteriner klinik Örneklerde Direkt 16S rRNA Dizi Analizi ile Bakteriyel Tanı. 8'inci Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 4-7 Haziran 2014, Swiss Otel, Ankara.

MÜŞTAK HK, GÜNAYDIN E, **KAYA İB**, TORUN E, ÖNAT K, ATA Z, BABACAN O, DİKER KS. Üropatojenik ve meme patojenik Escherichia

coli'lerin filogruplandırılması. 11. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 21-24 Ekim 2014, Akka Antedon Otel, Kemer, Antalya.

KAYA İB, ŞAHAN Ö, DİKER KS. Farklı Sıcaklıkların Salmonella Enteritidis'in Üreme Eğrisi Üzerine Etkisi. 11. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 21-24 Ekim 2014, Akka Antedon Otel, Kemer, Antalya.

DİKER KS, **KAYA İB**, ELİBOL O, AKAN M. Gelişme Geriliği ile İlişkili Broiler Sekum Mikrobiyomunun Metagenomik Analizi. 12. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 30 Ağustos- 2 Eylül 2016, Kapadokya, Nevşehir.

KAYA İB, SARIÇAM S, ÖZEN D, DİKER KS. Bazı Salmonella Serotiplerinin Üremesi üzerine Farklı Sıcaklık Değerlerinin Etkisi. 12. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 30 Ağustos- 2 Eylül 2016, Kapadokya, Nevşehir.

KAYA İB, DİVANOĞLU Y, AKAN M, DİKER KS. Tavuk Sekum Mikrobiyomunun Metagenomik Analizinde 16S rDNA Bölgelerinin ve Duyarlılık Düzeyinin Karşılaştırılması. 12. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 30 Ağustos- 2 Eylül 2016, Kapadokya, Nevşehir.

KAYA İB, AKAN M. Türkiye'de Broiler Damızlıklarda İnfeksiyöz Laringotraheitis'in İlk Bildirimi. 12. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 30 Ağustos- 2 Eylül 2016, Kapadokya, Nevşehir.

SARIÇAM S, **KAYA İB**, MÜŞTAK HK. Fungal Teşhiste rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgeleri Dizi Analizinin Kullanılması. 12. Veteriner Hekimleri

Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 30 Ağustos- 2 Eylül 2016, Kapadokya, Nevşehir.

KUTLU T, YÜCEL G, **KAYA İB**, MÜŞTAK HK, KUTSAL O. Concomitant Breast Tuberculosis and Malignant Mixed Tumor in a Dog. European Veterinary Conference Voorjaarsdagen. 19-21 April, 2017. Fokker Terminal- The Hague, The Netherlands.

AKDOGAN KİTTANA F, **KAYA I**, HASCELİK AG, SARIÇAM S, GÜRLER N, DİKER K. Erythromycin Resistant Streptococcus pneumoniae: Phenotypes, Genotypes, Transposons and Coverage Rates for Pneumococcal Vaccines. American Society for Microbiology General Meeting. 1-5 June 2017, New Orleans, Los Angeles, ABD.

KAYA İB, DİVANOĞLU Y, AKAN M, DİKER KS. Tavuk Sekum Mikrobiyomunun Metagenomik Analizinde 16s rDNA Bölgelerinin ve Duyarlılık Düzeyinin Karşılaştırılması. 4. Uluslararası Beyaz Et Kongresi. 26-30 Nisan, 2017. Belek, Antalya.

DİKER KS, **KAYA İB**, TORUN E, AKAN M. Ticari Broiler ve Free-range Tavuklarda Bağırsak Mikrobiyomunun Karşılaştırılması. 4. Uluslararası Beyaz Et Kongresi. 26-30 Nisan, 2017. Belek, Antalya.

AKDOGAN KİTTANA F, **KAYA İB**, HASCELİK G, SARIÇAM S, GÜRLER N, DİKER KS. Serotype Distribution in Transposon Carrying Multi-drug Resistant Streptococcus Pneumoniae among Invasive and Non-invasive Isolates. The 7th Congress of European Microbiologists (FEMS). 9-13 July 2017. Valencia, Spain.

SCI kapsamındaki Yayınlar

MÜŞTAK HK, GÜNAYDIN E, **KAYA İB**, TORUN E, ÖNAT K, ATA Z, BABACAN O, DİKER KS. Phylo- typing of Clinical Escherichia coli Isolates Originating from Bovine Mastitis and Canine Pyometra and Urinary Tract Infection by means of Quadruplex PCR (2015). Veterinary Quarterly doi: 10.1080/01652176.2015.1068963

KAYA İB, ŞAHAN YAPICIER Ö, AKAN M, DİKER KS. Class 1 Integrons and the Antibiotic Resistance Profile of Salmonella Infantis Strains from Broiler Chickens. Kafkas Univ Vet Fak Derg (2017) doi: 10.9775/kvfd.2017.17821

Sözlü sunumlar

İnci Başak Kaya, Özlem Şahan, Mehmet Akan, K. Serdar Diker. Çoklu Antibiyotik Dirençli Salmonella Infantis Suşlarında Sınıf I İntegron Varlığı. 3. Uluslararası Beyaz Et Kongresi 22-26 Nisan 2015, Starlight Convention Center & Sunrise Park Resort Otel, Antalya.

K. Serdar Diker, **İnci Başak Kaya**. Kanatlılarda Mikrobiyom ve Hastalık İlişkisi. 3. Uluslararası Beyaz Et Kongresi 22-26 Nisan 2015, Starlight Convention Center & Sunrise Park Resort Otel, Antalya.

İnci Başak Kaya. At Hastalıklarında Kullanılan Hızlı Tanı Yöntemleri, Veteriner At bilimleri öğrenci Bilgilendirme Semineri 24.02- 27.02.2016, Ankara.

Fatma Nur Akdoğan Kittana, **İnci Başak Kaya**, Gülşen Hasçelik, Seyyide Sarıçam, Nezahat Gürler, Kadir Serdar Diker. Eritromisin Dirençli Streptococcus Pneumoniae Suşlarının Direnç Profili: Serotip Dağılımı,

Transpozon ve Direnç Genleri. XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 16- 20 Kasım 2016, Titanic Deluxe Otel, Antalya.

Mehmet Akan, **İnci Başak Kaya**, Seyyide Sarıçam, K. Serdar Diker. Erken civciv ölümleri ile ilişkili bağırsak mikrobiyomunun metagenomik analizi. 4. Uluslararası Beyaz Et Kongresi 26-30 Nisan 2017, Kaya Plazzo Golf Resort & Kaya Belek, Antalya.

İnci Başak Kaya, K. Serdar Diker, Okan Elibol, Mehmet Akan. Gelişme geriliği ile ilişkili broiler sekum mikrobiyomunun metagenomik analizi. 4. Uluslararası Beyaz Et Kongresi 26-30 Nisan 2017, Kaya Plazzo Golf Resort & Kaya Belek, Antalya.

Diğer Dergiler

İnci Başak Kaya. Ekstraintestinal Salmonella Patogenezi. (2015) Mektup Ankara Derg. Cilt:13 Sayı: 3 ISSN: 1309 7296

İnci Başak Kaya. İnfeksiyöz Bronşitis (2016) Mektup Ankara Derg. Cilt:14 Sayı: 2 ISSN: 1309 7296

VI- Bilimsel Etkinlikleri

Yer Aldığı Projeler

Mikrobiyom Hastalık İlişkisinin Nekrotik Enterit Modelinde Araştırılması- BAP (Yardımcı Araştırmacı)

Kanatlıların *Salmonella* Enfeksiyonunu Engelleyen Bağırsak Mikrobiyomunun Metagenomik Analiz ile Belirlenmesi: Antibiyotiklere Alternatif Bir Yaklaşım- TAGEM (Yardımcı Araştırmacı)

aroA Defektif Mutant *Salmonella* Infantis Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu- BAP (Yardımcı Araştırıcı)

Seminerler

Quorum Sensing

Ekstraintestinal *Salmonella* Patogenezi

VII- Diğer Bilgiler

Mektup Ankara Dergisi Editör Yardımcılığı