



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TAVUK DIŞKILARI VE ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN
SALMONELLA INFANTIS FAJLARININ İZOLASYONU
VE KARAKTERİZASYONU**

Ebru TORUN

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK**

**ANKARA
2018**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TAVUK DIŞKILARI VE ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN
SALMONELLA INFANTIS FAJLARININ İZOLASYONU
VE KARAKTERİZASYONU**

Ebru TORUN

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK**

ANKARA

2018

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Tavuk Dışkıları ve Çevresel Örneklerden *Salmonella* Infantis Fajlarının İzolasyonu 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: Ebru TORUN

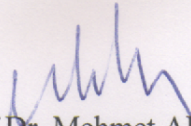
Tarih: 26.10.2018

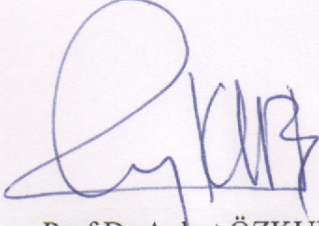
İmza:

KABUL VE ONAY

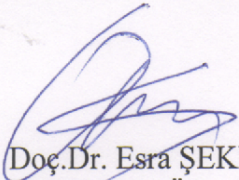
Mikrobiyoloji Anabilim Dalında
Ebru TORUN tarafından hazırlanan “Tavuk Dışkıları Ve Çevresel Örneklerden *Salmonella*
Infantis Fajlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri
tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

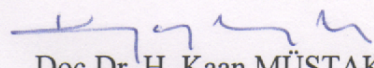
Tez Savunma Tarihi: 26/10/2018


Prof.Dr. Mehmet AKAN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

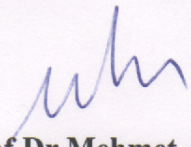

Prof.Dr.Aykut ÖZKUL
Ankara Üniversitesi
Üye


Prof.Dr. Murat YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi
Üye


Doç.Dr. Esra ŞEKER
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Raportör


Doç.Dr. H. Kaan MÜŞTAK
Ankara Üniversitesi
Üye

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


Prof.Dr.Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	i
Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
2. GEREÇ VE YÖNTEM	10
2.1. GEREÇ	10
2.1.1. Bakteri Suşları	10
2.1.2. Kontrol Fajı	10
2.1.3. Bakteriyofaj İzolasyon Materyali	11
2.1.4. Besiyerleri	11
2.1.4.1. Çift Katlı (Double-Strength) Broth	11
2.1.4.2. Dip Agar	12
2.1.4.2. Top Agar	12
2.1.5. Solüsyonlar	12
2.1.5.1. CaCl ₂ Solüsyonu	12
2.1.5.2. Jelatin Solüsyonu	13
2.1.5.3. Tris-HCl Solüsyonu	13
2.1.5.4. Saline-Magnesium (SM) Solüsyonu	13
2.1.5.5. MgSO ₄ Solüsyonu	14
2.1.5.6. Mitomisin C (MC)	14

2.2. YÖNTEM	15
2.2.1. Faj İzolasyonunda Kullanılacak <i>S. Infantis</i> Suşlarında Lizojenitenin Saptanması	15
2.2.2. Virulent (Litik) Bakteriyofaj İzolasyonu	15
2.2.3. Fajların Çoğaltılması ve İdamesi	16
2.2.4. Rutin Test Dilüsyonunun Belirlenmesi	17
2.2.5. Fajların Litik Spektrumlarının ve Litik Profillerinin Belirlenmesi	18
2.2.6. Fajların Genotipik Karakterizasyonu	18
2.2.6.1. Faj DNA İzolasyonu	18
2.2.6.2. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PCR Analizi	20
2.2.7. Faj-Bakteri Dinamikleri	21
2.2.7.1. Minimal Faj ve Minimal Bakteri Sayısının Belirlenmesi	21
2.2.7.2. Faj Adsorbsiyon Oranının Belirlenmesi	22
2.2.7.3. Latent Sürenin Belirlenmesi	22
2.2.8. Deneysel Çalışmalar	22
2.2.8.1. Faj Etkinliğinin Saptanması	23
2.2.8.1.1. Su Materyallerindeki Faj Etkinliği	23
2.2.8.1.2. Altlık Materyallerindeki Faj Etkinliği	24
2.2.8.1.3. Yem Materyallerindeki Faj Etkinliği	24
2.2.8.2. Fajın Yaşam Süresinin Saptanması	25
2.2.8.2.1. Su Materyallerindeki Faj Yaşam Süresi	25
2.2.8.2.2. Altlık Materyallerindeki Faj Yaşam Süresi	26
2.2.8.2.3. Yem Materyallerindeki Faj Yaşam Süresi	26
2.2.8.3. Faj Saklama Süresinin Saptanması	26
2.2.9. İstatistiksel Analiz	27
3. BULGULAR	28
3.1. Faj İzolasyonunda Kullanılacak <i>S. Infantis</i> Suşlarında Lizojenite Bulguları	28

3.2. Virü lent (Litik) Bakteriyofaj İzolasyonu Bulguları	28
3.3. Rutin Test Dilü syonu Bulguları	29
3.4. Fajların Litik Spektrumlarının ve Litik Profillerinin Belirlenmesi Bulguları	30
3.5. RAPD-PCR Analizi Bulguları	32
3.6. Faj-Bakteri Dinamikleri Bulguları	32
3.6.1. Minimal Faj ve Minimal Bakteri Sayısı Bulguları	33
3.6.2. Faj Adsorbsiyon Oranı Bulguları	33
3.6.3. Latent Süre Bulguları	34
3.7. Deneysel Çalışma Bulguları	35
3.7.1. Fajların Etkinliğinin Saptanması Bulguları	35
3.7.1.1. Fajların Su Materyallerindeki Etkinliği Bulguları	35
3.7.1.2 Fajların Altlık Materyallerindeki Etkinliği Bulguları	37
3.7.1.3. Fajların Yem Materyallerindeki Etkinliği Bulguları	38
3.7.2. Fajların Yaşam Süresinin Saptanması Bulguları	40
3.7.2.1. Fajların Su Materyallerindeki Yaşam Süresi Bulguları	40
3.7.2.2. Fajların Altlık Materyallerindeki Yaşam Süresi Bulguları	41
3.7.2.3. Fajların Yem Materyallerindeki Yaşam Süresi Bulguları	42
3.7.3. Fajların Saklama Süresinin Saptanması Bulguları	43
4. TARTIŞMA	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
ÖZET	64
SUMMARY	62
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	69

ÖNSÖZ

Salmonella infeksiyonları tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de kanatlı hayvan yetiştiriciliğinin en önemli problemlerinden birisidir ve kanatlı hayvanlarda, verim düşüklüklerine, önemli hastalık tablolarına ve ölüme neden olan zoonoz bir enfeksiyondur. İnsanlarda gıda kaynaklı enfeksiyonlar arasında oldukça önemli olan *Salmonella* infeksiyonları için kanatlı hayvanlar, en önemli bulaşma kaynağıdır. İnsanlarda ağırlıklı olarak *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium serotiplerinin izole edilmesi, kanatlılarda da bu iki serotipe yoğunlaşılmasına neden olmuştur. Bununla beraber, özellikle *Salmonella* Infantis halen en yaygın dördüncü serotip olarak önemini korumaktadır. Türkiye’de ise yapılan çeşitli çalışmalar da en sık izolasyonu yapılan serotipin *S. Infantis* olduğu bildirilmiştir.

Özellikle *Salmonella*’larda artan antimikrobiyal direnç, bu enfeksiyonun önlenmesi ve kontrol edilmesinde alternatif tedavilere ilginin artmasına sebep olmuştur. Bakteriyofajların insanlarda tedavi amaçla kullanımı uzun yıllardan beri bilinmektedir. Bakteriyofajlar bakterileri enfekte eden ve öldüren viruslardır ve konak spesifitelerinden dolayı, diğer mikrobik popülasyonları etkilemezler.

Bu tez çalışmasında, Türkiye’de en çok izole edilen kanatlı *Salmonella* serotipi olan *S. Infantis*’in bakteriyofajları izole edildi ve bu fajların konak spektrumu belirlendi. Ayrıca çalışmada izolasyonu yapılan ve konak aralığı belirlenen bu fajların etki, yaşam ve saklama süreleri saptandı.

Doktora öğrenimin süresince büyük desteğini gördüğün tez danışmanım Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK’a, eğitimim ve tez aşamasında katkılarından dolayı başta Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hakan YARDIMCI olmak üzere, değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Müjgan İZGÜR, Prof. Dr. Mehmet AKAN, Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU’na, her konuda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Aykut ÖZKUL’a ve Prof. Dr. İ. Safa GÜRCAN’a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ndaki çalışma arkadaşlarıma ve babam Selahattin YAVRUCU, annem Şehri YAVRUCU ve değerli eşim Yasin TORUN’a teşekkürlerimi borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
EFSA	European Food Safety Authority
g	Gram
ISO	İnternational Organization for Standardization
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
cfu	Koloni Oluşturma Birimi
LB	Luria Bertani Broth
log ₁₀	Logaritma 10
Mg.SO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum Sülfat Heptahidrat
M	Molar
MC	Mitomisin C
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
nm	Nanometre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pfu	Plak Oluşturma Birimi
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RNA	Ribonükleik asit

rpm	Rounds Per Minute
RTD	Rutin Test Dilüsyonu
SM	Saline-Magnesium
°C	Santigrad derece
NaCl	Sodyum Klorür
WHO	Dünya Sağlık Örgütü



ŞEKİLLER

Şekil 3.1. Spot test ile belirlenen litik faj aktivitesi A) altlık materyalinde, B) atık su materyalinde.	28
Şekil 3.2. Agar-overlay yöntemi ile görülen faj plakları.	29
Şekil 3.3. S. Infantis fajlarının litik spektrumunun ve profillerinin belirlenmesinde kullanılan spot test sonuçları.	31
Şekil 3.4. S. Infantis fajlarının zamana bağlı (dakika) adsorbsiyon eğrileri.	34
Şekil 3.5. Deneysel yolla S. Infantis inokule edilen sularda SF-In7 ve SF-In20 fajlarının zaman içindeki (saat) etki eğrileri.	36
Şekil 3.6. Deneysel yolla S. Infantis inokule edilen sularda SF-In7 ve SF-In20 fajlarının zaman içindeki (saat) titre eğrileri.	36
Şekil 3.7. Deneysel yolla S. Infantis inokule edilen altlıkta SF-In7 ve SF-In20 fajlarının zaman içindeki (saat) etki eğrileri.	37
Şekil 3.8. Deneysel yolla S. Infantis inokule edilen altlıkta SF-In7 ve SF-In20 fajlarının zaman içindeki (saat) titre eğrileri.	38
Şekil 3.9. Deneysel yolla S. Infantis inokule edilen yemde SF-In7 ve SF-In20 fajlarının zaman içindeki (saat) etki eğrileri.	39
Şekil 3.10. Deneysel yolla S. Infantis inokule edilen yemde SF-In7 ve SF-In20 fajlarının zaman içindeki (saat) titre eğrileri.	39
Şekil 3.11. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının su materyalinde zaman içindeki (gün) titre eğrileri.	41
Şekil 3.12. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının altlık materyalinde zaman içindeki (gün) titre eğrileri.	42
Şekil 3.13. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının yem materyalinde zaman içindeki (gün) titre eğrileri.	43
Şekil 3.14. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının oda ısısında zaman içindeki (hafta) titre eğrileri.	44

Şekil 3.15. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının +4°C’de zaman içindeki (ay) titre eğrileri.	45
Şekil 3.16. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının -20°C’de zaman içindeki (ay) titre eğrileri.	46
Şekil 3.17. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının -80°C’de zaman içindeki (ay) titre eğrileri.	47



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. RAPD-PCR için kullanılan bileşenler, konsantrasyonları ve hacimleri.	20
Çizelge 2.2. RAPD-PCR sıcaklık ve döngü koşulları.	20
Çizelge 3.1. Kaynağına göre izole edilen toplam faj sayısı.	29
Çizelge 3.2. RTD değerleri 10^5 üzerinde olan <i>S. Infantis</i> fajlarının listesi.	30
Çizelge 3.3. 21 adet <i>S. Infantis</i> fajının kaynak, litik spektrumu ve litik profil verileri.	31
Çizelge 3.4. <i>S. Infantis</i> faj enfeksiyonu için gerekli minimal faj-bakteri sayıları.	33
Çizelge 3.5. <i>S. Infantis</i> fajlarının zamana bağlı adsorbsiyon oranları.	34

1. GİRİŞ

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de kanatlı hayvan yetiştiriciliğinin en önemli problemlerinden birisi *Salmonella* enfeksiyonlarıdır (Aksakal, 2003). *Salmonella* enfeksiyonları kanatlı hayvanlarda, verim düşüklüklerine, önemli hastalık tablolarına ve ölüme neden olan zoonoz bir enfeksiyondur. Ayrıca insanlarda gıda kaynaklı enfeksiyonlar arasına oldukça önemli olan *Salmonella* enfeksiyonları için kanatlı hayvanlar, en önemli bulaşma kaynağıdır. Bundan dolayı bu bakterilerin tavuklardaki varlığı kanatlı yetiştiriciliğinden halk sağlığına kadar birçok alanı ve sektörü direkt etkilemektedir. Kanatlı hayvanlarda *Salmonella* enfeksiyonlarının kontrolü ve hastalık nedenli kayıpların önlenmesi için etkili bir kontrol programı gerekmektedir. Bu sebeple bu enfeksiyonların özellikle kanatlı üretiminde önlenmesi için kontrol programları uygulanmaya başlanmıştır. *Salmonella* kontrol programlarının başlatılması ile bu enfeksiyonların sürekli izlenmesi, teşhiste ve kontrolde alternatif uygulamalarının geliştirilmesi önem kazanmıştır (Akan, 2008; İzgür, 2002; İzgür, 2006; Quin ve ark., 1999 ve Sengül ve Türkyılmaz, 2007).

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Salmonella*’lar, Gram negatif, kısa ve küçük çomaklar olup, bu familyanın genel özelliklerini taşırlar. Genellikle laboratuvar besi yerlerinde kolaylıkla üreyebilen bu bakteriler sporsuz, kapsülsüz, *Salmonella Pullorum* ve *Salmonella Gallinarum* hariç hareketli (peritrik flagellaya sahip), biyokimyasal aktiviteleri yüksek, H₂S oluşturabilen ve laktozu fermente edemeyen bakterilerdir. *Salmonella*’lar geniş üreme sıcaklığında üreme kabiliyetinde olup optimal üreme sıcaklıkları 35-37°C arasındadır (İzgür, 2002 ve İzgür, 2006).

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Salmonella* genusu içerisinde son sınıflandırmaya göre *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki tür bulunmaktadır. *Salmonella enterica* türü içinde ise yedi alt tür bulunmaktadır. Bu gruplar *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp.

houtenae (IV), *S. enterica* subsp. *bongori* (V), *S. enterica* subsp. *indica* (VI)'dır. Kanatlı hayvanlarda hastalık oluşturan ve bunlardan izole edilen *Salmonella*'ların birçoğu *S. enterica* subsp. *enterica* (I) alt grubundadır ve bu alt grupta birçok serotip bulunmaktadır. *Salmonella* genusu üyeleri, sahip oldukları polisakkarit yapıdaki 'O' somatik, protein yapıdaki flagellar 'H' ve yüzeysel antijenlerinin farklılıklara göre serotiplere ayrılmışlardır (Izgür, 2002 ve Izgür, 2006). Yayımlanan son raporda *Salmonella* genusu içerisinde 2610 serotip olduğu bildirilmiştir. Bu serotiplerin 2587'si *S. enterica* içerisinde 23'ü ise *S. bongori* içerisinde yer almaktadır (Guibourdenche ve ark., 2010).

Kanatlılarda enfeksiyona neden olan *Salmonella* serotipleri konak spesifik ve konak spesifik olmayanlar olmak üzere iki temel bölümde incelenir. Konak spesifik serotipler, *S. Paratyphi* ve *S. Typhi* (insanlarda), *S. Gallinarum*/*S. Pullorum* (kanatlı hayvanlarda), *S. Dublin* (sığırlarda), *S. Choleradis* (domuzlarda), *S. Abortusequi* (atlarda) ve *S. Abortusovis* (koyunlarda) serotipleridir. Konak spesifik olmayan *Salmonella* serotipleri arasında yer alanlara örnek olarak *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Virchow*, *S. Hadar*, *S. Agona*, *S. Thompson* sayılabilir (Akan, 2008). Genellikle konak spesifik olmayan *Salmonella* serotipleri kanatlılarda Paratifo enfeksiyonlarına neden olur ve paratifoid etkenler olarak bilinirler. Paratifo enfeksiyonları çok sayıda *Salmonella* serotipi tarafından oluşturulur ve ülkeden ülkeye bu serotiplerin dağılımı farklılık gösterebilmektedir. Kanatlı ürünleri ile bulaşan insan Salmonellozis'in %70'e yakını bu paratifoid etkenlerden ileri gelmektedir. Kanatlı ürünlerine *Salmonella* etkenlerinin bulaşması, kesimhanelerde kanatlı etlerine dışkı-karkas ve yumurtalara ise dışkı-kabuk şeklinde olmaktadır. İnsanlara bulaşmada ise en önemli rolü tavuk eti ve bulaşık yumurta üstlenmektedir (Akan, 2008 ve Izgür, 2002).

Dünya genelinde insanlarda Salmonellozise neden olan ve insan vakalarından izole edilen en yaygın serotipler *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* olarak bilinmektedir. Ancak son yıllarda ülkelerde yürütülen kontrol ve aşılama programları

ile bu serotiplerin sıklığında azalma meydana geldiği ve başta *S. Infantis* olmak üzere diğer serotiplerin sıklığının arttığı bildirilmiştir. Özellikle *S. Infantis* serotipi, 1970'lerden bu yana Finlandiya, Arjantin, Brezilya, Kanada, Macaristan, Japonya, Avusturalya, Brezilya, Hollanda ve Rusya gibi dünyanın birçok ülkesinde rapor edilmiş ve Macaristan ve Japonya'da ise broylerlerde en yaygın serotip olduğu bildirilmiştir (Miller ve ark., 2010).

European Food Safety Authority (EFSA)'nın son raporunda (EFSA, 2017), gıda kaynaklı enfeksiyon vakalarında Salmonellozis ikinci sırada yer almaktadır. Bu raporda insanlarda en yaygın *Salmonella* serotipleri sırasıyla *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, monofazik *S. Typhimurium* ve *S. Infantis* olarak bildirilmiş ve *S. Infantis* dördüncü sırada yer almıştır. EFSA'nın son raporunda, *S. Infantis*'in neden olduğu insan vaka sayısında önceki yıllara kıyasla azalma tespit edildiği bildirilmesinde rağmen *S. Infantis*'in halen önemini koruduğu bildirilmiştir. Bununla beraber raporda son 5 yılda tavuklarda en yaygın görülen serotipin *S. Infantis* (%33,6) olduğu ve bunu *S. Enteritidis* (%15,8) ve *S. Mbandaka* (%6,7)'nin izlediği bildirilmiştir. Ayrıca *S. Infantis*'in çoğunlukla broyler ve hindi üretim zincirlerinden izole edildiği, yüksek düzeyde çoklu ilaç direnci nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunu teşkil ettiği belirtilmiştir (EFSA, 2017). Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise tavuklardan izole edilen en yaygın serotipin *S. Infantis* olduğu bildirilmiştir (Buğdaycı, 2007; Güleşen ve ark., 2015 ve Şahan ve ark., 2012).

Prokaryotların virusları olarak da nitelendirilebilen bakteriyofajlar, bakterileri infekte eden genellikle virus özellikleri taşıyan ajanlardır. Mikrobiyal dengenin düzenlenmesinde kilit rol oynayan fajlar, dünyada en yaygın yaşam formu olarak kabul edilirler (Abedon, 2008 ve Kutter, 2001). Her faj partikülü (virion olarak da adlandırılır), genomun etrafını çevreleyen, protein veya lipoproteinden oluşan ve kapsid olarak adlandırılan bir kılıfa sahiptir. Fajlar, kapsid içerisinde yer alan tek çeşit nükleik asit olmak üzere tek veya çift iplikçikli DNA veya RNA taşır. Kuyruklu veya kuyruksuz, polihedral kapsidli, filamentöz veya pleomorfik yapıda ve genellikle

20 ile 200 nm arası büyüklükte olabilirler (Abedon, 2008; Hyman ve Abedon, 2009a ve Kutter, 2001).

Fajlar spesifik olarak infekte edebildikleri çeşitli bakteriyel konaklara sahiptirler. Konak tipleri, bakteri suşu, türü veya cinsinden, sadece bir bakteriyel serotipe kadar çok çeşitlilik gösterebilir. Her bakteri suşu, yüzeyinde çok fazla sayıda karakteristik protein, karbohidrat ve lipopolisakkarit molekülüne sahiptir. Bu moleküllerin çoğu, fajlar için reseptör rolü oynayabilir. Fajların bakteriyel konak spektrumu, bu reseptörlere bağlıdır (Ripp, 2010). Bu sebeple her bakteriyofaj için hedef hücre belirli bir bakteri grubudur (Kutter, 2001 ve Ripp, 2010).

Fajların konaklarında üremeleri ve enfeksiyon oluşturmaları başlıca dört aşamada gerçekleşir. Bunlar sırasıyla adsorbsiyon, penetrasyon, latent dönem ve son olarak hücre lizisi ve dışarı çıkışıdır (Arda, 2015).

- **Adsorbsiyon:** Konak bakterinin yüzeyindeki spesifik reseptörlere fajın bağlandığı süreci tanımlar (Arda, 2015 ve Skurnik ve Strauch, 2006).
- **Penetrasyon:** Faj genomunun bakteri sitoplazmasına aktarıldığı evredir. Bağlanmadan hemen sonra kuyruk kılıfı kasılmaya başlar, bakteriyel hücre duvarı bütünlüğünün bozulmasına yardımcı olan faj enzimleri devreye girer ve fajın kuyruk tüpü bakteriyel hücre duvarından hücre membranına penetre olur. Sonrasında ise faj genomu, kuyruk tüpünden geçerek bakteri sitoplazmasına aktarılır (Hyman ve Abedon, 2009a).
- **Latent Dönem:** Fajların genetik materyalinin bakteri sitoplazmasına girmesinden olgun fajların oluşumuna kadar geçen periyoda denir. Bu periyot, eklips dönemi ve olgunlaşma dönemi olmak üzere başlıca iki ayrı aşamadan meydana gelir. Eklips döneminde, faj genetik materyallerinin sentezi ve replikasyonu ile bunlar için gerekli ilk proteinler ve fajın baş,

kuyruk gibi çeşitli komponentlerinin sentezi tamamlanır. Olgunlaşma dönemi ise montaj dönemidir. Sentezlenen komponentler birleştirilerek olgun enfektif faj partükülleri meydana getirilir (Arda, 2015).

- **Lizis ve dışarı çıkış:** Olgun fajların, faj genomunda kodlanan spesifik litik enzimleri vasıtasıyla hücre duvarını eriterek (lizis) dışarı çıktıkları evredir. Bu evre, litik fajlar tarafından meydana getirilen litik enfeksiyonlarda görülür. Bazı durumlarda bakterilerde lizis meydana gelmez. Olgun fajlar hücrede üredikten sonra hücre duvarından dışarı çıkarlar ve bakteriler normal yaşamlarına devam ederler. Bu durum ise ılımlı (temprate) fajlar tarafından meydana getirilen non-litik enfeksiyon döngülerinde görülmektedir. Diğer bir durumda ise faj DNA'sı bakteri genomu ile birleşir ve onun bir devamı haline gelir. İlımlar fajlar tarafından meydana gelen bu enfeksiyonlara ise lizojenik veya latent enfeksiyon denir (Arda, 2015).

Fajlar, morfolojik ve diğer karakterleri göz önüne alınarak bazı sınıflandırmalara tabi tutulmuştur. Bunlardan Bradley sınıflandırması, fajları A, B, C, D, E ve F olmak üzere 6 morfolojik tipe ayırmıştır. Ackerman sınıflandırmasında ise fajlar kuyruklu, kübik simetrlili, filamentöz ve pleomorfik fajlar olmak üzere dört temel gruba ayrılır (Arda, 2015). Uluslararası taksonomi komitesine göre (ICTV) fajlar morfolojileri, nükleik asit tipi ve homolojileri ve serolojik özellikleri bakımından 13 familyaya ait 30 grup içerisinde gruplandırılırlar (Mattey ve Spencer, 2008). Tüm bu sınıflandırmaların dışında fajlar, oluşturdıkları enfeksiyon tipleri, yaşam döngüleri ve üremeleri göz önüne alınarak litik (prodüktif) fajlar ve ılımlı (temprate) fajlar olmak üzere iki kategoriye ayrılırlar (Hyman ve Abedon, 2009a). Litik fajlar bakteriyel konaklarında litik enfeksiyona neden olan fajlardır. Litik enfeksiyon, faj genom replikasyonu, faj yapısal komponentlerinin üretilmesi ve bakteriyel hücrenin lizisi sonucunda yeni fajların ayrılması ile sonuçlanan ve faj üreme aşamalarının hepsini barındıran enfeksiyon tipidir (Hyman ve Abedon, 2009a). Tipik bir litik faj saatler içerisinde infekte ettiği bakteride 100-300 yeni faj oluşturur, bunlarda yeni jenerasyon bakterileri infekte eder ve öldürür (Mattey ve Spencer, 2008). İlımlı (temprate) fajlar, bakteriyel konaklarında non-litik ve lizojenik

(latent) olmak üzere iki tür enfeksiyona sebep olurlar. Bu tür fajlar konak bakteri içine girdikten sonra faj DNA'sı konak bakteri genomuna entegre olur ve onun bir devamı haline gelir. Bu durumdaki ılımlı fajlara profaj denir (Arda, 2015 ve Campbell, 2003). Bakteriyel genomun her replikasyonunda faj DNA'sı da replike olarak kardeş hücreye transfer edilir. Böyle bakterilerde lizojeni meydana gelir. Profajlar konak hücre metabolizmasındaki değişiklikler, çoğunlukla tamir edilemeyen DNA hasarı gibi bazı özel koşullar altında üzerinde bulunduğu konakçının genomundan ayrılarak virulent form kazanabilirler (Arda, 2015 ve Skurnik ve Strauch, 2006). Lizojeni meydana getiren ılımlı fajlar, sıkça rekombinant DNA teknolojilerinde kullanılmaktadır (Campbell, 2003).

Bakteriyofajların mikrobiyoloji tarihindeki yeri neredeyse bakterilerin bilimsel anlamda tanımlanması kadar eskidir. Bakteriyofaj fenomeni ile ilgili ilk bilgi 1896 yılında Hindistan nehirlerinde *Vibrio cholerae*'ya karşı filtreden geçebilen bir antibakteriyel aktivitenin saptanması ile elde edilmiştir (Abedon, 2008). Daha sonra bir İngiliz bakteriyolog olan Tword'un 1915'de stafilokoklar ve bir Kanadalı mikrobiyolog olan d'Herelle'nin Fransa'da 1917'de basiller Dizanteri etkeni üzerinde birbirinden bağımsız yaptıkları araştırmaların sonunda, bakterilerin filtreleri geçebilen bazı ajanlar tarafından lize edilebildiği ortaya konulmuş ve bu olgu yıllarca Tword-d'Herelle fenomeni olarak tanımlanmıştır. Sonradan D'Herelle, bu lizis olayının mikroskopta görülemeyen mikroorganizmalar tarafından oluşturulduğunu bildirmiş ve bu ajanlara, bakteri yiyen anlamına gelen "bakteriyofaj" adını vermiştir (Arda, 2015). Ayrıca d'Herelle, fajların insan, hayvan ve bitki patojeni olan bakterileri öldürme yeteneğini gözlemlemiş ve terapötik ajan olarak kullanılabileceğini öne sürmüştür (Mcauliffe ve ark., 2007). Bakteriyofajların tedavide kullanımı da fazla gecikmemiş ve keşfinden iki yıl sonra d'Herelle insanların Dizanteri tedavisinde başarılı sonuçlar almıştır (Abedon, 2008 ve Carlton, 1999).

Yirminci yüzyılın başlarında, antibiyotiklerin keşfinden önce, bakteriyel enfeksiyonların bakteriyofaj uygulamaları ile önlenebileceği ve/veya tedavi

edilebileceği öne sürülmüş ve bakteriyofajların bu potansiyeli, enfeksiyöz hastalıklara yaklaşımda bilimsel ve bilimsel olmayan toplulukların ilgisini çekmiştir (Sulakvelidze ve ark., 2001 ve Sulakvelidze ve Kutter, 2005). Bakteriyofajlar, antibiyotiklerin keşfine kadar daha çok bir tedavi aracı olarak görülmüş ve bu amaçla çeşitli enfeksiyonların tedavisinde ve önlenmesinde kullanılmıştır. Genellikle başarılı sonuçlar elde edilmesine karşın, bakteriyofaj biyolojisi bilgilerinin yetersiz olması ve bu sebeple dar konak aralığı olan fajların seçilmesinden, faj preparatlarının standardizasyonun ve purifikasyon kriterlerinin eksikliğinden ve saklanması sırasındaki aktivite kayıplarından dolayı karşılaşılan çeşitli problemler ve antibiyotiklerin keşfi faj çalışmalarını durma noktasına getirmiştir (Sulakvelidze ve ark., 2001 ve Summers, 2001). Antibiyotikler oldukça kullanışlı olduğundan Birleşik Devletler ve Batı Avrupa’da faj tedavisi klinik çalışmaları aktif bir şekilde sürdürülmemiş fakat Doğu Avrupa ve eski Sovyetler Birliğinde fajlardan faydalanılmaya devam edilmiştir (Sulakvelidze ve ark., 2001 ve Sulakvelidze ve Kutter, 2005). Antibiyotiklerin keşfinden sonra faj bakteriyolojide daha çok bir tiplendirme aracı olarak, moleküler genetik alanının gelişmesinden sonra da klonlama vektörü olarak kullanılmışlardır. Son zamanlarda hızlıca artan şekilde ortaya çıkan patojenik bakterilerin çoklu antibiyotik dirençleri yeni tedavi stratejilerini gündeme getirmesi nedeniyle batılı bilim komitelerinin, endüstrisinin ve halkın faj tedavisi ve faj çalışmalarına olan ilgisi yeniden canlandırmıştır (Sulakvelidze ve Kutter, 2005).

Kullanılan antimikrobiyal ajanların çoğuna karşı dirençli patojenik bakterilerin ortaya çıkışı ve özellikle bu organizmaların neden olduğu enfeksiyonların immun sistemi baskılanmış hastalardaki artışı modern tıp için ciddi bir problem oluşturmaktadır. Antibiyotiklere dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavi maliyetlerinin yüksekliği ve direncin bakteriler arasındaki hızlı yayılımı, antibiyotiklerin etkilerini sınırlamakta ve bazı olgularda da tamamen yetersiz kılmaktadır. Gelişen bu dirençlilik, özellikle de çoklu dirençlilik yeni antibiyotiklerin devreye girmesini zorunlu hale getirmektedir. Ancak antibiyotiklerin keşif hızı son yıllarda oldukça yavaşlamıştır. Bakterilerdeki direnç probleminin giderek önem

kazanması ile Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından da dile getirildiği gibi, antibiyotikler dışında alternatif antibakteriyel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve kullanılmasını zorunlu hale getirmiştir. Bu yeni yöntemlerin geliştirilmesi modern tıp ve biyoteknolojinin en öncelikli amaçlarından biri haline gelmektedir. Yeni tedavi yöntemleri arasında da en önemli potansiyeli bakteriyofaj tedavisinin barındırdığı birçok otorite tarafından kabul edilmektedir. Bakteriyofaj tedavisinin güncelliğini ve nasıl yükselen bir trend olduğunu anlamak için yıllara göre yapılan çalışmaları artan sayısını incelemek yeterlidir (Durupınar, 2005 ve Sulakvelidze ve ark., 2001).

Salmonella fajları, kanatlı dışkıları ve kanatlı çiftlikleri çevresinden kolaylıkla izole edilebilirler. Bu nedenle terapötik olarak kullanıldıklarında besin basamağındaki yeni bir biyolojik varlık olarak tanınmazlar (Atterbury ve ark., 2007). Bu sebeple fajlar, kanatlı Salmonellozis'in önlenmesi, tedavi edilmesi ve *Salmonella*'ların hızlı teşhisinde klasik yöntemlere en önemli alternatiftir. Özellikle *Salmonella*'larda antibiyotiklere karşı gelişen dirençle beraber kanatlı Salmonellozis'in önlenmesi ve tedavi edilmesi için de faj tedavisi çalışmaları yapılmış ve günümüzde bu çalışmalar hız kazanmıştır. Yapılan çalışmalarda genellikle tedavide olumlu sonuçlar alınmış fakat bu uygulamalar sonucunda tedavi için seçilen fajların sadece birkaçının koruma sağladığı ve başarılı koruma sağlanabilmesi için yüksek faj konsantrasyonuna ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (Duckworth ve Guling, 2002). Faj tedavisi çalışmalarında fajların veriliş yolunun da önemli olduğu bildirilmiştir. Kanatlılarda *Escherichia coli*'nin sebep olduğu solunum sistemi enfeksiyonlarında da faj tedavisinin etkinliğinin incelendiği bir çalışmada fajlar kanatlılara içme suyu ile verilmiş ve tedavi başarısız bulunmuştur. Fakat diğer bir çalışmada ise broilerlere fajların intramusküler enjeksiyon ile verilmesi mortaliteyi %53'den %17'ye indirmiştir (O'flaherty ve ark., 2009). Yapılan araştırmaların birçoğunda fajların etki, yaşam ve saklama süreleri ile ilgili deneysel çalışmalar eksiklik oluşturmaktadır. *Salmonella*'lar için spesifik, %95'in üzerinde *Salmonella* serotipini lize etme yeteneğine sahip ve buna karşın sadece %0,3 *Salmonella* olmayan türleri lize eden 'bakteriyofaj Felix O1'de genellikle

identifikasyon ve tiplendirmede kullanılmasına rağmen tedavi uygulamalarında da kullanılmaktadır (Borris, 2002).

Tüm bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında, Türkiye’de en çok izole edilen kanatlı *Salmonella* serotipi olan *S. Infantis*’in bakteriyofajlarının izolasyonu ve bu fajların konak spektrumunun belirlenmesi, ayrıca çalışmada izolasyonu yapılan ve konak aralığı belirlenen bu fajların etki, yaşam ve saklama sürelerinin saptanması hedeflendi.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Bakteri Suşları

Tez çalışmasında kullanılan *S. Infantis* suşları Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edildi. Çalışmada, ribotiplendirme sonucu riboprint paternleri iki farklı kümeyi temsil eden kanatlı orijinli 5'er adet, toplamda 10 adet *S. Infantis* izolatu, izolasyon aşamasında bakteriyofajların konak hedef hücreleri olarak kullanıldı. Çalışmada izole edilen fajların litik spektrumlarını belirlemek amacıyla sahadan izole edilmiş kanatlı orijinli rastgele seçilmiş 200 adet *S. Infantis* izolatu kullanıldı.

2.1.2. Kontrol Fajı

Kontrol amacıyla çalışmanın tüm aşamalarında Gürcistan ELIAVA Enstitüsü'nden temin edilen *S. Enteritidis* vB-GES-Se-K1 Tiflis Fajı ve Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen *S. Enteritidis* 1-Kars Fajı kullanıldı.

2.1.3. Bakteriyofaj İzolasyon Materyali

Bakteriyofaj izolasyonu için, Ankara ve Bolu illerinde yer alan kanatlı işletmelerinden toplanan 50 adet dışkı-altlık örneği ve kanatlı mezbahalarından toplanan 50 adet atık su örneği olmak üzere toplam 100 örnek kullanıldı. Atık su örneği olarak, yüksek kapasiteli kanatlı işletmeleri ve kesimhanelerine ait arıtma tesislerinden toplanan arıtma suyu kullanıldı. Alınan su örnekleri 500 ml miktarında steril şişelere konularak 4-24 saat içinde, +4°C’de soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı.

Toplanan tavuk dışkı-altlık örnekleri 1/10 oranında Luria Bertani broth (Neogen, USA, Katolog no: LAB173) ile sulandırılıp homojenize edilerek, kümes atık suları, kümes çevresindeki su birikintileri ise direkt olarak bakteriyofaj izolasyonunda kullanıldı.

2.1.4. Besiyerleri

2.1.4.1. Çift Katlı (Double-Strength) Broth

Fajların izolasyonu, saflaştırılması ve üretilmesinde besi yeri olarak çift katlı (double-strength) Luria Bertani broth (Neogen, USA, Katolog no: LB LAB173) kullanıldı. Besi yeri 40 g/L olacak şekilde hazırlanarak pH’sı 7,5’e ayarlandı ve 121°C’de 15 dk sterilize edildi. Besi yeri sıcaklığı 45-50°C’ye gelince içerisine 1 M 1 ml kalsiyum klorür (CaCl₂) solüsyonu eklendi (Twist ve Kropinski, 2009).

2.1.4.2. Dip Agar

Fajların izolasyonu, saflaştırılması ve üretilmesi aşamalarında spot test ve agar-overlay metodunda katı besi yeri olarak kullanıldı. Besi yeri, Luria Bertani Broth 20 g/1000ml, Bakteriyolojik Agar (OXOID, England, Agar No.1 Katolog no: LP0011) 15 g/L olacak şekilde hazırlandı. pH'ı 7,5'e ayarlandı ve 121°C'de 15 dk sterilize edildi. Besi yeri sıcaklığı 45-50°C'ye gelince içerisine 1 M 1 ml CaCl₂ solüsyonu eklendi (Twist ve Kropinski, 2009).

2.1.4.2. Top Agar

Fajların izolasyonu, saflaştırılması ve üretilmesinde aşamalarında agar-overlay metodunda yarı katı besi yeri olarak kullanıldı. Besi yeri Luria Bertani broth 20 g/L, Bakteriyolojik Agar 3 g/L olacak şekilde hazırlandı. pH'ı 7,5'e ayarlandı ve 121°C'de 15 dk sterilize edildi. Besi yeri sıcaklığı 45-50°C'ye gelince içerisine 1 M 1 ml CaCl₂ solüsyonu eklendi. Besi yeri 3'er ml olacak şekilde tüplere dağıtılarak kullanıldı (Kropinski ve ark., 2009).

2.1.5. Solüsyonlar

2.1.5.1. CaCl₂ Solüsyonu

Tez çalışmasının tüm aşamalarında kullanılan besi yerleri içerisine faj adsorbsiyonunu arttırması için 1 M CaCl₂ Solüsyonu eklenmiştir. Solüsyon 100 ml

distile suya 11,1 g CaCl_2 (Merck, Germany, Katolog no: 102382) eklenerek hazırlandı ve 121°C 'de 15 dk sterilize edildi (Raya ve Hebert 2009).

2.1.5.2. Jelatin Solüsyonu

Saflaştırılan fajların toplanması ve saklanması için kullanılan Saline-Magnesium (SM) solüsyonu hazırlanmasında kullanıldı. Solüsyon 100 ml distile suya 2 g jelatin (Merck, Germany, Katolog no: 104078,) eklenerek %2'lik oranda hazırlandı (Kropinski ve ark., 2009).

2.1.5.3. Tris-HCl Solüsyonu

Saflaştırılan fajların toplanması ve saklanması için kullanılan Saline-Magnesium (SM) solüsyonu hazırlanmasında 1 M Tris-HCl kullanıldı. Solüsyon hazırlanırken, 90 ml distile suya 12,1 gr Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Merck, Germany, Katalog no: 108382) eklendi ve pH 7,5'e ayarlandı ve final hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. 121°C 'de 15 dk sterilize edildi (Raya ve Hebert 2009).

2.1.5.4. Saline-Magnesium (SM) Solüsyonu

Saflaştırılan fajların toplanmasında ve fajların saklanması için kullanıldı. Solüsyon, 5,8 g NaCl (Merck, Germany, Katalog no: 106404), 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Germany, Katalog no: 105886) tartılarak 1 M Tris-HCl'den 50 ml, %2'lik

solüsyonundan 5 ml eklendi ve hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı. 121°C'de 15 dk sterilize edildi ve soğuduktan sonra +4°C'de saklandı (Kropinski ve ark., 2009).

2.1.5.5. MgSO₄ Solüsyonu

Salmonella Infantis, suşlarındaki lizojenik fajların varlığını saptamak için kullanılan mitojen bir madde olan mitomisin C (MC) (Sigma, St Louis, USA, Katalog no: Mo63178), hazırlanmasında kullanıldı. Solüsyon 100 ml distile suya 12 g MgSO₄ (Merck, Germany, Katalog no: 106067) eklenerek 0,1 M MgSO₄ hazırlandı. 121°C'de 15 dk sterilize edildi (Raya ve Hebert 2009).

2.1.5.6. Mitomisin C (MC)

Salmonella Infantis, suşlarındaki lizojenik fajların varlığını saptamak için kullanılan mitojen bir madde olan mitomisin C (MC) (Sigma, St Louis, USA, Katalog no: Mo63178), 10'ar ml steril 0,1 M MgSO₄ solüsyonuna 5 ve 10 µg eklenip çözdürülerek hazırlandı (Raya ve Hebert 2009).

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Faj İzolasyonunda Kullanılacak *S. Infantis* Suşlarında Lizojenitenin Saptanması

Faj izolasyon çalışmalarında kullanılan 10 adet *S. Infantis*, suşundaki lizojenik fajların varlığını saptamak için Raya ve Hebert (2009)'in bildirdikleri metot modifiye edilerek kullanıldı. Bu amaçla, mitojen bir madde olan mitomisin C (MC) (Sigma, St Louis, USA, Katolog no: Mo63178) uyarımından yararlanıldı. Bunun için, lizojenitesi kontrol edilecek *S. Infantis* suşlarının tamamı LB Broth besiyerlerinde üretilmiş bir gecelik sıvı kültürleri kullanıldı. Kontrolü yapılacak suşların bir gecelik kültürlerinden 100 µl alınarak 10 ml LB broth'a ekildi ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Suşların başlangıç absorbansları 600 nm de ölçüldü. Yaklaşık 30 dk sonra her bir suş için ayrı ayrı stok solüsyonlardan final konsantrasyonları 0,5 ve 1,0 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde MC besiyerine eklendi ve inkübasyona bırakıldı. Her bir suş için de MC eklenmemiş kontrol tüpü hazırlandı. Her saat ayrı ayrı 6-8 saat boyunca optik yoğunluk azalması gözlenene kadar absorbans ölçüldü. Optik yoğunluk azalmaya başladıktan sonra kültürler 4000 rpm'de 12 dk santrifüj edilip, süpernatantları 0,2 µm por çaplı filtreden geçirildi ve spot test ile faj aktivitesi yönünden kontrol edildi (Raya ve Hebert 2009). Spot test sonucu plak oluşumu gözlenmeyen *S. Infantis* suşları faj izolasyonu çalışmalarında kullanıldı.

2.2.2. Virülent (Litik) Bakteriyofaj İzolasyonu

Çalışmada, toplanan tavuk dışkı-altlık örnekleri 1/10 oranında LB Broth ile sulandırılıp homojenize edilerek, kümes atık suları, kümes çevresindeki su

birikintileri ise direkt olarak santrifüj edildikten sonra 0,2 µm por çapındaki filtrelerden (Sartorius, Germany, Katalog no: SM16534K Minisart Filtre) geçirildi, filtratlar ayrıldı ve faj kaynağı olarak kullanıldı. Filtratlardaki litik faj aktivitesini belirlemek amacıyla, filtratlar ilk önce 10 ml çift katlı LB broth içerisine besi yeri ile eşit miktarda alındı ve lizojenite saptanmayan *S. Infantis* suşunun logaritmik fazdaki kültüründen (4-6 saatlik) 500 µl eklenerek 37°C'de 50 rpm'de çalışan etüvün içerisine yerleştirilmiş bir çalkalayıcı üzerinde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda besiyeri 7000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi ve süpernatant 0,2 µm por çaplı filtreden geçirildi. Bu işlem fajları çoğaltmak amacıyla 2 kez daha tekrarlandı. Filtratlardaki litik aktivitenin belirlenmesi amacıyla spot test uygulandı. Kullanılan *S. Infantis* suşunun logaritmik fazdaki sıvı kültüründen dip katı agar 100 µl koyularak yayma ekim metodu ile ekildi ve üzerine 10 µl faj filtratı damlatıldı. Bir müddet agarın kuruması beklendikten sonra ekimi yapılmış agar 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda filtratın damlatıldığı yerlerdeki plak oluşumu (üremenin olmayışı) arandı. Litik faj aktivitesi görülmeyen filtratlar atıldı, görülen filtratlar ise saflaştırılmak üzere ayrıldı (Atterbury ve ark., 2007; Bao ve ark., 2011; Carey-Smith ve ark., 2006; Kutter, 2009 ve Twest ve Kropinski, 2009).

2.2.3. Fajların Çoğaltılması ve İdamesi

Faj aktivitesi görülen filtratlara saflaştırma amacı ile agar-overlay yöntemi uygulandı. Bu amaçla, faj varlığı saptanan filtratların 10^{-9} dilüsyona kadar LB broth ile dilüsyonları hazırlandı. Taze 10^6 cfu/ml yoğunluktaki *S. Infantis* konak süspansiyonu (100 µl) ve faj filtratı (100 µl) eşit hacimde steril bir eppendorf tüpe alındı ve adsorbsiyonun gerçekleşmesi için oda ısısında 10 dk beklendi. Daha sonra bu faj bakteri karışımı 3 ml top agar içeren tüplere eklendi ve iyice karıştırıldı ve sonrasında Dip agar playtlerinin üzerine döküldü ve uygun koşullarda inkübasyona kaldırıldı. Yaklaşık 18-24 saat sonra faj plaklarının oluşumu gözlemlendi. İnkübasyon sonucu oluşan tek bir plak steril enjektör ile kesilip steril bir eppendorf tüpe alındı ve

tüpe 3 ml LB broth eklenip iyice karıştırılarak fajların besiyerine geçişi sağlandı. Saflığı sağlamak için yukarıdaki işlem üç kez tekrarlandı. Fajlar agarın üzerine dökülen SM (Saline-Magnesium, faj tamponu) solüsyonu ile bir gece 37°C hafif çalkalama (50 rpm) sonrasında toplandı. Toplanan süspansiyon 7000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek, üst sıvı 0,2 µm membran filtreden geçirildi. Fajların zenginleştirilmesi amacıyla saf halde izolasyonu yapılan fajlar izolasyonda anlatıldığı gibi sıvı ortamda 10⁶ cfu/ml yoğunluktaki konak *S. Infantis* şusu eklenerek istenilen titre elde edilene kadar pasajlandı. Fajlar içerisine 1-2 damla kloroform eklenerek -80°C'de saklandı. (Bao ve ark., 2011; Carey-Smith ve ark., 2006 ve Kropinski ve ark., 2009).

2.2.4. Rutin Test Dilüsyonunun Belirlenmesi

Rutin Test Dilüsyonu (RTD)'nu belirlemek için ise yine agar-overlay yöntemi kullanıldı ve bunun için 10⁶ cfu/ml yoğunluktaki konak *S. Infantis* suşundan 100 µl 3 ml top yarı katı agar içerisine eklendi ve bu karışım önceden hazırlanmış dip katı agar üzerine döküldü. Agarın katılaşması için bir süre beklendi. Bu sırada her bir faj stoğunun ayrı ayrı LB broth kullanılarak 10⁻¹-10⁻¹² arasında 10 katlı dilüsyonları hazırlandı. Her bir dilüsyon ayrı ayrı agar üzerine işaretlenerek işaretli yere otomatik pipet yardımı ile 10 µl damlatıldı. Etüvde 37°C'de 18-24 saat inkübasyon sonrasında plak formasyonları okundu ve stok faj süspansiyonundaki faj sayısı mililitredeki plak oluşturan ünite (pfu/ml) cinsinden hesaplandı. RTD yoğun (birleşen plaklar) lizisin görüldüğü sulandırmanın bir öncesi olarak kabul edildi (Kropinski ve ark., 2009).

2.2.5. Fajların Litik Spektrumlarının ve Litik Profillerinin Belirlenmesi

Faj izolasyon çalışmaları ile elde edilen *S. Infantis* fajlarından, RTD 1×10^4 'ün üzerinde olanlar ayrılarak seçilen her bir fajın 200 adet *S. Infantis* suşundaki litik spektrumları belirlendi. Bu amaçla, logaritmik fazda olan *S. Infantis* suşları 100 µl dip agar üzerine yayma ekim yöntemi ile ekildi. Agarın kuruması için bir süre beklendikten sonra rutin test dilüsyonu 10^4 - 10^9 pfu/ml olan fajlar, işaretlenmiş yerlere 10 µl damlatıldı ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda faj plaklarının oluşup oluşmamasına göre fajların litik spektrumu değerlendirildi (Bao ve ark., 2011; Carey-Smith ve ark., 2006; Kropinski ve ark., 2009 ve Kutter, 2009). Faj izolasyon çalışmaları ile elde edilen *S. Infantis* fajlarından RTD 1×10^4 'ün altında olanlar değerlendirmeye alınmadı.

İzole edilen fajların 200 adet *S. Infantis* suşunda litik spektrumlarının belirlenmesi sonucunda fajların aynı ya da farklı suşları lize etme kabiliyetine göre litik profilleri belirlendi. Bunun için ilk önce suşlar numaralandırıldı ve her bir fajın hangi *S. Infantis* suşunu lize ettiği kaydedildi. Aynı suşları lize eden fajlar benzer litik profilde kabul edildi. Litik profilleri en fazla lize edilen suş sayısına göre numaralandırıldı (Cortes ve ark., 2015).

2.2.6. Fajların Genotipik Karakterizasyonu

2.2.6.1. Faj DNA İzolasyonu

Farklı litik profile sahip fajlar arasında, yüksek litik spektruma (%90 ve üstü) sahip fajların tamamı DNA izolasyonu amacıyla kullanıldı. Kontrol olarak *S. Enteritidis* vB-GES-Se-K1 Tiflis Fajı kullanıldı. Faj DNA izolasyonu Norgen Faj DNA

İzolasyon Kiti (Norgen Biotek, Kanada, Katalog no: 46800) kullanılarak kit protokolüne göre gerçekleştirildi. Kit protokolüne göre aşağıdaki adımlar izlendi:

- Seçilen ve titresini ayarlanmış ($>1 \times 10^8$ pfu/ml) fajlardan 1 ml alınarak 2 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı.
- Konak bakteriye ait DNA kontaminasyonunun önlenmesi amacıyla her bir faj örneğine 10 µl DNaz 1 (Thermo Scientific, USA, Katalog no: 18047019) solüsyonu eklendi ve oda ısısında 15 dk inkübe edildi.
- 75°C'de 5 dk inkübasyon ile DNaz1 inaktivasyonu yapıldı.
- 500 µl lizis B solüsyonu eklendi. Homojen bir karışım elde etmek için 10 saniye vorteks yapıldı.
- 4 µl Proteinaz K solüsyonu eklendi ve 10 saniye vorteks yapıldı.
- 55°C'de 30 dk inkübasyon ile enzim aktivasyonu yapıldı.
- 65°C'de 15 dk inkübe edildi ve inkübasyon sırasında tüpü ters çevirerek lizat iki veya üç kez karıştırıldı.
- Lizata 300 µl isopropanol eklendi ve vorteks yapıldı.
- Hazırlanan lizattan, 650 µl alınıp spin column tüpüne aktarıldı. 6000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak yeni 2 ml'lik koleksiyon tüpü yerleştirildi.
- 400 µl etanol eklemesi tamamlanan wash buffer A solüsyonundan eklendi. 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak yeni koleksiyon tüpü yerleştirildi. Bu adım 3 kez tekrarlandı.
- Son tekrarın ardından 12000 g'de 3 dk santrifüj edildi ve koleksiyon tüpü atılarak, spin column yeni 1,7 ml'lik elution tüpüne yerleştirildi.
- 75 µl elution buffer B eklendi ve 2 dk oda ısısında inkübasyonun ardından 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Spin column atılarak 1,7 ml'lik elution tüpü içerisinde saf DNA elde edildi.

Elde edilen DNA'lar NaNoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA) spektrofotometre kullanılarak 260 nm'deki absorpsiyon değerleri ölçüldü. 10 ng ve üstü konsantrasyona sahip DNA örnekleri seçilerek ilk birkaç gün -20°C'de, sonrasında kullanılabilecek kadar -80°C'de saklandı.

2.2.6.2. Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA-PCR Analizi

Seçilen Fajların, DNA izolasyonlarının ardından Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) PCR analizleri yapıldı. Polimorfik DNA'nın rastgele çoğaltılması için RAPD PCR analizi Cortes ve ark. (2015) ile Gutierrez ve ark., (2011)'nın bildirdikleri yöntemler modifiye edilerek gerçekleştirildi. Amplifikasyon amacıyla Cortes ve ark. (2015) ile Gutierrez ve ark., (2011)'nın çalışmalarında önerdikleri ve en fazla RAPD paternini oluşturan P1 (5'-CCGCAGCCAA-3') primeri kullanıldı. RAPD-PCR analizi için izelge 2.1 belirtilen PCR karışım oranları ile izelge 2.2'de belirtilen PCR döngü koşulları kullanılarak amplifikasyonlar termal döngü cihazında (Thermo Scientific, USA) gerçekleştirildi.

Çizelge 2.1. RAPD-PCR için kullanılan bileşenler, konsantrasyonları ve hacimleri.

Bileşen	Hacim
dH ₂ O	14,8 µl
PCR buffer	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
primer (10 pmol)	1 µl
Taq DNA polimeraz	0,2 µl
Faj DNA	2 µl

Çizelge 2.2. RAPD-PCR sıcaklık ve döngü koşulları.

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
94°C	45 sn	4
30 °C	120 sn	
72 °C	60 sn	
94°C	5 sn	26
36°C	30 sn	
72°C	30 sn	
75°C	10 dk	-

Amplifikasyon sonunda oluşan ürünlerden 5 µl alınarak 2 µl 6×Loading Dye solüsyonu ile karıştırıldı ve etidyum bromür (0,5 mg/ml) ile boyanmış %0,8'lik agaroz jele yüklenerek 100 voltta 55 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez sonuçları agar jel görüntüleme cihazında (Syngene, USA), UV ışık altında değerlendirildi. En az bir polimorfik bant tanımlandığında profiller farklı kabul edildi (Gutierrez ve ark., 2011).

2.2.7. Faj-Bakteri Dinamikleri

Tez çalışmasında izolasyonu yapılan fajlardan, RTD 10^{-4} 'ün üzerinde olup, en geniş litik spektruma sahip (%90 ve üstü), litik profilleri ve RAPD PCR paternleri birbirinden farklı olan fajlar ve bu fajların konak *S. Infantis* suşu seçilerek bütün faj-bakteri dinamiklerinin belirlenmesi çalışmalarında kullanıldı.

2.2.7.1. Minimal Faj ve Minimal Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Bu amaçla, seçilen fajlar ile *S. Infantis* suşunun 10^{-1} - 10^{-8} arasında 10 katlı sulandırmaları LB broth kullanılarak hazırlandı. Her bir bakteri sulandırmasına bir faj sulandırması olacak şekilde bir araya getirilerek 37°C'de inkübe edildi. Kontrol için sadece bakteri ve sadece faj içeren süspansiyonlar hazırlandı. Saatlik zaman periyotlarında karışımlardan alınan örneklerden bakteri sayımı ve agar-overlay yönteminde faj sayımları yapıldı. Bu sayımlara göre fajların replikasyonu için gerekli minimal bakteri sayısı ve bakterinin infekte olması için gerekli minimal faj sayısı belirlendi (Hyman ve Abedon, 2009b ve Wiggins ve Alexander, 1985).

2.2.7.2. Faj Adsorbsiyon Oranının Belirlenmesi

Adsorbsiyon oranlarının belirlenmesi amacıyla logaritmik fazdaki 900 µl *S. Infantis* kültürüne RTD 1×10^6 olan fajdan 100 µl eklendi ve çalkalanarak oda ısısında inkubasyona bırakıldı. Bu kültürlerden 0, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60'ıncı dakikalarda örnekler alındı. Örnekler kloroform içeren SM solüsyonu ile 1:10 oranında dilüe edilip santrifüj edildi. Süpernatant toplandıktan sonra içindeki adsorbe olmamış faj sayısı agar-overlay metodu ile belirlendi. Faj adsorbsiyon oranı zamana karşı pfu'daki azalma oranı olarak ifade edildi (Hyman ve Abedon, 2009b; Rahaman ve ark., 2014 ve Sanders ve Klaenhammer, 1980).

2.2.7.3. Latent Sürenin Belirlenmesi

Latent süre/çoğalma oranının belirlenmesi amacıyla konak *S. Infantis* suşunun logaritmik fazdaki 900 µl kültürüne RTD 1×10^9 olan fajdan 100 µl ilave edildi. Kültür adsorbsiyonun gerçekleşmesi için oda ısısında 15 dk bekletildikten sonra adsorbe olmayan fajların uzaklaştırılması için 5500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Tortu, soğuk LB broth ile sulandırıldıktan sonra 10 ml LB broth'a aktarıldı ve 37°C'de inkubasyona kaldırıldı. Bu aşamadan itibaren sıfırıncı dakika dahil 30 dk ara ile kültürlerden alınan örneklerden agar-overlay yöntemi ile faj sayımı yapıldı (Hyman ve Abedon, 2009b).

2.2.8. Deneysel Çalışmalar

Bu aşamaya kadar bütün özellikleri araştırılan faj ve fajın kendi konağı olan *S. Infantis* suşu tüm deneysel çalışmalarda test edildi.

2.2.8.1. Faj Etkinliğinin Saptanması

Salmonella Infantis fajlarının konak bakteriler üzerindeki etkinliğini belirlemek için çalışmalar yapıldı. Bu amaçla bir kanatlı şletmesinden temin edilen, otoklavlanarak steril edilen, strelizasyon sonrası ISO 6579 yöntemi (ISO 6579, 2002; WHO, 2010) ile *Salmonella* spp. yönünden negatif olduğu belirlenen ve laboratuvar koşullarında *S. Infantis* ile deneysel olarak inoküle edilmiş 100 ml su, 90 g altlık ve 90 g yem materyali kullanıldı. Bu materyallere faj uygulanarak canlı bakteri sayısı üzerindeki etkisi ve etki süresi incelendi. Tüm etkinlik denemelerinde bu aşamaya kadar bütün özellikleri belirlenen faj ve bu fajın konağı olan *S. Infantis* suşu kullanıldı. Bu aşamadan sonra kullanılan fajların üretilmesi, saflaştırılması ve doze edilmesi yukarıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi (Kropinski ve ark., 2009 ve Kutter, 2009).

2.2.8.1.1. Su Materyallerindeki Faj Etkinliği

Uygun koşullarda üretilen ve canlı bakteri sayısı belirlenen 10^7 cfu/ml yoğunluktaki *S. Infantis* suşundan 1'er ml alınarak bir süre bekletilmiş (18-24 saat) 8'er ml içme suyuna katıldı. Bir saat sonra, 10^9 pfu/ml yoğunluktaki fajdan 1 ml alınarak süspansiyona eklendi ve 20-22°C'de inkübasyona bırakıldı. Ayrıca ayrı ayrı faj ve bakteri uygulaması yapılmayan su örnekleri de kontrol olarak kullanıldı. Uygulamadan 30 dk, 1 saat, 12 saat ve 24 saat sonra su örneklerinde canlı bakteri ve faj sayımları yapıldı. Her bir saat uygulaması için aynı koşullarda ayrı su materyali kullanıldı.

2.2.8.1.2. Altlık Materyallerindeki Faj Etkinliği

Uygun koşullarda üretilen ve canlı bakteri sayısı belirlenen 10^6 cfu/ml yoğunluktaki *S. Infantis* suşundan 1'er ml alınarak bir kanatlı işletmesinden temin edilen 10'ar gr altlık materyaline katıldı. Bir saat sonra, 10^9 pfu/ml yoğunluktaki fajdan alınarak altlık materyaline pulverizasyonla 1 ml miktarında püskürtüldü ve 20-22°C'de inkübasyona bırakıldı. Ayrıca ayrı ayrı faj ve bakteri uygulaması yapılmayan altlık örnekleri de kontrol olarak kullanıldı. Uygulamadan 1 saat, 12 saat ve 24 saat sonra altlık örneklerinde canlı bakteri ve faj sayımları yapıldı. Her bir saat uygulaması için aynı koşullarda ayrı altlık materyali kullanıldı.

2.2.8.1.3. Yem Materyallerindeki Faj Etkinliği

Uygun koşullarda üretilen ve canlı bakteri sayısı belirlenen 10^6 cfu/ml yoğunluktaki *S. Infantis* suşundan 1'er ml alınarak bir kanatlı işletmesinden temin edilen 10'ar gr yem materyaline katıldı. Bir saat sonra, 10^9 pfu/ml yoğunluktaki fajdan alınarak yem materyaline pulverizasyonla 1 ml miktarında püskürtüldü ve 20-22°C'de inkübasyona bırakıldı. Ayrıca ayrı ayrı faj ve bakteri uygulaması yapılmayan yem örnekleri de kontrol olarak kullanıldı. Uygulamadan 1 saat, 12 saat ve 24 saat sonra yem örneklerinde canlı bakteri ve faj sayımları yapıldı. Her bir saat uygulaması için aynı koşullarda ayrı yem materyali kullanıldı.

2.2.8.2. Fajın Yaşam Süresinin Saptanması

Salmonella Infantis fajlarının konak hücre bulundurmeyen bir ortamda infektivitesini koruduğu süreyi tespit etmek için çalışmalar yapıldı. Bu amaçla bir kanatlı işletmesinden temin edilen, otoklavlanarak steril edilen, strelizasyon sonrası ISO 6579 yöntemi (ISO 6579, 2002; WHO, 2010) ile *Salmonella* spp. yönünden negatif olduğu belirlenen 190 ml su, 210 gr altlık ve 210 gr yem materyali kullanıldı. Bu materyallere faj uygulanarak yaşam süresi incelendi. Tüm etkinlik denemelerinde bu aşamaya kadar bütün özellikleri belirlenen faj kullanıldı. Bu aşamadan sonra kullanılan fajın üretilmesi, saflaştırılması ve doze edilmesi yukarıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi (Kropinski ve ark., 2009 ve Kutter, 2009).

2.2.8.2.1. Su Materyallerindeki Faj Yaşam Süresi

Uygun koşullarda üretilen 10^9 pfu/ml yoğunluktaki fajdan 1 ml alınarak bir süre bekletilmiş (18-24 saat) 9'ar ml içme suyuna eklendi ve 20-22°C inkübasyona bırakıldı. Ayrıca faj uygulaması yapılmayan su materyali de kontrol olarak kullanıldı. Uygulama yapılan su materyallerinden 1 hafta süreyle her gün örnekler alınarak faj aktivitesinin korunup korunmadığı ve pfu sayısı agar-overlay yöntemi ile incelendi. Her bir saat uygulaması için aynı koşullarda ayrı su materyali kullanıldı.

2.2.8.2.2. Altlık Materyallerindeki Faj Yaşam Süresi

Uygun koşullarda üretilen 10^9 pfu/ml yoğunluktaki fajdan 1 ml alınarak 10'ar gr altlık materyaline pulverizasyonla püskürtüldü ve 20-22°C inkübasyona bırakıldı. Ayrıca faj uygulaması yapılmayan altlık materyali de kontrol olarak kullanıldı. Uygulama yapılan altlık materyallerinden 1 hafta süreyle her gün örnekler alınarak fajların aktivitelerini koruyup korumadıkları ve sayıları agar-overlay yöntemi ile incelendi. Her bir saat uygulaması için aynı koşullarda ayrı altlık materyali kullanıldı.

2.2.8.2.3. Yem Materyallerindeki Faj Yaşam Süresi

Uygun koşullarda üretilen 10^9 pfu/ml yoğunluktaki fajından 1 ml alınarak 10'ar g yem materyaline pulverizasyonla püskürtüldü ve 20-22°C inkübasyona bırakıldı. Ayrıca faj uygulaması yapılmayan yem materyali de kontrol olarak kullanıldı. Uygulama yapılan yem materyallerinden 1 hafta süreyle her gün örnekler alınarak fajların aktivitelerini koruyup korumadıkları ve sayıları agar-overlay yöntemi ile incelendi. Her bir saat uygulaması için aynı koşullarda ayrı yem materyali kullanıldı.

2.2.8.3. Faj Saklama Süresinin Saptanması

Salmonella Infantis fajlarının saklanma ve kullanılabilirlik süresini tespit etmek için çalışmalar yapıldı. Bu amaçla RTD 'nu 1×10^9 olan fajlar arasından seçilen fajlar SM solüsyonuna toplandıktan sonra 2'şer ml endorff tüplere alındı. Tüpler oda ısısı, +4°C, -20°C ve -80°C'de bekletildi. Bu preparatlardan gittikçe artan zaman

aralılarında (ilk hafta her gün, ilk ay her hafta ve daha sonra aylık ve yıllık aralıklarla) örnekler alınarak faj aktivitesi ve sayısı agar-overlay yöntemi ile incelendi. Kullanılan fajlar yukarıda belirtilen yöntemlerle üretildi, saflaştırıldı ve doze edildi. Her bir zaman uygulaması için aynı koşullarda ayrı preparat kullanıldı (Kropinski ve ark., 2009 ve Kutter, 2009).

2.2.9. İstatistiksel Analiz

Salmonella Infantis fajlarının konak bakteriler üzerindeki etkinliğini, 24 saat sonunda kontrol olarak kullanılan, faj uygulaması yapılmayan su, altlık ve yem örneklerindeki canlı *S. Infantis* sayısının, fajlar ile muamele edilmiş su, altlık ve yem örneklerindeki canlı *S. Infantis* sayısının karşılaştırılması ile değerlendirildi. Gözlemlenen farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını belirlemek için Ki-Kare analizi kullanıldı, $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi (Field, 2009).

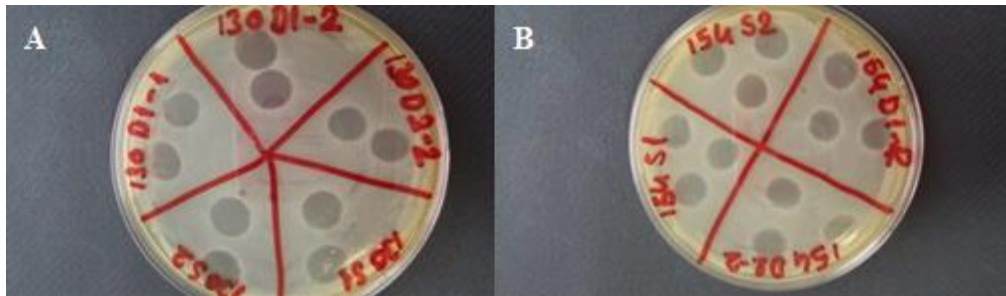
3. BULGULAR

3.1. Faj İzolasyonunda Kullanılacak *S. Infantis* Suşlarında Lizojenite Bulguları

Çalışmada, izolasyon aşamasında bakteriyofajların konak hedef hücreleri olarak kullanılan ribotiplendirme sonucu riboprint paternleri iki farklı kümeyi temsil eden kanatlı orijinli 5'er adet toplamda 10 adet *S. Infantis* izolatının lizojenite çalışmaları sonucunda bu suşların hiçbirinde lizojenite saptanamadı.

3.2. Virü lent (Litik) Bakteriyofaj İzolasyonu Bulguları

Çalışmada bakteriyofaj izolasyonu için kullanılan Ankara ve Bolu illerinde yer alan kanatlı işletmelerinden ve kanatlı mezbahalarından toplanan 50 adet dışkı-altlık örneğinin 26 tanesinde spot test (Şekil 3.1) ile faj aktivitesi belirlendi ve agar-overlay yöntemi (Şekil 3.2) ile sadece 18 adet faj saf olarak izole edildi. Toplanan 50 adet atık su örneğinden ise 29 tanesinde spot test (Şekil 3.1) ile faj aktivitesi belirlendi ve ancak agar-overlay ile (Şekil 3.2) 20 adet faj saf olarak izole edildi. İncelenen 100 materyalden toplam 38 adet *S. Infantis* fajı izole edildi (Çizelge 3.1).



Şekil 3.1. Spot test ile belirlenen litik faj aktivitesi A) altlık materyalinde, B) atık su materyalinde.



Şekil 3.2. Agar-overlay yöntemi ile görülen faj plakları.

Çizelge 3.1. Kaynağına göre izole edilen toplam faj sayısı.

		Faj Aktivitesi	Faj İzolasyonu
İncelenen örnek sayısı		Spot test (%)	Agar- Overlay (%)
Altılık-Dışkı	50	26 (52)	18 (36)
Atık Su	50	29 (58)	20 (40)
Toplam	100	55 (55)	38 (38)

3.3. Rutin Test Dilüsyonu Bulguları

Tez çalışmasında izolasyonu yapılan fajların titresini belirlemek ve yüksek titreli fajları seçebilmek için, izole edilen 38 *S. Infantis* fajının rutin test dilüsyonları incelendi. İncelenen 38 fajdan 17 fajın RTD'ü 10^4 'ün altında bulundu. Pasaj yapılarak konsantrasyonları arttırılamayan bu 17 adet faj daha sonraki aşamalarda kullanılmadı. RTD değeri 10^5 ve üstünde bulunan 21 fajın RTD değerleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. RTD değerleri 10^5 üzerinde olan *S. Infantis* fajlarının listesi.

Faj	Konak Bakteri	Kaynak	RTD
SF-In1	<i>S. Infantis</i>	Dışkı-altlık	3×10^8
SF-In3	<i>S. Infantis</i>	Atık Su	2×10^9
SF-In4	<i>S. Infantis</i>	Dışkı-altlık	3×10^9
SF-In7	<i>S. Infantis</i>	Dışkı-altlık	2×10^9
SF-In8	<i>S. Infantis</i>	Dışkı-altlık	4×10^5
SF-In10	<i>S. Infantis</i>	Dışkı-altlık	3×10^5
SF-In12	<i>S. Infantis</i>	Atık Su	2×10^9
SF-In16	<i>S. Infantis</i>	Atık Su	2×10^7
SF-In18	<i>S. Infantis</i>	Dışkı-altlık	3×10^5
SF-In20	<i>S. Infantis</i>	Atık Su	2×10^9
SF-In21	<i>S. Infantis</i>	Atık Su	4×10^7
SF-In22	<i>S. Infantis</i>	Atık Su	2×10^6
SF-In24	<i>S. Infantis</i>	Atık Su	3×10^5
SF-In26	<i>S. Infantis</i>	Atık Su	3×10^8
SF-In27	<i>S. Infantis</i>	Atık Su	2×10^5
SF-In28	<i>S. Infantis</i>	Dışkı-altlık	3×10^8
SF-In31	<i>S. Infantis</i>	Dışkı-altlık	2×10^6
SF-In33	<i>S. Infantis</i>	Dışkı-altlık	3×10^9
SF-In35	<i>S. Infantis</i>	Atık Su	3×10^9
SF-In37	<i>S. Infantis</i>	Atık Su	2×10^7
SF-In38	<i>S. Infantis</i>	Atık Su	2×10^7

3.4. Fajların Litik Spektrumlarının ve Litik Profillerinin Belirlenmesi Bulguları

Faj izolasyon çalışmaları ile elde edilen 38 adet *S. Infantis* fajından RTD 1×10^4 'ün üzerinde olan 21 faj ayrılarak, her bir fajın 200 adet *S. Infantis*, suşundaki litik spektrumları ve profilleri belirlendi (Şekil 3.3). Bu 21 fajın numaralandırılan aynı ya da farklı suşları lize etme kabiliyetine göre 17 farklı litik profil tespit edildi. Litik spektrumlarına göre ise SF-In22 fajının en dar (%69,5), SF-In7 fajının ise en geniş

(%94,5) spektruma sahip olduğu belirlendi. Test edilen bütün fajların litik spektrumları ve profilleri Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. S. Infantis fajlarının litik spektrumunun ve profillerinin belirlenmesinde kullanılan spot test sonuçları.

Çizelge 3.3. 21 adet S. Infantis fajının kaynak, litik spektrumu ve litik profil verileri.

Faj	Kaynak	İncelenen Suş Sayısı	Litik Profil	Litik Etki Görülen Suş Sayısı (%)
SF-In1	Dışkı-altlık	200 adet S. Infantis	8	177 (88,5)
SF-In3	Atık Su	200 adet S. Infantis	13	169 (84,5)
SF-In4	Dışkı-altlık	200 adet S. Infantis	15	153 (76,5)
SF-In7	Dışkı-altlık	200 adet S. Infantis	1	189 (94,5)
SF-In8	Dışkı-altlık	200 adet S. Infantis	7	178 (89)
SF-In10	Dışkı-altlık	200 adet S. Infantis	12	172 (86)
SF-In12	Atık Su	200 adet S. Infantis	10	175 (87,5)
SF-In16	Atık Su	200 adet S. Infantis	14	167 (83,5)
SF-In18	Dışkı-altlık	200 adet S. Infantis	5	182 (91)
SF-In20	Atık Su	200 adet S. Infantis	2	188 (94)
SF-In21	Atık Su	200 adet S. Infantis	9	176 (88)
SF-In22	Atık Su	200 adet S. Infantis	17	139 (69,5)
SF-In24	Atık Su	200 adet S. Infantis	10	175 (87,5)
SF-In26	Atık Su	200 adet S. Infantis	11	172 (86)
SF-In27	Atık Su	200 adet S. Infantis	16	149 (74,5)
SF-In28	Dışkı-altlık	200 adet S. Infantis	12	172 (86)
SF-In31	Dışkı-altlık	200 adet S. Infantis	6	179 (89,5)
SF-In33	Dışkı-altlık	200 adet S. Infantis	7	178 (89)
SF-In35	Atık Su	200 adet S. Infantis	4	184 (92)
SF-In37	Atık Su	200 adet S. Infantis	3	186 (93)
SF-In38	Atık Su	200 adet S. Infantis	11	172 (86)

3.5. RAPD-PCR Analizi Bulguları

Tez çalışmasında izolasyonları yapılan fajların, kaynakları, RTD verileri, litik spektrum ve profil verileri değerlendirildi. Buna göre, litik profilleri farklı fajlar içinden litik spektrumları geniş (%90 ve üzeri) olduğu belirlenen toplamda 5 adet *S. Infantis* fajı (SF-In7, SF-In18, SF-In20, SF-In35, SF-In37) RAPD-PCR ile moleküler tiplendirme amacıyla seçildi.

RAPD-PCR analizinde en az bir polimorfik bantın görülmesi ile fajlar farklı olarak değerlendirildi. Litik spektrumları %90 ve üzeri olan *S. Infantis* fajların tamamının (n: 5) RAPD-PCR analizi sonucunda SF-In35, SF-In37 fajlarının benzer band sayısına sahip olup benzer pattern yapısında olduğu, SF-In7, SF-In18, SF-In20 fajlarının ise birbirinden ve SF-In35, SF-In37 fajlarından farklı olduğu belirlendi. Bu sonuçlara göre 5 adet *S. Infantis* fajı arasından, homoloji düzeyleri birbirinden farklı olup en yüksek litik spektruma sahip (SF-In7, %94,5; SF-In20, %94) olan SF-In7, SF-In20 fajları faj-bakteri dinamikleri ve deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere seçildi.

3.6. Faj-Bakteri Dinamikleri Bulguları

İlk aşamada bakteriyofaj uygulamalarında kullanılabilecek fajların seçiminden sonra, uygulama koşullarında kullanılacak değerleri elde etmek için faj-bakteri dinamikleri incelendi. Bu çalışmalardan aşağıdaki bulgular sağlandı.

3.6.1. Minimal Faj ve Minimal Bakteri Sayısı Bulguları

Minimal faj ve minimal bakteri sayısının belirlenmesi için deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajları ve bu fajların konak bakterisi olan 1 adet *S. Infantis* suşu ile yapılan çalışmaların sonuçları Çizelge 3.4’de gösterildi. Buna göre faj enfeksiyonu için gerekli minimal *S. Infantis* sayıları 7.4×10^4 - 8.2×10^4 cfu/ml ve minimal faj sayıları 5.8×10^4 – 6.6×10^5 pfu/ml olarak belirlendi.

Çizelge 3.4. *S. Infantis* faj enfeksiyonu için gerekli minimal faj-bakteri sayıları.

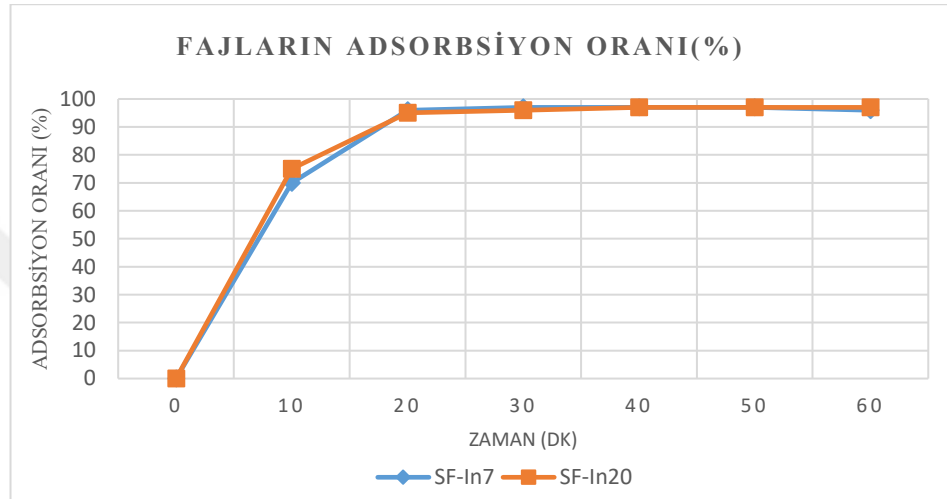
Faj tipi	Konak suş sayısı	Minimal	
		Faj sayısı (pfu/ml)	Bakteri sayısı (cfu/ml)
SF-In7	1	5.8×10^4	8.2×10^4
SF-In20	1	6.6×10^4	7.4×10^4

3.6.2. Faj Adsorbsiyon Oranı Bulguları

Salmonella-faj enfeksiyonunda fajın konak bakteriye bağlanması için gerekli süreyi gösteren adsorbsiyon oranları belirlenmesi için seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajları ve bu fajların konak bakterisi olan 1 adet *S. Infantis* suşu yapılan çalışmaların sonuçları Çizelge 3.5’de gösterildi. Toplam 2 adet *S. Infantis* fajının 10-60 dakikalar arasındaki adsorbsiyon oranları birbirine yakın bulundu ve önemli bir fark olmadığı görüldü (Şekil 3.4.). Bu sonuçlara göre, 2 fajın ortalama %95’inin 20 dk içinde konak hücreye adsorbe olduğu belirlendi.

Çizelge 3.5. S. Infantis fajlarının zamana bağlı adsorbsiyon oranları.

Faj tipi	Konak suş sayısı	Zamanda (10-60 dak) adsorbsiyon oranı (%)					
		10	20	30	40	50	60
SF-In7	1	70	96	97	97	97	97
SF-In20	1	75	95	96	97	97	97



Şekil 3.4. S. Infantis fajlarının zamana (dakika) bağlı adsorbsiyon eğrileri.

3.6.3. Latent Süre Bulguları

Çalışmada, seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajlarının aktivasyona geçebilmesi için gereken latent süreler incelendiğinde, bu iki fajın konak S. Infantis suşu için latent sürelerin sırasıyla 57 dk ve 65 dk olduğu belirlendi.

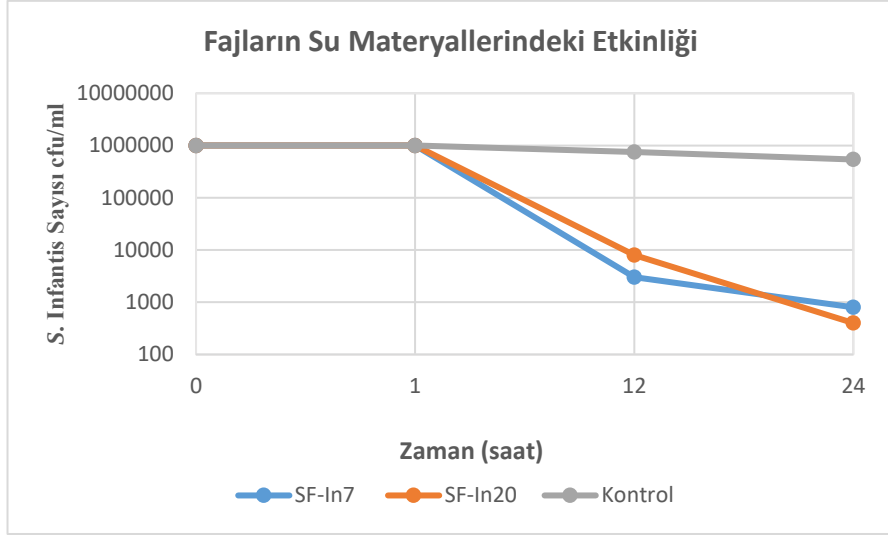
3.7. Deneyisel Çalışma Bulguları

3.7.1. Fajların Etkinliğinin Saptanması Bulguları

Çalışmada belirtilen kriterlere göre seçilen ve faj enfeksiyonu için parametreleri belirlenen SF-In7 ve SF-In20 fajlarının kendi konağı olan *S. Infantis* suşu üzerindeki etkileri ve etki süreleri incelendi. Her bir test edilen materyal için farklı zamanlarda yapılan ölçümlerin de verileri olmasına rağmen, bir örnekliliği sağlamak için grafiklerde 1, 12 ve 24'üncü saat ölçümleri değerlendirmeye alındı.

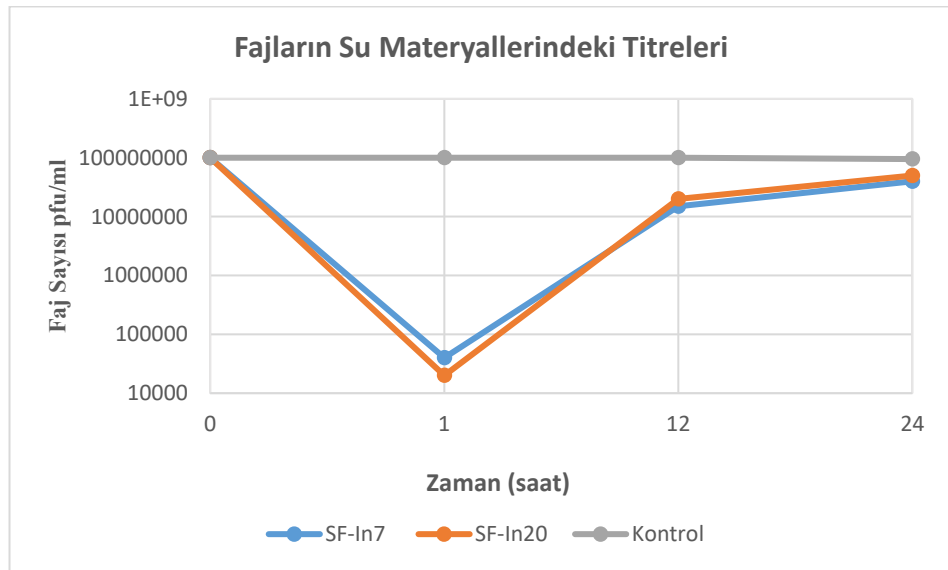
3.7.1.1. Fajların Su Materyallerindeki Etkinliği Bulguları

Tez çalışmasında deneysel olarak *S. Infantis* suşu inokule edilen su materyalinde yapılan çalışmaların sonuçları Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da gösterildi. Bu sonuçlara göre 10^6 cfu/ml *S. Infantis* içeren su materyaline 10^9 pfu/ml yoğunluktaki faj eklendiğinde, ilk saat canlı bakteri sayısında herhangi bir değişimin görülmediği, 12'nci saatte bakteri sayısında kontrole göre yaklaşık $3 \log_{10}$ cfu/ml azalma görüldüğü, 24 saatte ise fajların canlı bakteri sayısını ml'de 400-800 cfu/ml ($p < 0,001$)'e kadar düşürebildiği görüldü. Sonuç olarak seçilen iki fajın su materyalinde *Salmonella* sayısını 24 saatte yaklaşık olarak $4 \log_{10}$ cfu/ml ($p < 0,001$) azalttığı belirlendi. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının konak bakteri üzerinde etkileri arasında sayısal farklılık olduğu, ancak etkinin paralel seyrettiği bulundu.



Şekil 3.5. Deneysel yolla *S. Infantis* inokule edilen sularda SF-In7 ve SF-In20 fajlarının zaman içindeki (saat) etki eğrileri.

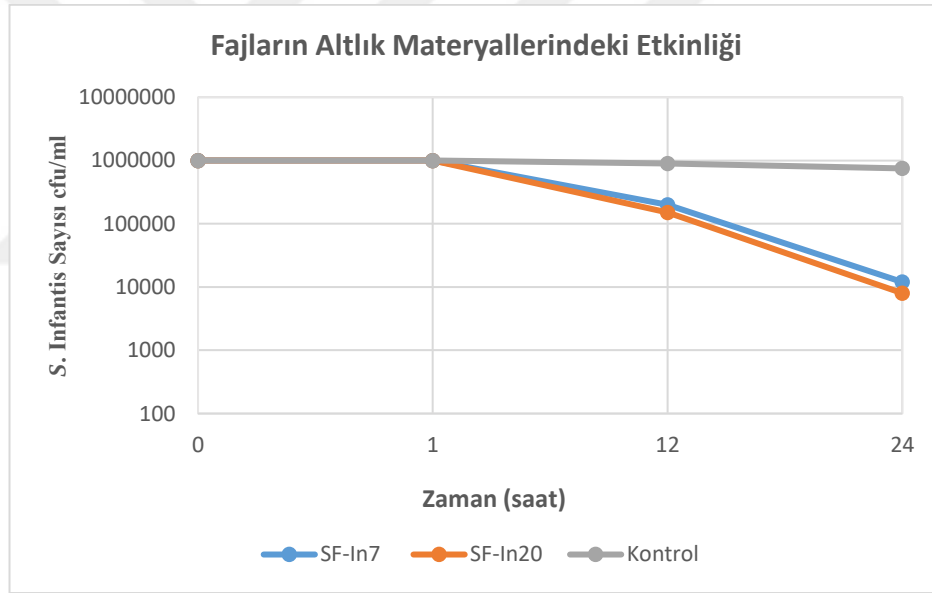
Faj sayımları incelendiğinde ise ilk saate faj titresinde $4 \log_{10}$ pfu/ml olarak belirgin bir azalma görüldü, 12'nci saatte ise faj sayısında (pfu/ml) $3 \log_{10}$ pfu/ml artma görüldü. 24 saatte ise sayısal artma görülmesine karşın logaritmik olarak sayının sabit kaldığı ya da $1 \log_{10}$ pfu/ml arttığı belirlendi. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının titre verileri arasında farklılık olduğu, ancak etkinin paralel seyrettiği bulundu.



Şekil 3.6. Deneysel yolla *S. Infantis* inokule edilen sularda SF-In7 ve SF-In20 fajlarının zaman içindeki (saat) titre eğrileri.

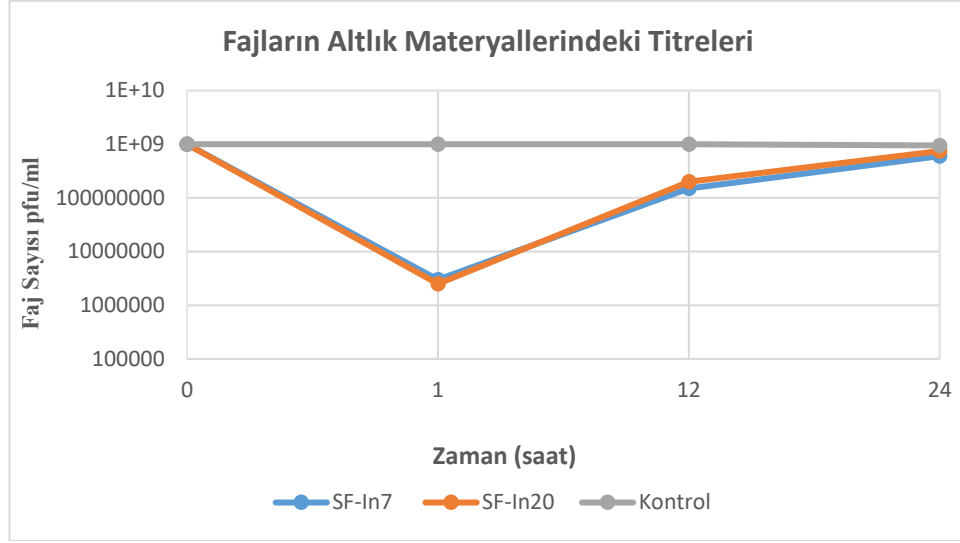
3.7.1.2 Fajların Altlık Materyallerindeki Etkinliği Bulguları

Tez çalışmasında deneysel olarak *S. Infantis* suşu inokule edilen altlık materyalinde yapılan çalışmaların sonuçları Şekil 3.7 ve Şekil 3.8’de gösterildi. Bu sonuçlara göre, 10^6 cfu/ml *S. Infantis* içeren altlık materyaline 10^9 pfu/ml yoğunluktaki faj eklendiğinde, ilk saat canlı bakteri sayısında herhangi bir değişimin görülmediği, 12. saatte bakteri sayısında kontrole göre yaklaşık 1 log₁₀ cfu/ml azalma görüldüğü, 24 saatte ise bu sayının $1,2 \times 10^4$ - 8×10^3 cfu/ml ($p < 0,001$) olduğu belirlendi. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının konak bakteri üzerinde etkileri arasında sayısal farklılık olduğu, ancak etkinin paralel seyrettiği bulundu.



Şekil 3.7. Deneysel yolla *S. Infantis* inokule edilen altlıkta SF-In7 ve SF-In20 fajlarının zaman içindeki (saat) etki eğrileri.

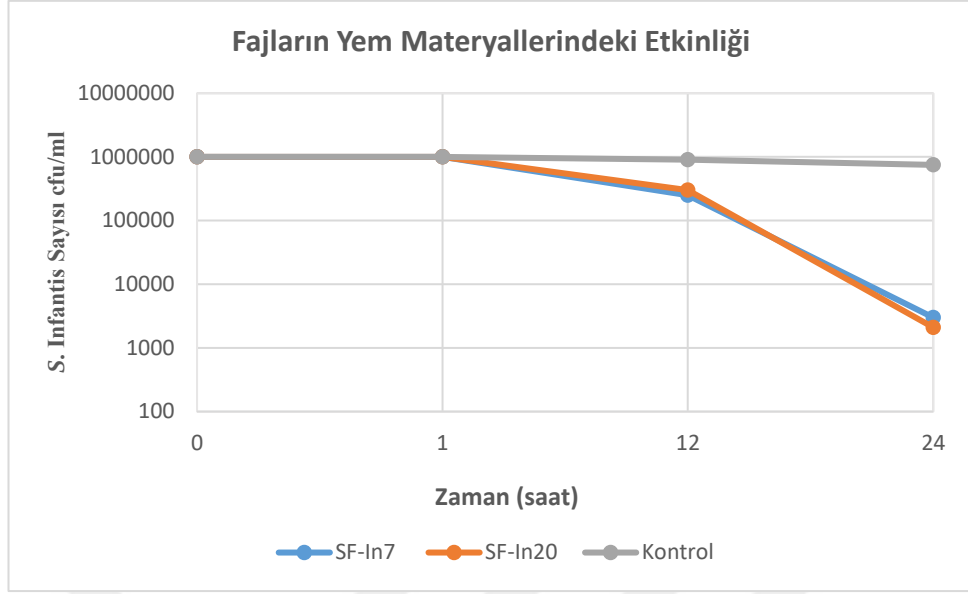
Faj sayımları incelendiğinde ise ilk saat faj titresinde 3 log₁₀ azalma görüldü, 12. saatte ise faj sayısında (pfu/ml) 2 log₁₀ artma görüldü. 24 saatte ise 0,5 log₁₀ pfu/ml arttığı belirlendi. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının titre verileri arasında farklılık olduğu, ancak etkinin paralel seyrettiği bulundu.



Şekil 3.8. Deneysel yolla *S. Infantis* inokule edilen altılıkta SF-In7 ve SF-In20 fajlarının zaman içindeki (saat) titre eğrileri.

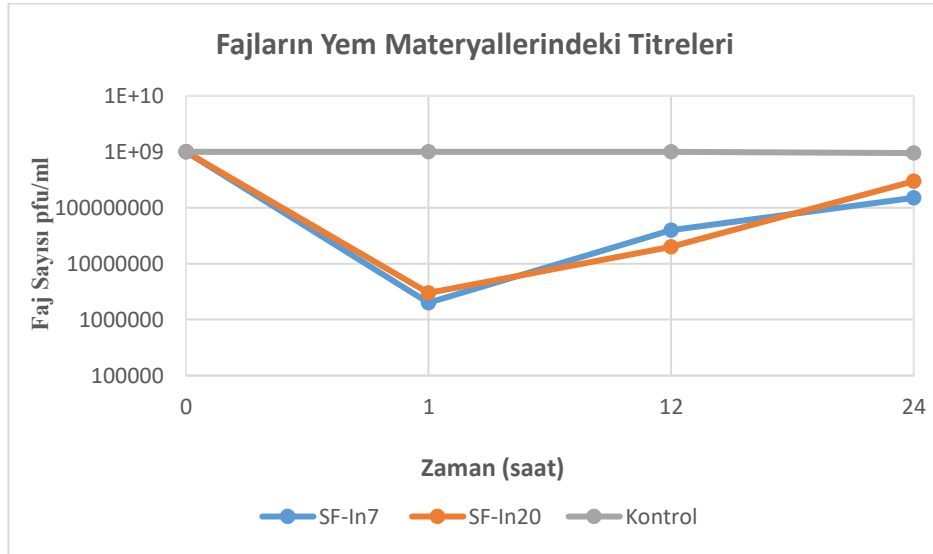
3.7.1.3. Fajların Yem Materyallerindeki Etkinliği Bulguları

Tez çalışmasında deneysel olarak *S. Infantis* suşu inokule edilen yem materyalinde yapılan çalışmaların sonuçları Şekil 3.9 ve Şekil 3.10’da gösterildi. Bu sonuçlara göre 10^6 cfu/ml *S. Infantis* içeren yem materyaline 10^9 pfu/ml yoğunluktaki faj eklendiğinde, canlı bakteri sayısında altılık ve sudaki gibi ilk saate herhangi bir değişim görülmedi. 12’nci saatte bakteri sayısında kontrole göre yaklaşık 2 $\log_{10}$ cfu/ml azalma görüldüğü, 24 saatte ise bu sayının 3×10^3 - $2,1 \times 10^3$ cfu/ml ($p < 0,001$) olduğu belirlendi. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının konak bakteri üzerinde etkileri arasında sayısal farklılık olduğu, ancak etkinin paralel seyrettiği bulundu.



Şekil 3.9. Deneysel yolla *S. Infantis* inokule edilen yemde SF-In7 ve SF-In20 fajlarının zaman içindeki (saat) etki eğrileri.

Faj sayımları incelendiğinde ise altlıkta alınan sonuçlara benzer sonuçlar alındı. İlk saate faj titresinde 3 log₁₀ pfu/ml azalma görüldü, 12'nci saatte ise faj sayısında (pfu/ml) 1 log₁₀ artma görüldü. 24 saatte ise 1 log₁₀ pfu/ml arttığı belirlendi. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının titre verileri arasında farklılık olduğu, ancak etkinin paralel seyrettiği bulundu.



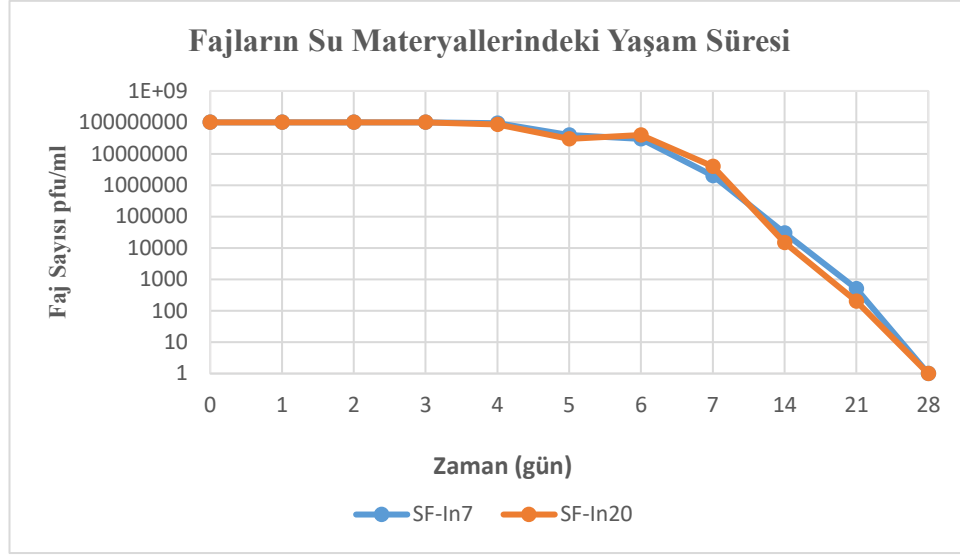
Şekil 3.10. Deneysel yolla *S. Infantis* inokule edilen yemde SF-In7 ve SF-In20 fajlarının zaman içindeki (saat) titre eğrileri.

3.7.2. Fajların Yaşam Süresinin Saptanması Bulguları

Çalışmada belirtilen kriterlere göre seçilen ve faj enfeksiyonu için parametreleri belirlenen SF-In7 ve SF-In20 fajlarının konak hücre bulundurmayan bir ortamda yaşam süreleri araştırıldı.

3.7.2.1. Fajların Su Materyallerindeki Yaşam Süresi Bulguları

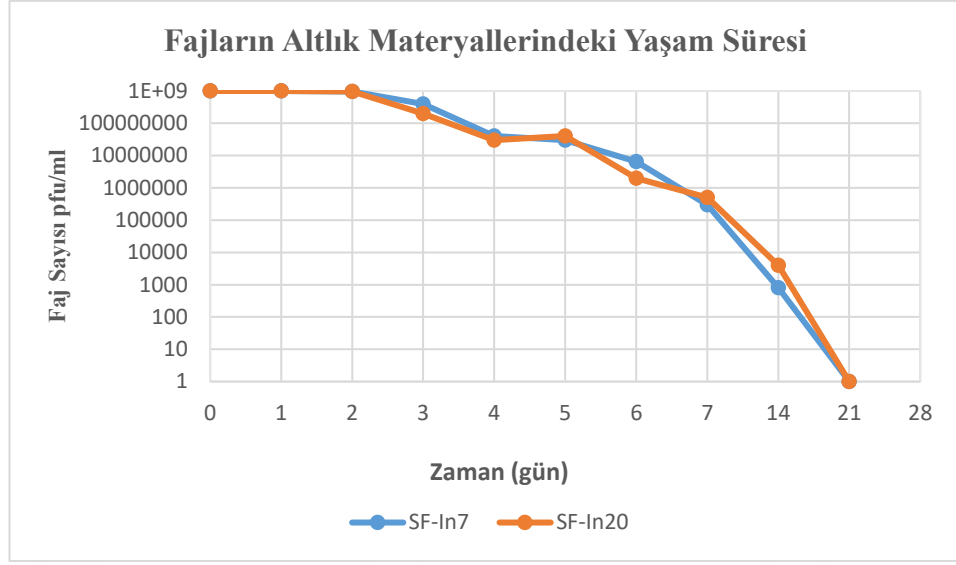
Tez çalışmasında seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajları ile konak hücre bulundurmayan su materyalinde yapılan çalışmaların sonuçları Şekil 3.11’de gösterildi. Bu sonuçlara göre su materyaline 10^9 pfu/ml yoğunluktaki faj eklendiğinde, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü gün faj titresinin değişmediği (10^8 pfu/ml), beşinci gün faj titresinin 1 $\log_{10}$ azaldığı, altıncı gün faj titresinin değişmediği, yedinci günde ise 1 $\log_{10}$ daha azalma görüldüğü tespit edildi. Faj titresinin yedinci gün sonunda başlangıç titresine oranla toplamda 2 $\log_{10}$ azaldığı bu azalmaya rağmen fajların yaşamaya devam ettiği tespit edildi. Bununla birlikte su materyalinde yaşamaya devam eden fajlardan devam eden üç hafta süreyle de her hafta tekrar sayım yapıldı ve dördüncü hafta sonunda faj titresini elde edilemedi. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının titre verileri arasında sayısal farklılık olduğu, ancak etkinin paralel seyrettiği bulundu.



Şekil 3.11. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının su materyalinde zaman içindeki (gün) titre eğrileri.

3.7.2.2. Fajların Altlık Materyallerindeki Yaşam Süresi Bulguları

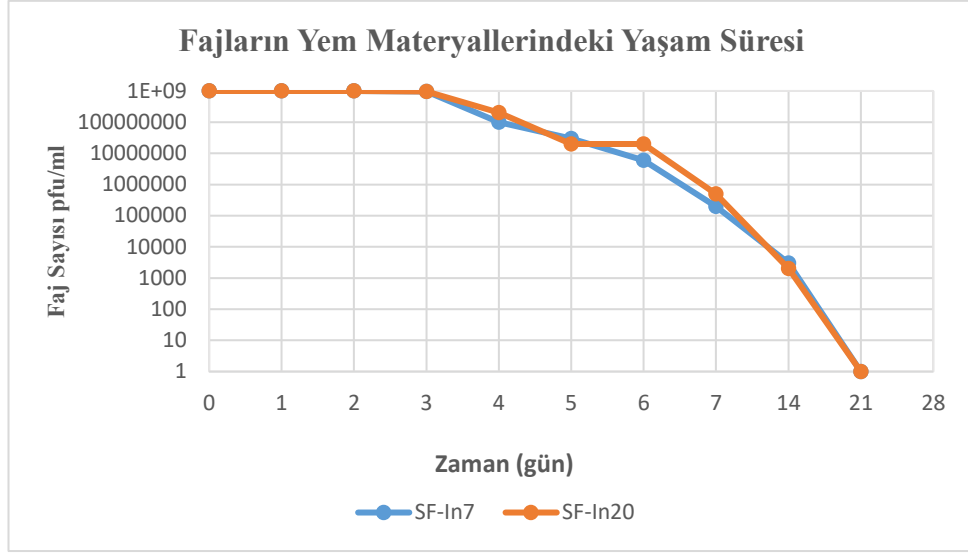
Tez çalışmasında seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajları ile konak hücre bulundurmeyen altlık materyalinde yapılan çalışmaların sonuçları Şekil 3.12’de gösterildi. Bu sonuçlara göre altlık materyaline pulverizasyonla 10^9 pfu/ml yoğunluktaki faj eklendiğinde, birinci ve ikinci gün faj titresinin değişmediği (10^9 pfu/ml), üçüncü gün titrenin 1 $\log_{10}$ azaldığı belirlendi. Faj titresinin dördüncü gün 1 $\log_{10}$ daha azaldığı, beşinci gün değişmediği, altıncı ve yedinci günde ise toplamda 1,5 $\log_{10}$ daha azalma görüldüğü tespit edildi. Faj titresinin yedinci gün sonunda başlangıç titresine oranla toplamda 3,5 $\log_{10}$ azaldığı bu azalmaya rağmen fajların yaşamaya devam ettiği belirlendi. Altlık materyalinde iki hafta süreyle de her hafta tekrar sayım yapıldı. Ancak üçüncü hafta sonunda faj titresini elde edilemedi. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının titre verileri arasında sayısal farklılık olduğu, ancak etkinin paralel seyrettiği bulundu.



Şekil 3.12. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının altlık materyalinde zaman içindeki (gün) titre eğrileri.

3.7.2.3. Fajların Yem Materyallerindeki Yaşam Süresi Bulguları

Tez çalışmasında seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajları ile konak hücre bulundurmeyen yem materyalinde yapılan çalışmaların sonuçları Şekil 3.13’de gösterildi. Bu sonuçlara göre yem materyaline pulverizasyonla 10^9 pfu/ml yoğunluktaki faj eklendiğinde, birinci, ikinci ve üçüncü gün faj titresinin değişmediği (10^9 pfu/ml), dördüncü ve beşinci gün titrenin 1’er $\log_{10}$ azaldığı, altıncı ve yedinci günde ise toplamda 1,5 $\log_{10}$ daha azalma görüldüğü tespit edildi. Faj titresinin yedinci gün sonunda başlangıç titresine oranla toplamda 3,5 $\log_{10}$ azaldığı bu azalmaya rağmen fajların yaşamaya devam ettiği tespit edildi. Yem materyalinde yaşamaya devam eden fajlardan devam eden üç hafta süreyle de her hafta tekrar sayım yapıldı. Ancak üçüncü hafta sonunda faj titresini elde edilemedi. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının titre verileri arasında sayısal farklılık olduğu, ancak etkinin paralel seyrettiği bulundu.



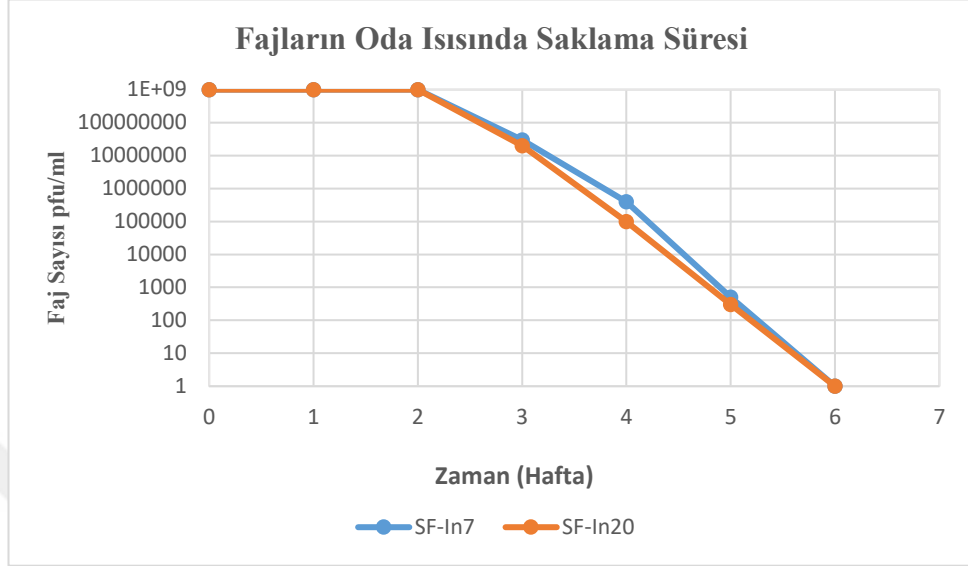
Şekil 3.13. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının yem materyalinde zaman içindeki (gün) titre eğrileri.

3.7.3. Fajların Saklama Süresinin Saptanması Bulguları

Çalışmada belirtilen kriterlere göre seçilen ve faj enfeksiyonu için parametreleri belirlenen SF-In7 ve SF-In20 fajlarının saklanma ve kullanılabilirlik süresi tespit edildi. Tez çalışmasının bu aşamasına 2014 yılının Temmuz ayında başlandı ve ölçümler bu tarihe göre ayarlanıp son ölçüm 2018 Temmuz ayında yapıldı. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının titre verileri arasında sayısal farklılık olduğu, ancak etkinin paralel seyrettiği bulundu.

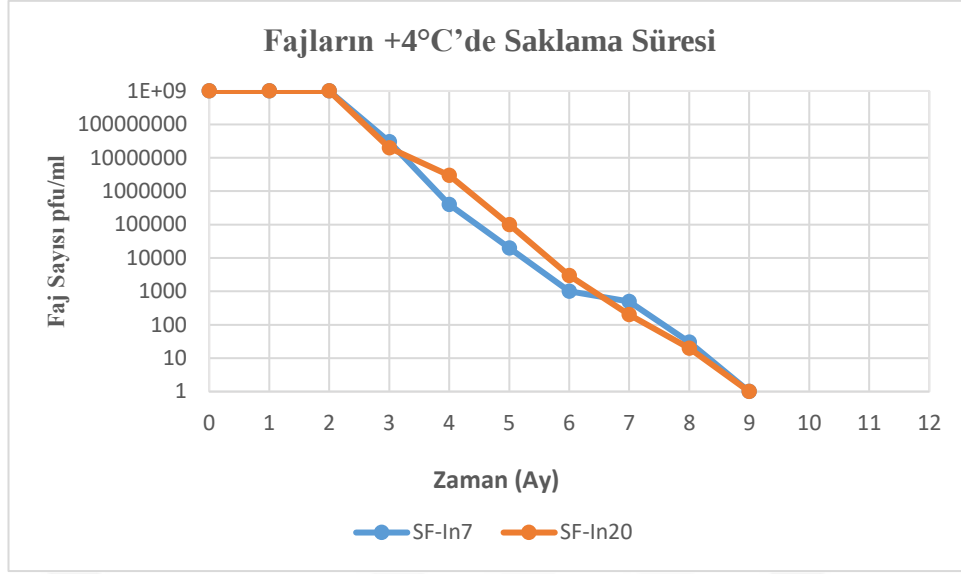
Seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajlarının oda ısısında (20-22°C) zaman içindeki faj titre sonuçları Şekil 3.14’de gösterildi. Fajların titre tespit çalışmalarında, ilk hafta her gün yapılan titre ve aktivite ölçümlerinde herhangi bir değişiklik görülmedi. Bu sebeple yapılan ölçümler grafiklerde değerlendirilmeye alınmadı. Bu sonuçlara göre fajların ilk iki hafta faj titrelerinde herhangi bir değişim görülmedi. Faj titresinin üçüncü hafta sonunda yapılan sayımlarda 2 log₁₀, dördüncü hafta sonunda yapılan sayımlarda ise tekrar 2 log₁₀ azaldığı, beşinci haftada ise faj titresinin logaritmik

azalışını sürdürdüğü ve toplamda 3 log₁₀ azaldığı tespit edildi. Son olarak altıncı hafta sonunda yapılan ölçümlerde ise faj titresi elde edilemedi.



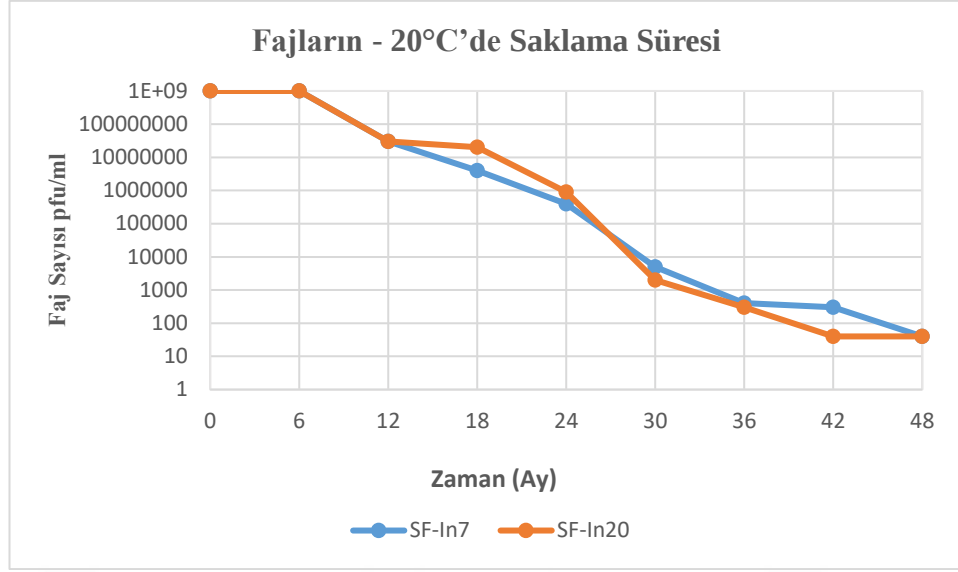
Şekil 3.14. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının oda ısısında zaman içindeki (hafta) titre eğrileri.

Seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajlarının +4°C’de zaman içindeki faj titre sonuçları Şekil 3.15’de gösterildi. Fajların titre tespit çalışmalarında, ilk hafta her gün ve ilk bir ay her hafta yapılan titre ve aktivite ölçümlerinde herhangi bir değişiklik görülmedi. Bu sebeple yapılan ölçümler grafiklerde değerlendirilmeye alınmadı. Bu sonuçlara göre fajların ilk iki ay faj titrelerinde herhangi bir değişim görülmedi. Faj titresinin üçüncü ay yapılan sayımlarda 2 log₁₀ azaldığı, dördüncü, beşinci ve altıncı ayda ise faj titresinin logaritmik azalışını sürdürdüğü ve toplamda 4 log₁₀ azaldığı tespit edildi. Titrenin yapılan sayımlarda yedinci ve sekizinci ayda ise toplam 2 log₁₀ azaldığı görüldü. Son olarak dokuzuncu ayda yapılan ölçümlerde ise faj titresi elde edilemedi.



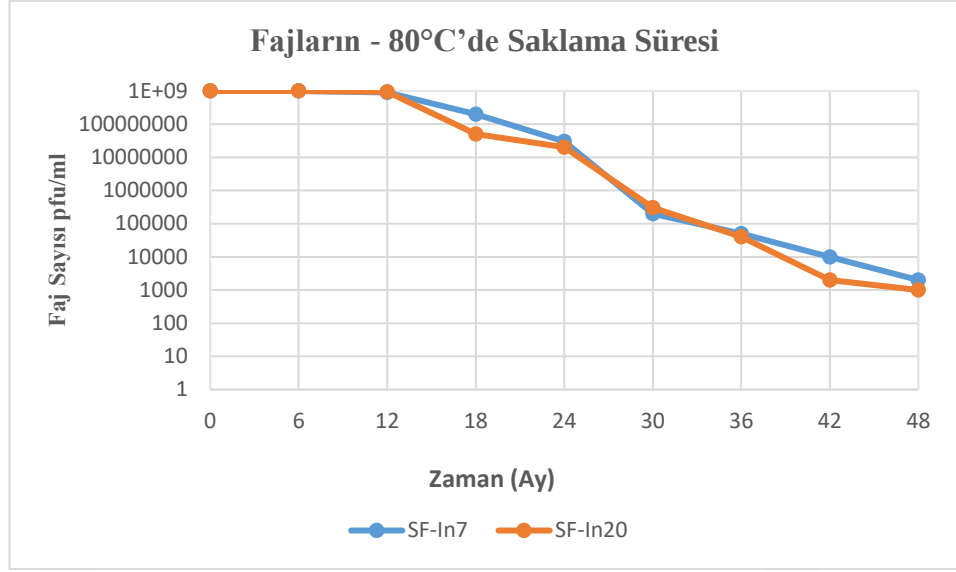
Şekil 3.15. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının +4°C’de zaman içindeki (ay) titre eğrileri.

Seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajlarının -20°C’de zaman içindeki faj titre sonuçları Şekil 3.16’da gösterildi. Fajların titre tespit çalışmalarında, ilk hafta her gün ve ilk bir ay her hafta yapılan titre ve aktivite ölçümlerinde herhangi bir değişiklik görülmedi. Bu sebeple yapılan ölçümler grafiklerde değerlendirilmeye alınmadı. Bu sonuçlara göre fajların ilk yıl aylık ölçümler yapıldı ve onbirinci ve onikinci aylarda yapılan ölçümlerde faj titrelerinde toplam 2 log₁₀ azalma tespit edildi. Fajların ikinci yıl üç ayda bir yapılan titre ölçümlerinde toplamda 2 log₁₀ daha azalma görüldü. Devam eden üçüncü yıl altı ayda bir yapılan ölçümlerde, ilk altı ay faj titresinin 2 log₁₀ azaldığı ikinci altı ayda ise 1 log₁₀ daha azaldığı belirlendi. Son olarak dördüncü yılın sonunda 1 log₁₀ azalma ile faj titresinin başlangıca oranla toplamda 8 log₁₀ azaldığı fakat yaşamaya devam ettiği belirlendi.



Şekil 3.16. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının -20°C'de zaman içindeki (ay) titre eğrileri.

Seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajlarının -80°C'de zaman içindeki faj aktivitesi ve titre sonuçları Şekil 3.17'de gösterildi. Fajların titre tespit çalışmalarında, ilk hafta her gün ve ilk bir ay her hafta yapılan titre ve aktivite ölçümlerinde herhangi bir değişiklik görülmedi. Bu sebeple yapılan ölçümler grafiklerde değerlendirilmeye alınmadı. Bu sonuçlara göre fajların ilk yıl aylık ölçümler yapıldı ve faj titrelerinde herhangi bir değişim görülmedi. Faj titre ölçümlerinde ikinci yıl üç ayda bir yapılan ölçümlerde toplamda 2 log₁₀ azalma görüldü. Devam eden üçüncü yıl altı ayda bir yapılan ölçümlerde, ilk altı ay faj titresinin 2 log₁₀ azaldığı ikinci altı ayda ise 1 log₁₀ daha azaldığı belirlendi. Son olarak dördüncü yılın sonunda 1 log₁₀ azalma ile faj titresinin başlangıça oranla toplamda 6 log₁₀ daha azaldığı fakat yaşamaya devam ettiği belirlendi.



Şekil 3.17. SF-In7 ve SF-In20 fajlarının -80°C’de zaman içindeki (ay) titre eğrileri.

4. TARTIŞMA

Salmonella tüm dünyada oldukça yaygın, kanatlı hayvanlarda önemli ekonomik kayıplara yol açan, zoonotik, insanlarda önemli gıda kaynaklı enfeksiyonlara sebep olabilen bir patojendir (Akan, 2008 ve Shi ve ark., 2015). İnsanlarda *Salmonella*'nın neden olduğu enfeksiyonlardaki artış, bu patojenin önemini gün geçtikçe arttırmaktadır. Bu nedenle *Salmonella* enfeksiyonlarını hayvansal üretim aşamasında önlemek veya kontrol altına almak için kontrol programları uygulanmaktadır (Akan, 2008). Özellikle *Salmonella*'nın kanatlı hayvanlara bulaşmasında, temel olarak yem, su, kontamine kümes altlığı, diğer hayvanlar ve çevresel kaynakların rolü vardır. (Boynukara ve Aydın, 1990; Garber ve ark., 2003 ve Grimiont ve Weill, 2007). EFSA'nın 2016 yılı raporunda, *S. Infantis*'in insanlarda halen en yaygın dördüncü serotip olarak önemini koruduğu bildirilmiştir (EFSA, 2017). Türkiye'de ise yapılan çeşitli çalışmalar da kanatlılarda en sık izolasyonu yapılan serotipin *S. Infantis* olduğu bildirilmiştir (Buğdaycı, 2007; Gülüşen ve ark., 2015 ve Şahan ve ark., 2012).

Özellikle *Salmonella*'larda artan antimikrobiyal direnç, bu enfeksiyonun önlenmesi ve kontrol edilmesinde alternatif tedavilere ilginin artmasına sebep olmuştur. Bakteriyofajların insanlarda tedavi amacıyla kullanımı uzun yıllardan beri bilinmektedir (Cox ve ark., 2011). Bakteriyofajlar bakterileri enfekte eden ve öldüren viruslardır, spesifik bakterileri hedef alırlar, konak özgüllüğünden dolayı, diğer mikrobik popülasyonlar etkilenmez (Borie ve ark, 2008). Tüm bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında *S. Infantis* için dekontaminasyon ajanı olarak litik bakteriyofajların izole edilmesi ve bu fajların bulaşma kaynağı olan su, yem ve altlık materyallerinde deneysel çalışmalarla etki, yaşam ve saklama sürelerinin belirlenmesi amaçlandı.

Faj izolasyon çalışmalarında litik fajları izole etmek için konak olarak kullanılan bakteri suşlarının lizojeniteye sahip olup olmaması önemli bir kriterdir. Çünkü izole edilen bakteriyofajın, lizojenik formdan litik forma geçip geçmediği bilinemediğinden biyokontrol amaçlı kullanımlarda tekrar lizojenik forma geçmesi problem teşkil edebilir (Raya ve Hebert, 2009). Yapılan çalışmalarda *Salmonella*'ların lizojenik fajları barındırdığı (Mocuta ve ark., 2017 ve Shin ve ark., 2012) bazı çalışmalarda da barındırmadığı bildirilmektedir. Sillankorva ve ark. (2009)'nın çalışmalarında kanatlılarda faj tedavisi uygulaması için *S. Enteritidis* bakteriyofajlarının izolasyonu yapılmış ve izolasyonda kullanılan 25 adet *S. Enteritidis* suşunun tamamının lizojenitesi kontrol edilmiştir. Çalışmada kontrol edilen suşların hiçbirinde lizojenite belirlenememiştir. Benzer olarak bu tez çalışmasında da izolasyon aşamasında bakteriyofajların konak hedef hücreleri olarak kullanılan kanatlı orijinli 10 adet *S. Infantis* izolatının hiçbirinde lizojenite saptanamadı. Bu sebeple lizojenite kontrolü yapılan tüm suşlar faj izolasyonunda konak hücre olarak kullanıldı.

Salmonella fajlarının izolasyonunda, havuzlanmış dışkı-altlık materyalleri ve kanalizasyon suyu zengin bir kaynak olarak en sık kullanılan materyallerdir (Akhtar ve ark., 2014; Huang ve ark., 2018; İbrahim ve ark., 1969 ve O'Flynn ve ark., 2006). Bu sebeple bu tez çalışmasında dışkı-altlık ve atık su örnekleri faj izolasyon materyali olarak belirlendi. Çeşitli çalışmalarda, kullanılan materyallerden *Salmonella* faj izolasyon oranları incelediğinde ise farklı veriler mevcuttur. Bardina ve ark. (2012)'nin *S. Typhimurium*'u konak hücre olarak kullandıkları çalışmada toplam 189 dışkı örneğinden 55 adet *Salmonella* fajı (%29,1), Cortes ve ark. (2015)'nin *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis*'i konak hücre olarak kullandıkları çalışmalarında 191 adet dışkı materyalinden 55 adet *Salmonella* fajı (%28,8), Borrie ve ark. (2008), *S. Enteritidis*'i konak hücre olarak kullandıkları çalışmalarında ise 57 adet atık su materyalinden toplam 8 litik *Salmonella* (%14,03) fajı izole edilmiştir. Bu çalışmaların hiçbirinde *S. Infantis* fajı araştırılmamıştır. *Salmonella* *Infantis*'in konak hücre olarak kullanıldığı bu tez çalışmasında ise incelenen 50 atık su ve 50 altlık-dışkı materyalinden toplam 38 adet *S. Infantis* (%38) fajı saf olarak agar

overley yöntemi ile izole edildi. Genel izolasyon oranları karşılaştırıldığında bu oran Bardina ver ark. (2012), Cortes ve ark. (2015) ve Borrie ve ark. (2008)'nın çalışmalarından farklı olarak daha yüksektir. Bu farklılığın, çalışmalarda kullanılan konak hücre serotipinden kaynaklandığı, Türkiye'de en yaygın serotip olan S. Infantis'in bu tez çalışmasında konak olarak seçilmesinin, faj izolasyon şansını ve oranını artırdığı düşünüldü.

Bununla beraber, bu tez çalışmasında kullanılan materyalden izolasyon miktarı incelendiğinde dışkı-altlık örneklerine (%47,36) kıyasla atık su örneklerinden (%52,63) daha fazla oranda faj izole edildi. Huang ve ark. (2018), çalışmalarında benzer olarak kanalizasyon örneklerinden 15 adet (%42,85) farklı *Salmonella* fajını izole etmiş fakat izole edilen fajların çeşitliliği ile ilgili bir veri verilmemiştir. Bununla beraber materyallerden izole edilen fajların çeşitliliği incelendiğinde bu tez çalışmasında dışkı-altlık örneklerinden 7 farklı litik profilde faj, atık su örneklerinden ise 10 farklı litik profilde faj izolasyonu yapıldı. Özetle bu iki materyalden izole edilen fajların toplam 17 farklı litik profile sahip olduğu belirlendi. Ayrıca yine bu iki materyal grubundan tamamen birbirinden farklı litik spektruma sahip 21 fajın belirlenmesi kullanılan iki materyalin birbirinden üstünlüğünün olmadığını ve faj çeşitliliğini arttırmak için iki materyalinde izolasyon için kullanılması gerektiğini gösterdi.

Fajların, faj tedavisi ve biyokontrol ajanı olarak kullanılmaları için yüksek titreli olmaları gerekmektedir. Bu sebeple izolasyonu yapılan fajlar tedavi çalışmalarında kullanılmadan önce RTD'ları belirlenmelidir. Bu tez çalışmasında izole edilen 38 S. Infantis fajının RTD'ları incelendi ve 17 fajın RTD, 10^4 'ün altında bulundu. Pasaj yapılarak konsantrasyonları arttırılamayan bu 17 adet faj daha sonraki aşamalarda kullanılmadı. Bilimsel literatür incelendiğinde izolasyonu yapılan fajların RTD verileri çalışmalarda verilmediğinden karşılaştırma yapılamamıştır. Tez çalışmasında izole edilen 17 fajın titrelerinin arttırılamamasının sebebi, kullanılan konak suşların fajın kendi konağı olmamasına bağlanmıştır.

Fajların biyokontrol ajanı olarak kullanılabilirmeleri ve etkili olabilmeleri için diğer bir kriter de geniş litik spektruma sahip olmasıdır. Bu sebeple izolasyonu yapılan fajların etkili oldukları bakteri spektrumu incelenip farklılık açısından litik profilleri belirlenmelidir. Birçok çalışmada izolasyonu yapılan fajların litik spektrumları belirlenmiş kullanılacak fajlar en geniş spektruma sahip olmasına göre seçilmiştir (Atterbury ve ark., 2007; Bao ve ark., 2011; Huang ve ark., 2018; Rivera ve ark., 2018 ve Quiroz ve ark., 2016). Bu tez çalışmasında RTD 1×10^4 'ün üzerinde olan 21 *S. Infantis* fajının her birinin 200 adet *S. Infantis*, suşundaki litik spektrumları belirlenerek en geniş spektruma sahip (%90 ve üstü) fajlar seçilmiştir. Ancak tez çalışmasında seçim yapılırken tek kriter litik spektrumlarının genişliği olmamış, bunun yanında fajların birinden farklı olmasını sağlamak için litik profiller çıkarılarak litik profilleri birbirinden farklı fajlar seçilmiştir. Atterbury ve ark. (2007)'nın çalışmalarında da benzer olarak faj seçimi yapılırken litik spektrumlara ek olarak litik profillere bakılmıştır. Aynı çalışmada toplam 232 *Salmonella* fajı izole edilmiş ve her bir fajın farklı serotiplerden oluşan 70 *Salmonella* suşunda litik spektrum verileri değerlendirilerek 232 fajdan 80 farklı (%34,4) litik profil bulunmuştur. Cortes ve ark. (2015) çalışmalarında 55 adet *Salmonella* fajının farklı serotiplerden oluşan 67 *Salmonella* suşunda litik spektrumlarını belirleyerek 39 (%70) farklı lizis profili elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında ise litik spektrumuna bakılan 21 fajdan 17 farklı (%80) litik profil tespit edildi. Bu oran Atterbury ve ark. (2007) ile Cortes ve ark. (2015)'nin çalışmalarında buldukları orandan fazladır. Tez çalışmasında tek bir *Salmonella* serotipine (*S. Infantis*) ait fajların çalışılması ve fazla sayıda (200 adet) *S. Infantis* suşu üzerinde litik spektrum ve profil belirlenmesi faj çeşitliliğini arttırmıştır. Sonuçta tez çalışmasında litik spektrumu en geniş ve litik profilleri birbirinden farklı fajlar seçilerek, fenotipik tiplendirmeye ek olarak genotipik tiplendirmeye tabi tutulmuştur.

Bakteriyofajların litik spektrumları arasındaki farklar küçük olduğunda, faj izolatlarının aynı olmadığından emin olmak için daha fazla karakterizasyon gereklidir. Bu sebeple fajlar fenotipik tiplendirmeye ek olarak genotipik olarak da tiplendirilir (Atterbury ve ark., 2007). Moleküler yöntemlerden RAPD-PCR tekniği

fajların genotipik olarak tiplendirilmesinde ucuz, kolay ve daha kısa bir yöntem olması ve fajları %100 tiplendirebilmesi sebebiyle kullanılmaktadır (Cortes ve ark., 2015 ve Gutierrez ve ark., 2011). Bu sebeple, bu tez çalışmasında da RAPD-PCR yöntemi, litik profilleri farklı fajlar içinden litik spektrumları geniş (%90 ve üzeri) olduğu belirlenen toplamda 5 adet *S. Infantis* fajının (SF-In7, SF-In18, SF-In20, SF-In35, SF-In37) genotipik olarak tiplendirmesi amacıyla kullanıldı. RAPD-PCR yönteminde farklı primerler kullanılmış ve bu primerlerin ayırım güçleri karşılaştırılmıştır (Cortes ve ark., 2015 ve Gutierrez ve ark., 2011). Cortes ve ark. (2015)'nın çalışmalarında RAPD-PCR'da kullanılan 3 farklı primerden (P1, P2 ve OPL5), P1 primerinin 34 farklı PCR paterni ile en yüksek ayırım kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu sebeple bu tez çalışmasında hem yüksek ayırım kapasitesine sahip olmasından dolayı P1 primeri kullanıldı. Cortes ve ark. (2015) çalışmalarında 55 adet *Salmonella* fajının RAPD-PCR'ı sonucu 40 farklı profil (%70,73 farklılık) elde etmişler ve çıkardıkları litik profillerle kıyasladıklarında RAPD-PCR profilleri ile litik profillerin birbiri ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu tez çalışmasında incelenen litik profilleri farklı 5 *S. Infantis* fajından 4 farklı (%80 farklılık) RAPD profili elde edildi ve iki fajın (SF-In35, SF-In37) tamamen benzer band sayısına sahip olduğu belirlendi. Yapılan çalışmalarda (Fiorentin ve ark., 2004) litik profil ve RAPD band profili uyumsuzluğunun farklı primerler denenerek ortadan kalkabileceği bildirildiğinden, litik profillerinin farklı olup RAPD band profillerinin aynı olması durumunun farklı primerler kullanıldığında ortadan kalkabileceği düşünüldü. Tez çalışmasında bu sonuçlara göre 5 adet *S. Infantis* fajı arasından, homoloji düzeyleri birbirinden farklı olduğu belirlenen ve en yüksek litik spektruma sahip (SF-In7, %94,5; SF-In20, %94) olan SF-In7, SF-In20 fajları faj-bakteri dinamikleri ve deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere seçildi.

Faj-bakteri dinamikleri denildiğinde, faj enfeksiyonu için gerekli minimum bakteri ve faj sayıları, fajın konağına adsorbe olma oranı, farklı latent dönem süreleri gibi parametrelerin araştırılması gereklidir (Soykut ve Tunail, 2009). Bilimsel literatür incelendiğinde sadece *S. Infantis* fajlarının faj parametreleri ile ilgili

alışmalara rastlanamamakla birlikte farklı bakteri fajları ve farklı serotipe ait *Salmonella* fajları üzerinde çalışmalar mevcuttur. Wiggins ve Alexander (1985) yaptıkları çalışmada farklı fajların (*Staphylococcus aureus* 80α fajı, *Bacillus subtilis* SPβcI fajı, *Escherichia coli* T4 fajı) oğalması için minimum bakteriyel yoğunluğunu araştırmışlardır. Bu çalışmada, faj yoğunluğunun ortalama 10^4 ile 10^6 arasında, konakçı yoğunluğunun ise yaklaşık 10^4 cfu/ml eşiğinin altında olduğu ortamlarda herhangi bir etki gösteremedikleri belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında ise seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajları ve bu fajların konak bakterisi olan 1 adet *S. Infantis* suşu ile yapılan çalışmalar sonucunda faj enfeksiyonu için gerekli minimal *S. Infantis* sayıları $7,4 \times 10^4$ - $8,2 \times 10^4$ cfu/ml ve minimal faj sayıları $5,8 \times 10^4$ - $6,6 \times 10^5$ pfu/ml olarak belirlendi. Bu bulguların Wiggins ve Alexander (1985)'ın çalışmalarında bulunduğu sonuçlarla birebir uyumlu olduğu anlaşıldı.

Bakteriyofaj enfeksiyonunun ilk basamağı, bir duyarlı konak hücre üzerine faj partiküllerinin bağlanması olarak tanımlanan adsorpsiyon sürecidir. Yüksek bir adsorpsiyon oranına sahip olan fajlar genellikle optimal lizis süreleri daha kısa olduğundan, faj enfeksiyonu sırasında bakteriye daha hızlı etki ederler (Shao ve Wang, 2008). Bu sebeple çalışmalarda yüksek adsorbsiyon oranına sahip fajlar kullanılmaktadır. *Salmonella* serotiplerine ait fajların adsorbsiyon özelliklerini araştıran yeterince çalışma bulunmamaktadır. Rahaman ve ark. (2014)'nın çalışmalarında kümes hayvanlarından izole edilen *Salmonella* fajının (SAL-PG), konak bakteri *S. Gallinarum* zerindeki faj adsorpsiyon çalışmaları ile SAL-PG fajının %95'inin, 15 dk içinde konak bakteriye adsorbe olabildiğini belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajlarının adsorbsiyon oranları incelendi ve 2 adet *S. Infantis* fajının, ortalama %95'inin 20 dk içinde konak hücreye adsorbe olduğu belirlendi. Tez alışmasında Rahaman ve ark. (2014)'nın çalışmalarında belirlediği oranla birebir uyumlu olduğu fakat farklı olarak adsorbsiyon süresinin 20 dk olmasının, ölçümlerin 10 dkda bir yapılmasından kaynaklandığı kanısına varıldı. Tez çalışmasında seçilen iki adet fajın yüksek adsorbsiyon oranına sahip olması biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceğini düşündürdü.

Faj latent periyodu, fajların konak hücreye bağlanmasından lizise kadar geçen dönemdir. Faj-bakteri enfeksiyonunda daha hızlı faj adsorbsiyonu ve daha kısa latent periyot, konak popülasyonların kontrolünü daha hızlı kılmaktadır. Bununla beraber, yapılan çalışmalarda bazen fajların daha uzun latent periyotlarının, kısa periyoda nazaran daha fazla faj partikülü de üretebileceği bildirilmiştir (Abedon ve ark., 2001). Ayrıca yapılan çalışmalarda farklı bakteri fajları için farklı latent periyot süreleri mevcuttur. Wiggins ve Alexander (1985)'ın çalışmalarında *S. aureus* fajı 80α için 40-90 dk, *B. subtilis*'in fajı SPβ cI için 45-60 dk, *E. coli*'nin bakteriyofajı T4 için 25-30 dk latent periyot süreleri belirlemişlerdir. Mirzaei ve Nilsson (2015) yaptıkları bir çalışmada, faj tedavisi için kullanılma potansiyeli olan virulent 6 adet *E. coli* fajının latent periyotlarının 17-47 dk arasında olduğunu bildirmişlerdir. *Salmonella* fajları içinde benzer şekilde farklı latent periyot süreleri mevcuttur. Mahmoud ve ark. (2018)'nın çalışmalarında, 3 adet *Salmonella* fajının latent periyotlarını 35 dk, 40 dk ve 60 dk olarak belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında ise seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajlarının, konak *S. Infantis* suşu için latent sürelerinin sırasıyla 57 dk ve 65 dk olduğu belirlendi. Yapılan çalışmalarla (Mirzaei ve Nilsson, 2015 ve Wiggins ve Alexander, 1985) karşılaştırıldığında bu tez çalışmasında test edilen fajların latent periyot sürelerinin daha uzun olduğu belirlendi. Ancak bu tez çalışması sonuçlarının *Salmonella* fajları ile yapılan Mahmoud ve ark (2018)'nın çalışmasındaki latent periyot süreleri ile benzerlik göstermesi *Salmonella* fajlarının daha uzun latent periyot sürelerine sahip olabileceğini düşündürdü.

Bakteriyofaj çalışmaları, kanatlı üretiminden başlayarak kümes uygulamaları (yem, altlık, su, yüzey gibi materyaller), hayvanlarda kolonizasyonu önlemek veya azaltmak için hayvan uygulamaları, ya da gıda uygulamalarını kapsayabilmektedir. Literatürde *Salmonella* fajları ile, *Salmonella* kolonizasyonunun tavuklarda azaltılması (Atterbury ve ark., 2007; Bardina ve ark., 2012 ve Borie ve ark., 2008) üzerine ve insanlara *Salmonella* geçişini azaltmak amacıyla gıda maddelerinde ve gıda hazırlama bölgelerin de *Salmonella* kontaminasyonunun önlenmesi ve azaltılması üzerine birçok çalışma mevcuttur (Duc ve ark., 2018; Grant ve ark., 2017; Huang ve ark., 2018; Spricigo ve ark., 2013; Thung ve ark., 2017 ve Woolston ve ark.

2013). Ancak bulaşma kaynağı olan su, altlık ve yem materyallerinde *in vitro* olarak *S. Infantis* fajlarının etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında ise izolasyonu ve parametreleri belirlenen geniş konak aralığı olan SF-In7 ve SF-In20 fajlarının, deneysel olarak *S. Infantis* inoküle edilen su, altlık ve yem numunelerinde *Salmonella* kontaminasyonunu azaltmadaki etkinlikleri literatürde ilk kez araştırıldı. Bu tez çalışmasında seçilen iki fajın, 24 saatte, su materyalinde canlı bakteri sayısını yaklaşık olarak $4 \log_{10}$ cfu/ml ($p < 0,001$) azalttığı, altlık materyalinde ise canlı bakteri sayısını yaklaşık olarak $2-3 \log_{10}$ cfu/ml ($p < 0,001$) azalttığı, yem materyalinde ise canlı bakteri sayısını yaklaşık olarak $3 \log_{10}$ cfu/ml ($p < 0,001$) azalttığı belirlendi. Tüm materyallerde ilk bir saatte sonuç alınamazken, bakteri sayısının azalmasında en iyi etkinlik ilk 12 saatte tespit edilmiş, ancak en iyi sonuçlar 24'üncü saatin sonunda belirlenmiştir. Faj etkinlik bulguları materyal açısından değerlendirildiğinde aynı koşullarda olmalarına rağmen (sabit bakteri sayısı, faj sayısı, sıcaklık, vb.) canlı *S. Infantis* sayısındaki en fazla azalmanın [$4 \log_{10}$ cfu/ml ($p < 0,001$)] diğer materyallere oranla su materyalinde gerçekleştiği görüldü. Bunun sebebinin, su materyalinin bakteriyofajların en çok izole edildiği doğal ortamı olması, diğer materyallere kıyasla suda inhibe edici birçok faktörün bulunmaması ve fajların sıvı ortamlarda konak hücre reseptörleri ile buluşmasının daha kolay olacağından, bakterileri infekte etme şanslarının fazla olması ile açıklanabileceği düşünüldü.

Literatürdeki birçok çalışma (Atterbury ve ark., 2007; Borie ve ark., 2008; Bardina ve ark., 2012, Duc ve ark., 2018; Grant ve ark., 2017; Huang ve ark., 2018; Spricigo ve ark., 2013 ve Thung ve ark., 2017) dikkatle incelendiğinde fajlarla yapılan çalışmalarda alınan en temel sonuç, serotip spesifik faj kullanılsa dahi 24 saat sonra ortamdaki *Salmonella*'ların tamamen giderilememesidir. Bu tez çalışmasında da benzer olarak tüm materyallerde 24'üncü saatin sonunda, canlı bakteri sayısında yaklaşık $2-4 \log_{10}$ cfu/ml ($p < 0,001$) azalma belirlenmesine rağmen *S. Infantis*'lerin tamamen giderilemediği belirlendi. Bunun en önemli nedeninin, faj-bakteri temasının ilerleyen saatlerinde faj direncinin gelişmesi olabileceği kanısına varıldı. Faj direnci önemli bir sorun teşkil etse de fajların tüm materyallerde bakterilerin sayısını önemli

düzeyde azaltması, bakteri dekontaminasyonu için *S. Infantis* fajlarının kullanım potansiyelinin olduğu kanısına varıldı.

Yapılan bir çalışmada fajlar özellikle bakteriyel enfeksiyondan önce materyallere uygulandığında hem enfeksiyonu hem de bakteriyel kontaminasyonu belirli ölçüde engelledikleri bildirilmiştir (Bardina ve ark., 2012). Bu sebeple fajların konak hücre bulundurmeyen ortamlarda, konak bakteri ile karşılaşana kadar ne kadar canlı kalabildikleri önemlidir. Fajların *in vitro* yaşam süresini belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır, fakat bu çalışmaların büyük çoğunluğu balık patojenlerinin fajları üzerinedir. Balık patojenlerinin fajlarının yaşam süresini belirleyen çalışmalarda (Madsen ve ark., 2013; Nakai ve ark., 1999 ve Pereira ve ark., 2011) farklı bakterilere ait fajlara ilişkin farklı yaşam süreleri mevcuttur. Bu açıdan bakıldığında fajların yaşam sürelerinin konak bakteriye, kullanılan faja ve içinde bulunduğu materyele göre değişiklik gösterdiği söylenebilir. Bu tez çalışmasında seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajlarının konak hücre bulundurmeyen su, yem ve altlık materyallerinde yaşam süresi tespit edildi. Bilimsel literatür taramalarında *S. Infantis* için su, altlık ve yem materyallerinde yapılan faj yaşam süresi çalışmalarına rastlanamamıştır. Bu sebeple bu çalışma bir ilk olma özelliği taşımaktadır. Bu tez çalışmasında, fajların tüm materyallerde titrelerindeki azalmaya rağmen bir hafta süre canlı kaldığı tespit edildi. Bu bir hafta içerisinde titre bazında başlangıça oranla su materyalinde 2 log₁₀, altlık ve yem materyalinde ise 3,5 log₁₀ azalma belirlendi. Yaşam süreleri değerlendirildiğinde ise fajlar su materyalinde 4 hafta, altlık ve yem materyallerinde ise 3 hafta canlılığını korudu. Bu tez çalışmasında, faj yaşam süresi bulguları materyal açısından değerlendirildiğinde aynı koşullarda olmalarına rağmen en uzun faj yaşam süresi su materyalinde gerçekleştiği görüldü. Bu durumun diğer materyallerle (altlık, yem) kıyaslandığında su materyalinde kurumanın olmamasından, diğer materyallerde ise kuruma meydana geldiği için yüzey geriliminin artması ve buna bağlı olarak faj titrelerinde düşüş meydana gelmesinden kaynaklandığı düşünüldü. Sonuç olarak tez çalışmasında seçilen iki adet fajın konak hücre bulundurmeyen tüm materyallerde uzun yaşam süresine sahip olması dekontaminasyonda kullanılabileceğini düşündürdü.

Faj çalışmalarında, fajların stoğunu korumak, süresiz olarak muhafaza etmek ve orijinal fajın özelliklerini (titre, genetik vb.) korumak çok önemlidir (Fortier ve Moineau, 2009). Özellikle fajların biyokontrol ajanı olarak ya da tedavi amaçlı kullanımlarında, fajları muhafaza etmek ve sürekliliği sağlamak için saklanma süresinin bilinmesi gereklidir. Bu tez çalışmasında seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajlarının oda ısısı, +4 °C, -20°C ve -80°C’de saklanma ve kullanılabilirlik süresi literatürde ilk defa araştırıldı. Fajların saklama sürelerine ilişkin çeşitli çalışmalar (Bourdin ve ark., 2014; Madsen ve ark., 2013; Ngangbam ve Devi, 2012; Warren ve Hatch, 1969 ve Zierdt, 1988) yapılmıştır. Fakat çalışmalarda fajların oda ısısında saklama süresi ile ilgili verilere rastlanamamıştır. Bu tez çalışmasında seçilen fajların, oda ısısında (20-22°C) 6 hafta süreyle canlılığını koruduğu fakat titrelerinin logaritmik olarak düzenli bir şekilde azaldığı tespit edildi. Koşullar düşünüldüğünde (oda ısısı, konak hücre bulunmaması, fajların virüs özellikleri taşıması, vb. gibi) bu sürenin faj çalışmalarında fajları transfer etmek ve saklamak için uygun bir süre olduğu düşünüldü. Warren ve Hatch (1969)’in T3 kolifajının 72 gün boyunca 4°C ve -20°C’de saklandığında saklama süresini ve stabilitesini inceledikleri çalışmalarında, T3 kolifajının -20°C’de dondurularak tutulduğunda nispeten stabil olmasına rağmen, 4°C’de 72 gün boyunca saklandığında, titresinde 2 log₁₀ kayıp olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında +4°C’de, ilk 2 ay fajların titrelerinde herhangi bir değişim görülmedi bununla beraber fajlar, titreleri logaritmik olarak azalarak 9 ay süre ile canlılıklarını korudu. -20°C’de, ilk 10 ay fajların titrelerinde herhangi bir değişim görülmedi ve toplamda 4 yıl sonunda 8 log₁₀ azalarak hala yaşamaya devam etti. Bu bulgular Warren ve Hatch (1969) çalışmalarına benzer olarak fajların dondurulduğunda daha stabil olduğu ve daha uzun süre yaşadığını gösterdi. Ayrıca literatür taramalarında rastlanan *Salmonella* fajları üzerine tek çalışma olan Ngangbam ve Devi (2012)’nin çalışmalarında da *Salmonella* fajları 4°C ve -20°C’de 2 hafta gibi kısa süre saklandığında titrelerinin değişmeden kaldığı belirlenmiştir. Bu bulgular, tez çalışmasındaki bulgularla birebir uyum göstermektedir. Bu tez çalışmasında, seçilen fajlar -80°C’de saklandıklarında ise ilk yıl fajların titrelerinde herhangi bir değişim görülmedi ve toplamda 4 yıl sonunda 6 log₁₀ azaldığı fakat hala yaşamaya devam ettiği belirlendi. Ackermann ve ark. (2004), *Brucella*, *Vibrio* ve *Aeromonas* fajlarının -80°C’de sıvı nitrojenle tutulduğunda 5 yıla kadar

yaşayabileceğini ve 5 yılda bir çoğaltılması gerektiğini bildirmişlerdir. Bu açıdan bakıldığında tez çalışmasında -80°C’de fajların dördüncü yıl sonundaki ölçümlerde hala yaşamaya devam etmesi bu fajların Ackermann ve ark. (2004)’nın çalışmalarında bildirdikleri verilere benzer olarak 5 yıla kadar yaşayabileceğini düşündürdü. Sonuç olarak tez çalışmasında kullanılan bu iki fajın saklama sürelerinin dekontaminasyon ve biyokontrol ajanı olarak kullanımlarında transfer ve saklanma için yeterli olduğu kanısına varıldı.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Türkiye’de en çok izole edilen kanatlı *Salmonella* serotipi olan *S. Infantis*’in bakteriyofajlarının izolasyonu yapıldı ve bu fajların 200 adet *S. Infantis* suşu üzerinde konak spektrumu belirlendi. Ayrıca çalışmada izolasyonu yapılan ve konak aralığı belirlenen bu fajlardan seçilen, RTD’ları yüksek (1×10^9 pfu/ml) , litik spektrumları geniş olan (%90 üstü), birbirinden farklı iki adet *S. Infantis* fajının (SF-In7, SF-In20) su, altlık ve yem numunelerinde etki ve yaşam süreleri ile ayrıca bu fajların saklama süreleri araştırıldı.

Çalışmada incelenen 50’si dışkı-altlık ve 50’si atık su olmak üzere 100 materyalden toplam 38 adet *S. Infantis* fajı izole edildi ve %38’lik yüksek bir oranla *Salmonella* fajlarının birçok çevresel örnekten izolasyonun yapılabileceği sonucuna ulaşıldı. Çalışmada genotipik olarak birbirinden farklı olan ve faj-bakteri dinamikleri belirlenen SF-In7 ve SF-In20 fajlarının 20 dk da %95 ile yüksek bir adsorbsiyon oranı ve sırasıyla 57 dakika ve 65 dakika latent dönem süresine sahip olmasıyla konak bakterisini hızlı ve etkili bir şekilde infekte edebileceği anlaşıldı. Deneysel çalışmalarda SF-In7 ve SF-In20 fajlarının 24 saatte canlı *S. Infantis* sayısını su materyalinde $4 \log_{10}$ cfu/ml ($p < 0,001$), altlık ve yem materyalinde $2-3 \log_{10}$ cfu/ml ($p < 0,001$) azaltmasıyla tam olarak giderilemese bile özellikle *S. Infantis* kontaminasyonunu azaltmada biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceği ve böylece çapraz bulaşmaların azaltılabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmada SF-In7 ve SF-In20 fajlarının konak hücre bulundurmayan su materyalinde 4 hafta, altlık ve yem materyallerinde ise 3 hafta canlılığını korumasıyla *S. Infantis* kontaminasyonunu önlemek amacıyla kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Tez çalışmasında SF-In7 ve SF-In20 fajlarının oda ısısında ($20-22^\circ\text{C}$) 6 hafta, $+4^\circ\text{C}$ ’de 9 ay, -20°C ve -80°C ’de ise 4 yıldan fazla canlılıklarını korumaları sebebiyle saha, kümes, kesimhane gibi ortamlarda uygulanmadan önce uzun süre kolaylıkla saklanabileceği bununla beraber

özellikle ticari olarak faj üretimi esnasında da uzun yıllar faj preparatlarının kaybedilmeden korunabileceği sonucu çıkarılmıştır.

Bu sonuçlar doğrultusunda çalışmada kullanılan fajların konak *S. Infantis* suşlarını tam olarak ortadan kaldıramamasının sebebinin faj direnci kapsamında daha ileri çalışmalarla araştırılması gerektiği düşünüldü. Ayrıca fajların özellikle genomik olarak tüm genom sekanslama ile daha ayrıntılı incelemesi yapılması ve birbirinden farklı fajların bir arada (kokteyl) kullanılması ile çapraz etki gösterip bakterilerdeki faj direncini azaltıp azaltmadığının belirlenmesi gerektiği anlaşıldı. Bununla birlikte bakteriyofaj uygulamasının kesimhaneye giden kanatlı hayvanların *Salmonella* yükünü ve dolayısıyla çapraz bulaşmaları azaltmada kullanılması için ayrıca saha denemelerinin de yapılması önerildi.

ÖZET

Tavuk Dışkıları ve Çevresel Örneklerden *Salmonella* Infantis Fajlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Bu tez çalışmasında, Türkiye’de en çok izole edilen kanatlı *Salmonella* serotipi olan *S. Infantis*’in bakteriyofajlarının izolasyonu ve bu fajların konak spektrumunun belirlenmesi ayrıca bu fajların su yem ve altlık materyallerindeki etki, yaşam süreleri ve saklama sürelerinin saptanması hedeflendi.

Çalışmada, Ankara ve Bolu illerinde yer alan kanatlı işletmelerinden ve kanatlı mezbahalarından toplanan 50 adet dışkı-altlık ve 50 adet atık su örneğinden agar overlay metodu ile 38 adet *S. Infantis* fajı izole edildi. Bu fajların, Rutin Test Dilüsyonları ve 200 adet *S. Infantis* suşunda litik spektrumları ve litik profilleri agar-overlay ve spot test metodları kullanılarak belirlendi ve ayrıca genotipik karakterizasyon amacıyla RAPD-PCR metodu uygulandı.

Çalışmalar sonucunda tüm veriler analiz edildi. Bu analiz sonucunda, litik profilleri ve RAPD homoloji düzeyleri birbirinden farklı olup en yüksek litik spektruma sahip (SF-In7, %94,5; SF-In20, %94) olan fajlarının faj-bakteri dinamikleri çalışmaları yapıldı. Bu fajların adsorbsiyon oranı 20 dk da %95 ve latent dönelerim sırasıyla 57 dk ve 65 dk olarak belirlendi. Deneysel çalışmalarda SF-In7 ve SF-In20 fajlarının 24 saatte canlı *S. Infantis* sayısını su materyalinde 4 log₁₀ cfu/ml (p<0,001), altlık ve yem materyalinde 2-3 log₁₀ cfu/ml (p<0,001), azalttığı, konak hücre bulundurmayan su materyalinde 4 hafta, altlık ve yem materyallerinde ise 3 hafta yaşadığı tespit edildi. Ayrıca çalışmada, SF-In7 ve SF-In20 fajlarının oda ısıda (20-22°C) 6 hafta, +4 °C’de 9 ay, -20°C ve -80°C’de ise 4 yıldan fazla canlılıklarını korudukları belirlendi.

Çalışma sonucunda, SF-In7 ve SF-In20 fajlarının *S. Infantis* kontaminasyonunu azaltmada biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceği, geniş saklama ısısı ve uzun yaşam süresi sebebiyle saha, kümes, kesimhane gibi ortamlarda uygulanmadan önce uzun süre kolaylıkla saklanabileceği, bununla beraber özellikle ticari olarak faj üretimi esnasında da uzun yıllar faj preparatlarının kaybedilmeden korunabileceği sonucu çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyofaj, Biyokontrol, Kanatlı, *Salmonella* Infantis.

SUMMARY

Isolation and Characterization of *Salmonella* Infantis Phages from Poultry Faces and Environmental Samples

In this study, isolation of bacteriophage of *S. Infantis* which is the most isolated *Salmonella* serotype of Turkey in poultry, and detection of its host spectrum were aimed. It was also aimed to determine the effect, lifespan and retention time of these phages on the water, feed and substrate materials.

In the study, 38 *S. infantis* phages were isolated by the agar overlay method from 50 stool-underlays and 50 wastewater samples collected from poultry farm and slaughterhouses in Ankara and Bolu provinces. These phages were determined using routine test dilutions and lytic spectra and lytic profiles in 200 *S. infantis* strains using agar-overlay and spot test methods and also the RAPD-PCR method for genotypic characterization.

As a result of the studies, all data were analyzed. As a result of this analysis, the phage-bacterial dynamics of the phage, whose lytic profiles and RAPD homology levels were different and with the highest lytic spectrum (SF-In7, 94.5%; SF-In20, 94%) were studied. The adsorption rate of these phages was found to be 95% at 20 minutes. And latent periods were determined as 57 minutes and 65 minutes, respectively. In experimental studies, it was determined that the phages of SF-In7 and SF-In20 decreased the live *S. infantis* number in 24 hours by 4 log₁₀ cfu/ml ($p<0,001$), in water and 2-3 log₁₀ cfu/ml ($p<0,001$), in substrate and feed materials. It was determined that these bacteriophages live for 4 weeks in the water material with no host cells, and 3 weeks on the substrate and feed materials without host cells. Furthermore, in the study, it was determined that the phages of SF-In7 and SF-In20 survived for 6 weeks at room temperature (20-22 °C), 9 months at +4 °C, and 4 years at -20 °C and -80 °C.

As a result of the study, it was determined that SF-In7 and SF-In20 phages can be used as biocontrol agents in reducing *S. infantis* contamination. Because these phages have a wide storage temperature and a long lifespan, they can be easily stored for long periods of time before being used in environments such as poultry or slaughterhouses. In addition, it was concluded that phage preparations could be preserved without a loss for many years during commercial phage production.

Keywords: Bacteriophage, Biocontrol, Poultry, *Salmonella* Infantis.

KAYNAKLAR

- ABEDON ST (2008). Phages, ecology, evolution In: *Bacteriophage Ecology* London: Cambridge University Press Chepter 1 **p**:1-27.
- ABEDON ST, HERSCHLER TD, STOPAR D (2001). Bacteriophage Latent-Period Evolution as a Response to Resource Availability *Appl Environ Microbiol.* **67(9)**: 4233-4241.
- ACKERMANN HW, TREMBLAY D, MOINEAU S (2004). Long-term bacteriophage preservation. *World Federation for Culture Collections Newsletter*, **38**: 35–40.
- AKAN M (2008). Kanatlılarda Salmonella İnfeksiyonları ve Kontrolünde Temel Prensipler *Mektup Ank*, **6(2)**: 3-4.
- AKHTAR M, VIAZIS S, DIEZ-GONZALEZ S (2014). Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against *Salmonella enterica* serovars *Food Control*, **38**: 67-74.
- AKSAKAL A (2003). Bazı Kanatlıların Dışkılarında *Salmonella* Türlerinin Varlığı ve Yaygınlığı ile Antibiyotiklere Duyarlılıkları *YYÜ Vet Fak Derg*, **14 (1)**: 95-101.
- ARDA M (2015). TEMEL MİKROBİYOLOJİ. Medisan Yayınevi Ankara. 5. Baskı s: 297-308.
- ATTERBURY RJ, VAN BERGEN MAP, ORTIZ F, LOVELL MA, HARRIS JA, DE BOER A, WAGENAAR JA, ALLEN VM, BARROW PA (2007). Bacteriophage Therapy To Reduce *Salmonella* Colonization Broiler Chickens. *Appl Environ Microbiol*, **73**: 4543-4549.
- BAO H, ZHANG H, WANG R (2011). Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *Poultry Sci*, **90**: 2370–2377.
- BARDINA C, SPRICIGO DA, CORTES P, LLAGOSTERAA M (2012). Significance of the Bacteriophage Treatment Schedule in Reducing *Salmonella* Colonization of Poultry. *Appl Environ Microb*, **78(18)**: 6600–6607.
- BORIE C, ALBALA I, SANCHEZ P, SANCHEZ ML, RAMIREZ S, NAVARRO C, MORALES MA, RETAMALES J, ROBESON J (2008). Bacteriophage Treatment Reduces *Salmonella* Colonization of Infected Chickens. *Avian Dis*, **52**: 64-7.
- BORRIS DJ (2002). TEMPORAL ANALYSIS OF BACTERIOPHAGE FELIX O1 GENE EXPRESSION PhD thesis Faculty of the Virginia Polytechnic Institute, State University, Blacksburg, Virginia, USA.
- BOURDIN G, SCHMITT B, GUY LM, GERMOND JE, ZUBER S, MICHOT L, REUTELER G, BRUSSOW H (2014). Amplification and Purification of T4-Like

Escherichia coli Phages for Phage Therapy: from Laboratory to Pilot Scale. *Appl Environ Microbiol*, **80(4)**: 1469–1476.

BOYNUKARA B, AYDIN F (1990). Tavuklardan İzole Edilen Salmonella Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları Üzerinde Bir Araştırma. *Türk Vet Hek Derg*, **6**: 21-23.

BUGDAYCI NS (2007). Broyler Entegrasyonunda Salmonella Kontrol Programı. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

CAMPBELL A (2003). The future of bacteriophage biology. *Nat Rev Genet*, **4**: 471-477.

CAREY-SMITH GV, BILLINGTON C, CORNELIUS AJ, HUDSON JA, HEINEMANN JA (2006). Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. *FEMS Microbiol Lett*, **258**: 182-186.

CARLTON RM (1999). Phage Therapy: Past History and Future Prospects. *Arch Immunol Ther Exp*, **47**: 267-274.

CORTES P, SPRICIGO DA, BARDINA C, LLAGOSTERA M (2015) Remarkable diversity of *Salmonella* bacteriophages in swine and poultry. *FEMS Microbiol Lett*, **362**: 1-7.

COX N, CASON JA, RICHARDSON LJ (2011). Minimization of *Salmonella* Contamination on Raw Poultry. *Ann Rev Food Sci Technol*, **2**: 75-95.

DUC HM, MINH SH, KEN-ICHI H, MIYAMOTO T (2018). Isolation and application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination in raw chicken meat. *Food Sci Tech-Brazil*, **91**: 353-360.

DUCKWORTH DH, GULING AP (2002). Bacteriophages Potencial Treatment for Bacteriyel Infection. *BioDrugs*, **16(1)**: 57-62.

DURUPINAR B (2005). Bakteriyofajlar Antibiyotiklerin Yerine Kullanılabilir mi? <http://www.klimikdergisi.org/tr/arsivsayi/75/Arşiv/Sayı> Erişim Tarihi: 23.09.2018.

EFSA (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *Efsa Journal*, **15(12)**: 5077

FIELD A (2009). DISCOVERING STATISTICS USING SPSS. Dubai: Oriental Press. Third Edition. Chapter 6 s: 166-196.

FIORENTIN LI, VIEIRA NDI, BARIONI JUNIOR WI, BARROS SII (2004). *In vitro* characterization and in vivo properties of *Salmonellae* lytic bacteriophages isolated from free-range layers. *Rev Bras Cienc Avic*, **6(2)**: 121-128.

FORTIER LC, MOINEAU S (2009). Phage Production and Maintenance of Stocks, Including Expected Stock Lifetimes. IN: *Bacteriophages Methods and Protocols*, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions ed: CLOKIE MRJ, KROPINSKI AM New York, Humana Press **p**: 203-219.

- GARBER L, SMELTZER M, FEDORKA-CRAY P, LADELY S, FERRIS K (2003). *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in table egg layer house environments and in mice in U.S. layer houses and associated risk factors. *Avian Dis*, **47(1)**: 134-142.
- GRANT AQ, PARVEEN S, SCHWARZ J, HASHEM F, VIMINI B (2017). Reduction of *Salmonella* in ground chicken using a bacteriophage *Poultry Sci*, **96**: 2845–2852.
- GRIMONT PAD, WEILL FX (2007). Antigenic Formulae of *Salmonella* serovars WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella Institute Pasteur*, 9th revision.
- GUIBOURDENCE M, ROGENTIN P, MIKOLEIT M, FIELDS PI, BOCKEMUHL J, GRIMONT PA, WEILL FX (2010). Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le minör scheme. *Res Microbio*, **161**: 26-29.
- GULEŞEN R, LEVENT B, UVEY M, AKGEYİK M (2015). 2008-2014 Yılları Arasında Çevresel Örneklerden İzole Edilen *Salmonella* Serotiplerinin Dağılımı ve Antimikrobiyallere Direnç Durumları. 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi. s:231.
- GUTIERREZ D, MARTIN-PLATERO AM, RODRIGUEZ A, MARTINEZ-BUENO M, GARCIA P, MARTINEZ B (2011). Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR to assess genetic diversity. *FEMS Microbiol Lett*, **322**: 90-97.
- HUANG C, VIRK SM, SHI J, ZHOU Y, WILLIAS SP, MORSY MK, ABDELNABBY HE, LIU J, WANG X, LI J (2018). Isolation, Characterization, and Application of Bacteriophage LPSE1 Against *Salmonella enterica* in Ready to Eat (RTE) Foods. *Front Microbiol*, **9**: 1046.
- HYMAN P, ABEDON ST (2009a). Bacteriophage (overview) In: *Desk Encyclopedia of Microbiology* 2nd Ed: SCHAECHTER M USA: Elsevier **p**: 166-182.
- HYMAN P, ABEDON ST (2009b). Practical Methods for Determining Phage Growth Parameters IN: *Bacteriophages Methods and Protocols*, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions ed: CLOKIE MRJ, KROPINSKI AM New York, Humana Press **p**: 175-202.
- IBRAHİM AAE (1969). Bacteriophage Typing of *Salmonella* I. Isolation and Host Range Study of Bacteriophages. *Appl Microbiol*, **18(3)**: 444-447.
- IZGUR M (2002). *Salmonella* İnfeksiyonları In: *Kanathı Hayvan Hastalıkları* Ed: IZGUR M, AKAN M Medisan Yayınevi, Ankara **s**: 41-53.
- IZGUR M (2006). *ENTEROBAKTERİ İNFEKSİYONLARI*. In: *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)* Ed: AYDIN N, PARACIKOĞLU J Ankara: İlke-Emek yayınları, **p**: 109-127.
- KROPINSKI AM, MAZZOCCO A, WADDELL TE, LINGOHR E, JOHNSON PR (2009). Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay IN: *Bacteriophages Methods and Protocols*, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions ed: CLOKIE MRJ, KROPINSKI AM New York, Humana Press **p**: 69-77.

- KUTTER E (2009). Phage Host Range and Efficiency of Plating IN: *Bacteriophages Methods and Protocols*, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions ed: CLOKIE MRJ, KROPINSKI AM New York, Humana Press **p**: 141-151.
- KUTTER E (2001). Bacteriophages In: *Encyclopedia of Genetics* Ed: BRENNER S, MILLER J. USA: Elsevier **p**: 179-186.
- MADSEN L, BERTELSEN SK, DALSGAARD I, MIDDELBOEB M (2013). Dispersal and Survival of *Flavobacterium psychrophilum* Phages *In Vivo* in Rainbow Trout and *In Vitro* under Laboratory Conditions: Implications for Their Use in Phage Therapy. *Appl Environ Microbiol*, **79(16)**: 4853–4861.
- MAHMOUD M, ASKORAB A, BARAKATA AB, RABIEA OEF, HASSANC ES (2018). Isolation and characterization of polyvalent bacteriophages infecting multi drug resistant *Salmonella* serovars isolated from broilers in Egypt. *Int J Food Microbiol*, **266**: 8-13.
- MATTEY M, SPENCER J (2008). Bacteriophage therapy-cooked goose or Phoenix rising? *Curr Opin Biotechnol*, **19**: 608–612.
- MCAULIFFE O, ROSS RP, FITZGERALD GF (2007). The New Phage Biology: from Genomics to Applications In: *Bacteriophage Genetics and Molecular Biology* Ed: MCGRATH S, VAN SINDEREN D UK: Caister Academic Press **p**: 1-43.
- MILLER T, PRAGER R, RABSCH W, FEHLHABER K, VOSS M (2010). Epidemiological relationship between *Salmonella* Infantis isolates of human and broiler origin. *Loh Inform*, **45**: 27-31.
- MIRZAEI MK, NILSSON AS (2015). Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. *PLoS One*, **10(3)**: e0118557.
- MOCUTA N, STETCA G, CHINDRIS V, DAVID A (2017). LYSOGENY AND LYSOSENSITIVITY IN SALMONELLA STRAINS *J Agric Sci*, **3-4 (103-104)**: 146-149.
- NAKAI T, SUGIMOTO R, PARK KH, MATSUOKA S, MORI K, NISHIOKA T, MARUYAMA K (1999). Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Dis Aquat Org*, **37(1)**: 33-41.
- NGANGBAM AK, DEVI NB (2012). Molecular Characterization of *Salmonella* Bacteriophages Isolated from Natural Environment and its Potential Role in Phage Therapy. *Banglad J Microbiol*, **29(1)**: 33-36.
- O'FLAHERTY S, ROSS RP, COFFEY A (2009). Bacteriophage and their lisins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, **33**: 801-819.
- O'FLYNN G, COFFEY A, FITZGERALD GF, ROSS RP (2006). The newly isolated lytic bacteriophages st104a and st104b are highly virulent against *Salmonella* enterica. *J Appl Microbiol*, **101**: 251-259.
- PEREIRA C, SILVA YJ, SANTOS AL, CUNHA A, GOMES NC, ALMEIDA A (2011). Bacteriophages with potential for inactivation of fish pathogenic bacteria: survival,

host specificity and effect on bacterial community structure. *Mar Drugs*, **9(11)**: 2236-55.

QUIN PJ, CARTER ME, MARKEY B, CARTER GR (1999). CLINICAL VETERINARY MICROBIOLOGY. Elsevier Health Sciences **p**: 226-234.

QUIROZ E, RECALDE J, ARIAS MT, SEQQAT R, VINUEZA C, AYALA L (2016). Isolation of Lytic Bacteriophages for Nanobiocontrol of Pathogenic and Antibiotic Resistant *Salmonella* Present in Poultry in Ecuador. *Biol Med (Aligarh)*, **8**: 3.

RAHAMAN M T, RAHMAN M, RAHMAN MB, KHAN MFR, HOSSEN ML, PARVEJ MS, AHMED S (2014). POULTRY SALMONELLA SPECIFIC BACTERIOPHAGE ISOLATION AND CHARACTERIZATION. *Banglad. J Vet Med*, **12(2)**: 107-114.

RAYA, RR, HEBERT EM (2009). Isolation of Phage via Induction of Lysogens. IN: *Bacteriophages Methods and Protocols*, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions ed: CLOKIE MRJ, KROPINSKI AM New York, Humana Press **p**: 23-32.

RIPP S (2010). Bacteriophage-Based Pathogen Detection. *Adv. Biochem Eng Biotechnol*, **118**: 65-83.

RIVERA D, TOLEDO V, PILLO FD, DUENAS F, TARDONE R, HAMILTON-WEST C, VONGKAMJAN K, WIEDMANN M, SWITT AIM (2018). Backyard Farms Represent a Source of Wide Host Range *Salmonella* Phages That Lysed the Most Common *Salmonella* Serovars. *J Food Prot*, **81(2)**: 272-278.

SAHAN O, YILMAZ O, ADEN MM, ASHOUR A, ARAL ME, JAHED R, AKAN M (2012). Tavuk Orijinli *Salmonella* İzolatlarının Serotip Dağılımı. 10. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 330-331.

SANDERS ME, KLAENHAMMER TR (1980). Restriction and modification in group N streptococci: effect of heat on development of modified lytic bacteriophage. *Appl Environ Microbiol*, **40(3)**: 500-6.

SENGUL SS, TURKYILMAZ S (2007). Broylerlerde *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium Enfeksiyonlarının ELISA ve Drag Sıvı Yöntemleri ile İncelenmesi. *J Fac Vet Med Univ Erciyes*, **4(2)**: 85-90.

SHAO Y, WANG IN (2008). Bacteriophage Adsorption Rate and Optimal Lysis Time. *Genetics*, **180**: 471-482.

SHIN H, LEE JH, KIM H, CHOI Y, HEU S, RYU S (2012). Receptor Diversity and Host Interaction of Bacteriophages Infecting *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium *PLoS One*, **7(8)**: e43392.

SILLANKORVA S, PLETENEVA E, SHABUROVA O, SANTOS S, CARVALHO C, AZEREDO J, KRYLOV V (2009). *Salmonella* Enteritidis bacteriophage candidates for phage therapy of poultry. *J Appl Microbiol*, **108**: 1175-1186.

SKURNIK M, STRAUCH E (2006). Phage therapy: Fact and fiction. *Int J Med Microbiol*, **296**: 5-14.

- SOYKUT EA, TUNAIL N (2009). Süt Endüstrisinde Sorun Yaratan Termofilik Fajlar. *J Food*, **34** (2): 107-113.
- SPRICIGO DA, BARDINA C, CORTES P, LLAGOSTERA M (2013). Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *Int J Food Microbiol*, **165**: 169–174.
- SULAKVELIDZE A, ALAVIDZE Z, MORRIS JG (2001). Bacteriophage Therapy *Antimicrob Agents Chemother*, **45** (3): 649-659.
- SULAKVELIDZE A, KUTTER E (2005). Bacteriophage Therapy in Humans In: *Bacteriophages Biology and Applications* Ed: KUTTTER E, SULAKVELIDZE A New York: CRC Press. Chepter 14 p: 382-438.
- SUMMERS WC (2001). Bacteriophage Therapy. *Annu Rev Microbiol*, **55**: 437-451.
- THUNG TY, PREMARATHNE JMKJK, CHANG WS, LOO YY, CHIN YZ, KUAN CH, TAN CW, BASRI DF, RADZI CWJWM, RADU S (2017) Use of a lytic bacteriophage to control *Salmonella* Enteritidis in retail food. *Food Sci Tech-Brazil*, **78**: 222-225.
- TWEST RV, KROPINSKI MA (2009). Bacteriophage Enrichment from Water and Soil. IN: *Bacteriophages Methods and Protocols*, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. ed: CLOKIE MRJ, KROPINSKI AM New York, Humana Press p: 15-21
- WARREN JC, HATCH MT (1969). Survival of T3 coliphage in varied extracellular environments. I. Viability of the coliphage during storage and in aerosols. *Appl Microbiol*, **17**(2): 256-61.
- WIGGINS AB, ALEXANDER M (1985). Minimum Bacterial Density for Bacteriophage Replication: Implications for Significance of Bacteriophages in Natural Ecosystems *Appl Environ Microbiol*, **49**(1): 19–23.
- WOOLSTON J, PARKS AR, ABULADZE T, ANDERSON B, LI M, CARTER C, HANNA LF, HEYSE S, CHARBONNEAU D, SULAKVELIDZE A (2013). Bacteriophages lytic for *Salmonella* rapidly reduce *Salmonella* contamination on glass and stainless steel surfaces. *Bacteriophage*, **3**(3): e25697.
- ZIERDT CH (1988). Stabilities of lyophilized *Staphylococcus aureus* typing bacteriophages *Appl Environ Microbiol*, **54**(10): 2590.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Ebru
Soyadı: TORUN
Doğum yeri ve tarihi: Ankara, 03/11/1982
Uyruğu: TC
Medeni durumu: Evli
E-mail adresi: ebruyavrucu@gmail.com
Telefon: 05325116965

II- Eğitimi

2005-2008 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı –Yüksek Lisans
2000-2004 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü- Lisans
1996- 2000 Ankara Anıttepe Süper Lisesi
1993-1996 Amasya Merzifon Cumhuriyet OrtaOkulu
1897-1993 Amasya Merzifon Mehmetçik İlköğretim Okulu
Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları

Uzman Biyolog

IV- Mesleki Deneyimi

07/2014 -	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzman Biyolog
2010-2012	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Proje Destek Uzmanı (BAP Projesi)
2006-2009	Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Proje Destek Personeli (DPT projesi)
07/2003	Gülhane Askeri Tıp Akademisi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Stajyer

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneği

Ankara Mikrobiyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

VI.I- Yayınlar

MUŞTAK HK, TORUN E, OZEN D, YUCEL G, AKAN M, DIKER KS (2015) Effect of *Lonicera japonica* Extract on *Mycoplasma gallisepticum* Naturally Infected Broiler Flocks. *Br Poult Sci*, **56 (3)**: 299-303.

AKAN M, BABACAN O, TORUN E, MUSTAK H K, ÖNCEL T (2014). Diagnosis of *Mycoplasma bovis* Infection in Cattle by ELISA and PCR. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 20 (2): 249-252.

MUŞTAK HK, TORUN E, KAYA IB, KAYA EE, DIKER S, ANADOL E, GUNAYDIN E (2013). Wistar ırkı ratlardan izole edilen *Escherichia coli*'lerin filogenetik analizi. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 24: 60-63.

BABACAN O, BAŞ B, MUŞTAK HK, ŞAHAN O, TEKİN O, TORUN E (2011). Kedi ve köpeklerden izole edilen dermatofit etkenlerinin retrospektif değerlendirilmesi. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 22: 23-26.

VI.II- Poster Sunum

OZLU S, TORUN E, SHIRANJANG R, AKAN M, ELIBOL O (2017). The Effect of Hatching Time on Yolk Sac Utilization and ND Titer of Day Old Broiler Chicks. XXth World Veterinary Poultry Association Congress, 4-8 September, Edinburgh, Scotland.

OZLU S, TORUN E, SHIRANJANG R, AKAN M, ELIBOL O (2015). The Effect of Hatching Time on Yolk Sac Utilization and ND Titer of Day Old Broiler Chicks. XIXth World Veterinary Association Congress, 7-11 September, Cape Town, South Africa.

MUŞTAK HK, GUNAYDIN E, KAYA IB, TORUN E, ONAT K, ATA Z, BABACAN O, DIKER KS (2014) Uropatojenik ve meme patojenik *Escherichia coli*'lerin filogruplandırılması. 11. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 21-24 Ekim 2014, Akka Antedon Otel, Kemer, Antalya.

ŞAHAN O, TORUN E, METE S, MUŞTAK HK, AKAN M, DIKER KS (2014). Saha Örneklerinden Direkt Salmonella Tanısında Gerçek Zamanlı PCR Sisteminin (BAX®) Özgüllük ve Duyarlılığının Değerlendirilmesi. 8'inci Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 4-7 Haziran 2014, Swiss Otel, Ankara.

ŞAHAN O, MUŞTAK HK, TORUN E, AKAN M, DIKER KS (2012) Salmonella Infantis tanısında serotiplendirme ve ribotiplendirme yöntemlerinin karşılaştırılması. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 3-7 Kasım 2012, Pine Bay Otel, Kuşadası, Aydın.

V.I.IV- Seminer

VI.I- Projeler

DIKER KS, AKAN M, OZKUL A, TORUN E, TEKIN O, ARAL E, MUŞTAK HK (2010-2014). Faj Tabanlı Hızlı Mikrobiyal Tanı Sistemlerinin Geliştirilmesi. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destekli Araştırma Projesi (10B3338007).

YARDIMCI H, DIKER KS, AKAN M, TEKIN O, TORUN E, ARAL E, MUŞTAK HK (2011-2014). Sığırların Bakteriyel Hastalıkları İçin Hızlı Moleküler Tanı Kitleri Geliştirilmesi Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destekli Araştırma Projesi (11B3338002).

YARDIMCI H, DIKER KS, AKAN M, TORUN E, SAHAN O, ARAL E (2011-2014). Sığırların Bakteriyel Hastalıkları İçin Hızlı Moleküler Tanı Kitleri Geliştirilmesi. TAGEM/10/AR-GE/17.

AKAN M, DIKER KS, YARDIMCI H, MUŞTAK HK, SAHAN O, TORUN E, YILMAZ O. (2011-2014) Broiler Entegrasyonları İçin Salmonella Kontrol Programının Geliştirilmesi TAGEM-11/AR-GE/03.

DIKER KS, MUŞTAK HK, YARDIMCI H, KAYA IB, DIVANOGLU Y, TORUN E, SARIÇAM S (2016-2017) Kanatlıların Salmonella İnfeksiyonunu Engelleyen Bağırsak Mikrobiyomunun Metagenomik Analiz İle Belirlenmesi: Antibiyotiklere Alternatif Bir Yaklaşım. TAGEM-15/AR-GE/46.