



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KANATLI HAYVANLARDA AŞI POTANSİYELİ OLAN
SALMONELLA ENTERITIDIS *AroA* VE *ClpP*
MUTANTLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

Tajelser IDRIS BADRI ADAM

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU**

ANKARA

2022

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANATLI HAYVANLARDA AŞI POTANSİYELİ OLAN
SALMONELLA* ENTERITIDIS *AroA* VE *ClpP
MUTANTLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Tajelser IDRIS BADRI ADAM

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
21L0239009 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA
2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kanatlı Hayvanlarda Aşı Potansiyeli olan *Salmonella* Enteritidis AroA ve ClpP Mutantlarının Geliştirilmesi” 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:

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Anabilim Dalında

Tajelser IDRIS BADRI ADAM tarafından hazırlanan “Kanatlı Hayvanlarda Aşı Potansiyeli Olan *Salmonella* Enteritidis *AroA* ve *ClpP* Mutantların Geliştirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Prof. Dr.

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Raportör Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

Prof.Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU

Ankara Üniversitesi

Danışman

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

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

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii

1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	2
1.2. Etiyoloji	2
1.3. Sınıflandırma	2
1.4. Bulaşma Yolları ve Patogenez	2
1.5. Virülans Faktörleri	4
1.5.1. Toksinler	4
1.5.2. Virülans Plazmitler	5
1.5.3. Bakteriyel Adezyon ve Motilite	5
1.5.4. Bakteriyel İnvazyon	6
1.5.5. Makrofajların Etkilenmesi	7
1.5.6. Metabolik Adaptasyon	7
1.6. Epidemiyoloji	7
1.7. Teşhis	9
1.8. Sağaltım	9
1.9. Koruma	10
1.9.1. Canlı Attenüe Aşılar	11
1.9.1.1. Mutasyonları Oluşturmak için Kullanılan Yöntemler	11
1.9.1.2. Daha Önce Yapılmış Mutasyon Çalışmaları	14
1.9.2. İnaktif Aşılar	17
1.9.3. Subünit Aşılar	17
1.10. Kontrol	18

2. GEREÇ ve YÖNTEM	19
2.1. Gereç	19
2.1.1. <i>Salmonella</i> Enteritidis Suşları	19
2.1.2. Besiyerleri	19
2.1.2.1. Luria Bertoni (LB) Broth	19
2.1.2.2. Luria Bertoni (LB) Agar	19
2.1.2.3. Ampisilin içeren (50 µg/mL) LB Broth	20
2.1.2.4. Kloramfenikol içeren (100 µg/mL) LB Agar	20
2.1.2.5. Nutrient Agar	20
2.1.2.6. Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar	20

2.1.2.7. Mueller-Hinton (MH) Agar	21
2.1.2.8. Mueller-Hinton (MH) Broth	21
2.1.2.9. Modifiye Edilmiş Rappaport Vassiliadis (MSRV) Yarı Katı Besiyeri	21
2.1.2.10. Super Optimal Broth with Catabolite Repression (SOC) Broth Besiyeri	22
2.1.3. Ticari Kitler, Tampon Solüsyonlar ve Çözeltiler	22
2.1.4. Cihaz ve Ekipmanlar	23
2.1.5. Plazmidler	23
2.1.6. PCR Primer Çiftleri	23
2.2. Yöntem	25
2.2.1. Mutantların Oluşturulması	25
2.2.1.1. Elektrokompentant SEI-WT Suşunun Oluşturulması ve pRedET Plazmidin Transformasyonu	25
2.2.1.1.1. pRedET plazmidin Ekstraksiyonu ve Transformasyonunun PCR ile Doğrulanması	26
2.2.1.1.1.1. Plazmidin Ekstraksiyonu	26
2.2.1.1.1.2. Transformasyonun PCR ile Doğrulanması	27
2.2.1.1.1.2.1. PCR Ürünün Görüntülenmesi	27
2.2.1.1.1.2.1.1. Agaroz Jel Elektroforezi	27
2.2.1.1.1.2.1.2. Jelin Görüntülenmesi	27
2.2.1.2. Homolog Uçlu Lineer DNA Kasetinin Amplifikasyonu	28
2.2.1.2.1. <i>DpnI</i> Restriksiyon Enzimi ile PKD3 Plazmid Eliminasyonu	29
2.2.1.2.2. <i>ClpP</i> -PKD3 ve <i>aroA</i> -PKD3 Kasetlerin Pürifikasyonu	29
2.2.1.2.3. Saflaştırılmış PCR Ürünün Görüntülenmesi	30
2.2.1.2.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi	30
2.2.1.2.3.2. Jelin Görüntülenmesi	30
2.2.1.3. Lineer DNA Kasetlerinin Transformasyonu	30
2.2.1.4. Suşlardan DNA Ekstraksiyonu ve Mutasyonların PCR ile Konfirmasyonu	31
2.2.1.4.1. DNA Ekstraksiyonu	31
2.2.1.4.2. Mutasyonların PCR ile Konfirmasyonu	32
2.2.1.4.2.1. Rekombinantların ve SEI-WT PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi	34
2.2.1.4.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi	34
2.2.1.4.2.3. Jelin Görüntülenmesi	34
2.2.1.5. pRedET Plazmidinin Eliminasyonu	35
2.2.2. SEI- Δ ClpP:CmR, SEI- Δ aroA:CmR ve SEI-WT'nin Fenotipik Özelliklerinin Karşılaştırması	35
2.2.2.1. LB Besiyeri ve Stres Koşullarında Üreme Özellikleri	35
2.2.2.2. Mutantların XLD Besiyerinde Üremesi	36
2.2.2.3. Mutantların Hareket Özellikleri	36
2.2.2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testi	36
2.2.2.5. Biyokimyasal Testler	38
2.2.2.6. Yumurta Sarısı, Domuz Serum, ve EDTA Duyarlılık Testi	38
2.2.3. Mutantların Genotiplendirilmesi	39
2.2.3.1. Suşların Hazırlanması	39
2.2.3.2. Agaroz Gömülmesi	40
2.2.3.3. Agaroz İçindeki Bakterinin Liziz Aşaması	40
2.2.3.4. Yıkama Aşaması	40

2.2.3.5. Restriksiyon Enzimi (RE) ile Kesilmesi	41
2.2.3.6. Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklmesi	41
2.2.3.7. Boyama ve Yıkama Aşaması	42
2.2.3.8. Görüntüleme ve Analiz	42
2.2.4. Hücre Kültüründe Adezyon ve İnvazyon Testi	42
3. BULGULAR	44
3.1. Mutantların Oluşturulması	44
3.1.1. pRedET Plazmidin Transformasyonu ve PCR ile Doğrulanması	44
3.1.2. PCR ile Homolog Uçlu Lineer DNA Kasetlerinin Amplifikasyonu	45
3.1.3. Lineer DNA Kasetlerinin Transformasyonu	45
3.1.4. Mutasyonların PCR ile Konfirmasyonu	46
3.1.5. pRedET Plazmidinin Eliminasyonu	47
3.2. SEI-ΔC1pP:CmR, SEI-ΔaroA:CmR ve SEI-WT'nin Fenotipik Özelliklerinin Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi	48
3.2.1. LB Besiyerinde ve Stres Koşullarında Üreme Özelliklerinin Karşılaştırılması	48
3.2.2. Mutantların XLD Besiyerinde Üreme Özellikleri	51
3.2.3. Mutantların Hareket Testi Bulguları	52
3.2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testi Bulguları	52
3.2.5. Biyokimyasal Test Bulguları	53
3.2.6. Yumurta Sarısı, Domuz Serumı ve EDTA Duyarlılık Testi Bulguları	54
3.3. Mutantların Genotiplendirilmesi	55
3.4. Hücre Kültüründe Adezyon ve İnvazyon Testi Bulguları	57
4. TARTIŞMA	58
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	65
ÖZET	67
SUMMARY	68
KAYNAKLAR	69

ÖNSÖZ

Salmonella Enteritidis, kanatlılarda yaygın olarak bulunan zoonotik bir bakteridir. Kanatlı hayvanlarda görülen sistemik enfeksiyon sonrası bu hayvanlardan elde edilen et ve yumurta gibi ürünlerinin tüketimi yoluyla insanlarda salmonelloza neden olmaktadır. Dünya çapında ve özellikle Avrupa'da en çok izole edilen serotiplerden birisidir. Bulaşması kanatlılar arasında vertikal veya horizontal yolla olmaktadır. Aşılama, salmonelloz gibi hastalıklardan korunmada en güçlü yöntem olup, tedavi maliyetleri ve artan antibiyotik direnci nedeniyle en efektif kontrol önlemlerinden birisidir. Ancak, *Salmonella*'nın 2600'e yakın serotipinin arasında çapraz koruma olmaması bir sorundur. *Salmonella* enfeksiyonlarının kontrolü için attenüe, inaktif ve subünit aşılar kullanılmaktadır. Canlı aşılar bağışıklık sistemini uyararak kısa zamanda hem hücresel hem de humoral immün yanıtı ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle *Salmonella* enfeksiyonuna daha fazla duyarlı olan 1 günlük civcivleri korumak için *Salmonella* aşısının oral yol ile verilmesi ideal bir seçenektir. Bakterideki metabolizma ve/veya virülens genlerinde delesyon yapılarak *Salmonellalarda* canlı attenüe aşılar (mutant aşılar) geliştirilmektedir. Bu amaçla lambda red rekombinasyon (homolog rekombinasyon) yöntemi gibi çeşitli moleküler teknikler kullanılmaktadır. Günümüze değin, *Salmonella* Enteritidis suşlarını attenüe etmek ve mutant bir suş oluşturmak için lambda red yöntemi kullanılarak *aroA*, *htrA*, SPI1 ve SPI2, *lon*, *aroD*, *ompR*, *sptP*, *HupAB*, *phoPfliC*, *hilAssrAfliG*, SPI1lonfliC ve *Lon-cpxR* gibi genlerin delesyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu tezin amacı, bakterinin virülens antijenlerini kodlayan genlerde delesyon yaparak, kanatlı hayvanlarda aşı potansiyeli olan *Salmonella* Enteritidis *aroA* ve *ClpP* mutant suşlarının geliştirilmesi ve *in vitro* koşullarda özelliklerinin karşılaştırılmasıdır.

Bu tez çalışmamın yürütülmesi sırasında ilham veren ve desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU'na, motivasyon desteği ve yardım ettiği için Prof. Dr. Mehmet AKAN'a, tez izleme komitesindeki Prof. Dr. Hıfısı Oğuz

SARİMEHMETOĞLU'na, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın öğretim üyeleri Prof. Dr. Hakan YARDIMCI'ya, Doçent Dr. H. KAAN MÜŞTAK'a, AVİTEK Ar-Ge A.Ş. ve AGBİYO A.Ş. çalışanlarına, anabilim dalında doktora yapan diğer arkadaşlarıma ve evrak işlerini kolaylaştırdığı için bölümün sekreteri Yüksel EROL'a teşekkürlerimi sunarım. PFGE çalışması için yardım eden Uzm. Süleyman YALÇIN başta olmak üzere, Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı çalışanlarına, Şap Enstitüsü Hücre sorumlusu Dr. Şükran YILMAZ'a, Dr. Nilay UNAL ve İbrahim YAŞAR dahil olmak üzere DOLLVET Biyoteknoloji A.Ş. firması çalışanlarına, Vet. Hek. Uzm. Gültekin ÜNAL'a, doktora sürecinde manevi desteği için teşekkür ediyorum. Yoğun çalışmalarım sırasında sabır gösterdiği için eşim Baraa ABDALAZİZ'a, çalışmama izin verdiği için çocuklarım Ahmed ve Tarteel'e, yanımda duasıyla destekleyen annem ve babama, ve çalışmam sırasında küçük ya da büyük yardımını esirgemeyen herkese teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

bp	Base pair
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
°C	Santigrat derece
Caco-2	Human epithelial colorectal adenocarcinoma
CFU	Colony Forming Unit
CHO	Chinese Hamster Ovary
DIVA	Differentiating Infected from Vaccinated Animals
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribonükleic Asid
dNTP	Deoxynucleoside Triphosphate
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
G	Gram
HeLa	Henrietta Lacks
kb	Kilobase
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
MIK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
ml	Mililitre
mm	Milimetre
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
µm	Micrometre
NaCl	Sodyum klorür
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD ₆₀₀	Optik dansite at wavelength 600 nm
OIE	Office International des Epizooties

PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis
pH	Power of Hydrogen
Rpm	Rounds Per Minute
s	Saniye
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite Repression Broth Besiyeri
SPI	<i>Salmonella</i> Patojenite Adası
TBE	Tris Borate EDTA
TE	Tris EDTA
XLD	Xylose Lysine Deoxycolate

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Tip III salgılama sistemi yapısı genel görünümü	6
Şekil 1.2. 2012 yılında, Avrupa Birliği'nde insanlarda bulunan <i>Salmonella</i> serovarlarının dağılımı	8
Şekil 1.3. <i>E. coli</i> genomunun modifikasyonunda kullanılan pREDIA plazmidi	12
Şekil 1.4. Rekombinasyon aşamasında kullanılan olan PKD3 plazmidi	13
Şekil 3.1. LB-Amp (50 µg/ml) agarda üremiş SEI-WT-pRedET suşunun görüntüsü	44
Şekil 3.2. pRedET ile transformasyonun PCR ile doğrulanması	44
Şekil 3.3. PCR ile amplifiye edilmiş kasetlerin jel görüntüsü	45
Şekil 3.4. Kaset transformasyonları sonucunda kloramfenikollü LB agarda üremiş suşların görüntüsü	46
Şekil 3.5. Dış konfirmasyon primerlerinin PCR jel görüntüsü	46
Şekil 3.6. Genomda pKD3 kasetinin 5' ucunu tespit etmek için kullanılan primerlerin PCR jel görüntüsü	47
Şekil 3.7. <i>AroA</i> geninin iç primerlerinin PCR jel görüntüsü	47
Şekil 3.8. LB-37 °C'de suşların üreme eğrisi grafiği	48
Şekil 3.9. LB-42 °C'de suşların üreme eğrisi grafiği	49
Şekil 3.10. pH 4,5 LB-37 °C'de suşların üreme eğrisi grafiği	49
Şekil 3.11. pH 4,5 LB-42 °C'de suşların üreme eğrisi grafiği	50
Şekil 3.12. %5 NaCl LB-37 °C'de suşların üreme eğrisi grafiği	50
Şekil 3.13. %5 NaCl LB-42 °C'de suşların üreme eğrisi grafiği	51
Şekil 3.14. XLD agarda üremiş suşların görüntüsü	51
Şekil 3.15. Suşların hareketlilik grafiği	52
Şekil 3.16. Antibiyotik duyarlılık grafiği	53
Şekil 3.17. Biyokimyasal testlerinin görüntüsü	53
Şekil 3.18. Suşların domuz serumuna karşı dirençliliğinin grafiği	54

Şekil 3.19. Suşların EDTA'ya karşı dirençliliğinin grafiği	55
Şekil 3.20. Suşların yumurta sarısına karşı dirençliliğinin grafiği	55
Şekil 3.21. PFGE görüntüsü	56
Şekil 3.22. PFGE dendogram görüntüsü	56
Şekil 3.23. Vero hücre kültüründe suşların adezyonu ve invazyonu grafiği	57



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Testlerde Kullanılan Ticari Kitler, Tampon Solüsyonlar ve Çözeltiler	22
Çizelge 2.2. Cihaz ve Ekipmanlar	23
Çizelge 2.3. Primer Çiftleri	24
Çizelge 2.4. SEI-WT ve Kloramfenikol Dirençli Kolonilerin Koloni PCR Taraması	33
Çizelge 2.5. Kullanılan Antibiyotikler	37
Çizelge 3.1. Biyokimyasal Test Sonuçları	54

1. GİRİŞ

Salmonelloz, insan ve hayvanlarda görülen önemli zoonotik bir hastalıktır (Mesfin ve Dejene, 2017). *Salmonella* infeksiyonu kanatlı hayvanlarda verim düşüklükleri ve ölümlere neden olmasının yanında, insanlarda ciddi bir hastalık yapmakta, yaygın epidemiyolojisi, teşhis ve tedavi maliyetleri nedeniyle dünya çapında hayvan yetiştiriciliği ve halk sağlığını etkilemektedir (Akan M, 2008; Crump ve ark., 2004). İnsanlarda gastroenterit, diyare, bakteriyemi ve enterik ateş *Salmonella* infeksiyonunun dünya çapında en sık görülen belirtileridir (Majowicz ve ark., 2010).

Konakçı spesifik *Salmonella* infeksiyonları arasında, tavuk tifosuna neden olan *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*) ve pullorum hastalığına neden olan *S. Pullorum*, kanatlılarda sistemik hastalığa neden olmaktadır (Chappell ve ark., 2009). Konakçı-spesifik olmayan *Salmonella* serotipleri; O4 grubu: Agona, Derby, Heidelberg, Paratyphi B ve Typhimurium; grup O7: Montevideo, Virchow ve Infantis; grup O8: Kentucky; grup O9: Moskova, Panama ve Enteritidis, kanatlı hayvanların gastrointestinal kanallarında kommensal olarak bulunmakta, insanlarda ise yaygın olarak hastalıklara neden olmaktadır (Revolledo ve Ferreira., 2012). *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde en yaygın non-tifoid Salmonelloz nedenleridir (EFSA, 2012).

1.1. Tarihçe

Salmonella ilk kez 1880'de Karl Eberth tarafından tifo hastalarının dalaklarında gösterilmiş (Eberth, 1880) ve dört yıl sonra Georg Theodor Gaffky tarafından *Salmonella* saf kültür olarak başarıyla üretilmiştir (Anne, 1999). Etkene Amerikalı bir

veteriner patolog olan Daniel Elmer Salmon'un soyadından esinlenerek “*Salmonella*” adı verilmiştir (Oldenkamp, 2004).

1.2. Etiyoloji

Salmonella cinsi, *Enterobacteriaceae* familyasına ait Gram negatif, çomak şeklinde, sporsuz, hareketli (*Salmonella* Gallinarum ve *Salmonella* Pullorum hariç) ve fakültatif anaerobik bir bakteridir (De Cort, 2015). Üremesi için optimum sıcaklık 37°C'dir, ancak 5 - 47°C aralığında da üreyebilmektedir (Gast, 2003 ve Quinn ve ark., 2004).

1.3. Sınıflandırma

Kauffman – White (1934) şemasına göre somatik (O), flagellar (H) ve kapsüller (K) veya (Vi) antijenlerinin serolojik tanımlanması kullanılarak serotiplendirme yapılmaktadır (Quinn ve ark., 2002; Quinn ve ark., 2004). *Salmonella* cinsine ait iki tür bulunmaktadır. Bunlar *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori*'dir. *S. enterica*, 2600'den fazla serotip içeren 6 alt türe ayrılmıştır (Gal-Mor ve ark., 2014 ve Su ve Chiu., 2007). Kauffmann-White sınıflandırmasına göre, *Salmonella* Enteritidis'in antijenik formülü (1,9,12:g,m: -) 'dir ve D1 grubunda bulunmaktadır (Grimont ve François, 2007).

1.4. Bulaşma Yolları ve Patogenezi

Salmonella, insanlarda yumurta ve diğer kanatlı ürünlerinin tüketimi yoluyla salmonelloza neden olmaktadır (Rahul ve ark., 2011). Kanatlı hayvanlarda ise yatay veya vertikal bulaşabilmektedir. Yatay bulaşma, kuşların arasında temasla veya kontamine dışkılarla fekal-oral yolla gerçekleşmektedir. Biyolojik vektörler, yabani

kuşlar, köpekler, kediler, fareler ve kemirgenler de *Salmonella* bulaşmasında rol oynayabilmektedir (Rafael ve ark., 2010 ve Rahman ve ark., 2018).

Salmonella patogeneğinde, bakteri serovarları ve dozuna, konak yaşı ve bağışıklık durumu gibi farklı faktörler rol oynamaktadır (Mark ve Bill, 2003). Bakteri insanlarda mide asit bariyerini geçtikten sonra ince ve kalın bağırsağın mukozasını istila etmekte ve toksinler üretmektedir. Bu istila, ishala, ülserasyona ve mukozanın tahrip olmasına neden olan akut inflamatuvar reaksiyonu indükleyen proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını uyarmaktadır (Giannella, 1996). Genellikle *Salmonella* Enteritidis ile kontamine gıdaları tükettikten 12 ila 72 saat sonra enfekte kişilerde başlayan ateş, karın krampları ve ishal ortaya çıkmaktadır. Bazı hastalarda hastalık genellikle 7 gün sürmekte, ancak yaşlılarda, bebeklerde ve immünoşüpresif insanlarda hastanede tedavi gerekebilmekte, ve bazı durumlarda, uygun antibiyotik uygulanmadığında ölüme neden olabilmektedir (Omwandho ve Takayuki, 2010).

Kanatlı hayvanlarda, yutulan organizmalar sindirim sistemi yolundan ilerlemekte ve Peyer plaklarının üzerindeki mukozal yüzey ile temas ettikten sonra bağırsak epitel hücrelerine nüfuz etmektedir. Bazı Salmonellalar bağırsak duvarından ve daha derin dokulara girdikten sonra, retiküloendotelyal sistemini istila etmekte, çoğalabilmekte, ve üreme sistemi dokuları dahil olmak üzere karaciğer, dalak ve diğer iç organlara yayılarak kalıcı, ciddi ve sistemik hastalıklara neden olabilmektedir (Devendra ve ark., 2012 ve Suzuki, 1994). Ayrıca bakteriler makrofajları aracılığıyla diğer organlara da yayılabilmektedir (Zhao, 2002). Cıvcivlerde akut seyreden *S. Enteritidis* enfeksiyonlarında stres koşullarının etkisiliyle %20'lere varan ölümler gözlenmiştir (Suzuki, 1994).

1.5. Virölans Faktörleri

1.5.1. Toksinler

Salmonella iki toksini üretmektedir. 1- Dış membran lipopolisakkaritten kaynaklanan lipid A, iç çekirdek, ve O-yan zincir oligosakkarit endotoksinleri. 2- Enterotoksin (aynı zamanda verotoksin olarak da adlandırılan) ve sitotoksin olarak iki türe ayrılmış olan ekzotoksinleri (Ashkenazi ve ark., 1988; Hitchcock ve ark., 1986 ve Suzuki, 1994).

Lipid A'nın makrofajları aktive etmesinden sonra serbest makrofajlardan ortaya çıkan çeşitli faktörlerin ateş ve şok ile ilişkisi vardır. *Salmonella*'nın LPS moleküllerinin O-yan zinciri, ardışık komplement (cascade) reaksiyonlarının litik etkisine direnci ile ilişkilidir (Suzuki, 1994). *Salmonella*'nın LPS yapısında bir bozukluk olduğunda fare kalın bağırsağını kolonize etme yeteneğinin azaldığı gözlenmiştir (Nevola ve ark., 1985). Bunun dışında, *Salmonella*'nın O zincirlerinin bileşimi makrofajların fagositozuna karşı dirençliliğini etkilemektedir. LPS'nin O-yan zincir yapısındaki farklılıklar *Salmonella*'nın farelerde virölansını etkilemiştir (Liang-Takasaki ve ark., 1982 ve Liang-Takasaki ve ark., 1983).

Salmonella enfeksiyonlarının patogenezi üzerine yapılan birkaç çalışmada, ısıya dayanıklı enterotoksin üreten (*S. Enteritidis* dahil olmak üzere) ekzotoksinlerin potansiyel ilişkisi bildirilmiştir (Jiwa, 1981). *Salmonella* enfeksiyonlarında görülen diyarenin nedeni bakterinin önemli bir virölans faktörü olan enterotoksini olduğu düşünülmektedir (Chopra ve ark., 1994 ve Chopra ve ark., 1999). Isıyla inaktive edilmiş ve saflaştırılmış kolera toksini ile immunize edilmiş tavşanlarda, canlı *S. Typhimurium* ile eprüvasyon sonrasında sıvı ve elektrolit kaybı engelenmiştir (Guiannella ve ark., 1975).

Salmonella sitotoksini, bakterinin dış membranında bulunan, insan AV-3, Vero, Hela ve CHO hücrelerinin üzerinde sitotoksik etkilere neden olan, ısıya dayanıklı bir proteindir. *Salmonella* gastroenteritlerinde, bağırsak epitel hücrelerinde *Salmonella* sitotoksinlerine bağlı protein sentezi inhibisyonu nedeniyle bağırsaktaki mukozal yüzeylerde hasar, diyare ve enterik semptomlar ortaya çıkmaktadır (Ashkenazi ve ark., 1988; Ketyi ve ark., 1979; Koo ve ark., 1984; Koo ve Peterson., 1982 ve Reitmeyer ve ark., 1986).

1.5.2. Virülans Plazmidler

Altı *Salmonella* serotipinin (Abortusovis 50-67 kb, Choleraesuis 50-110 kb, Dublin 80 kb, Enteritidis 60 kb, Gallinarum/Pullorum 85 kb ve Typhimurium 90-95 kb) virülans plazmidi taşıdığı bilinmektedir (Rotger ve Casadesus, 1999). *Salmonella* Enteritidis'in fare virülans plazmidi, enfeksiyonun farelerde ince bağırsaktan mezenterik lenf düğümlerine, dalak ve karaciğere yayılmasına neden olmakta ve bu plazmid, plazmit içermeyen bir *Salmonella* Dublin suşuna aktarılabilir (Alphons ve Jaap, 2005 ve Suzuki, 1994). Serotip-spesifik 36 megadalton plazmidi çoğu *S. Enteritidis* izolatu dışında, virulent fare ve kanatlı *S. Enteritidis* izolatlarında da bulunmuştur (Suzuki, 1994).

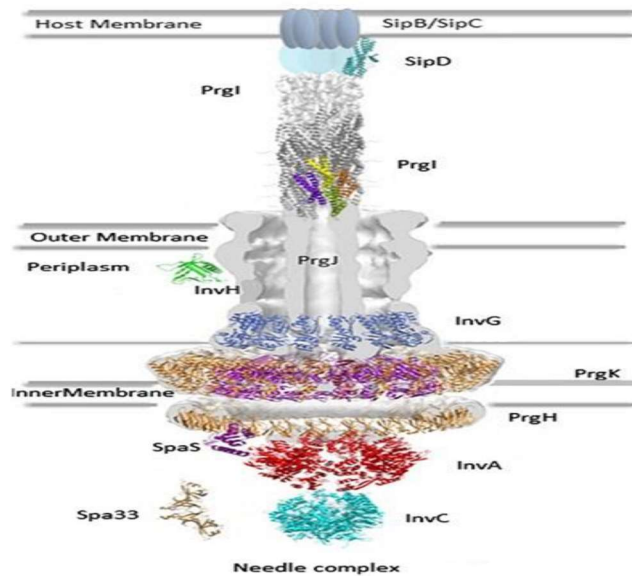
1.5.3. Bakteriyel Adezyon ve Motilite

Bakteriler, bakteriyel yüzey bileşenlerinin (örneğin: fimbria ve flagella) farklı konak reseptörleri ile sıkı etkileşimi ile hedef hücrelere bağlanır. Bazı çalışmalarda serovar Typhimurium'un PE fimbriasının farelerde ince bağırsaklara bakterinin yapışmasında rol oynadığı (Baumler ve ark., 1996), serovar Enteritidis'in SEF14 fimbriyalarının makrofajlar tarafından bakterinin tutulumunda rol oynadığı görülmüştür (Edwards ve ark., 2000).

Salmonella'da hareket sağlayan yaklaşık 5-10 adet flagella bulunmaktadır (Alphons ve Jaap, 2005). *Salmonella*'nın flagellumu 22 yapısal protein, 6 sitoplazmik protein, 4 yapısal şaperon ve 3 düzenleyici proteinden oluşmaktadır (Amanda ve ark., 2012). Flagella, bakterilerin konak mukus tabakasına daha hızlı nüfuz etmesini ve konak hücre yüzeyine ulaşmasını sağlamaktadır (Allen ve Woodward, 1999a).

1.5.4. Bakteriyel İnvazyon

Bakterinin konak hücrelerini invaze etmesi virülans faktörlerinden birisidir. *S. Enteritidis*'in, özellikle faj tip 4 suşlarının tavuklarda sistemik enfeksiyonda çok invazif bir patojen olduğu tespit edilmiştir (Barrow, 1991 ve Suzuki, 1994). *Salmonella* serotiplerinin bağırsak mukozal hücrelerini invazyonunun, SPI-1'de bulunan tip III salgılama sistemi (T3SS) tarafından sağlandığı saptanmıştır (Baumler ve ark., 1996 ve Marcus ve ark., 2000). T3SS yapısı 20'den fazla proteinden oluşmakta, bakteri hücre duvarının hem iç hem de dış membranını kapsayan ve bakteri hücre yüzeyinden dışarı doğru uzanan iğne benzeri bir yapı oluşturmaktadır (Şekil 1.1.) (Burkinshaw ve Strynadka, 2014).



Şekil 1.1. Tip III salgılama sistemi yapısı genel görünümü (Burkinshaw ve Strynadka, 2014).

T3SS tarafından, *Salmonella*'nın yapıştığı bağırsak epitel hücrelerine efektör proteinleri enjekte edilmektedir. Enjekte edilen efektör proteinler genellikle *Sip* (*Salmonella* invazyon proteinleri), *Sop* (*Salmonella* dış proteinleri) ve diğer proteinleri içermektedir (Foley ve ark., 2013).

1.5.5. Makrofajların Etkilenmesi

Salmonella konak hücreleri enfekte ettikten sonra makrofajlarda yaşayabilmektedir. *Salmonella* patojenite adaları (SPI-2, SPI-3 ve SPI-4) makrofajlarda *Salmonella*'nın canlı kalmasında rol oynamaktadır (Marcus ve ark., 2000 ve Ochman ve ark., 1996). Serovar Typhimurium'un saha suşu makrofajlara invazyonundan dört saat sonra üremeye başlamışken, SPI-2 mutant suşu aynı oranda üreme göstermemiştir (Hensel ve ark., 1998).

1.5.6. Metabolik Adaptasyon

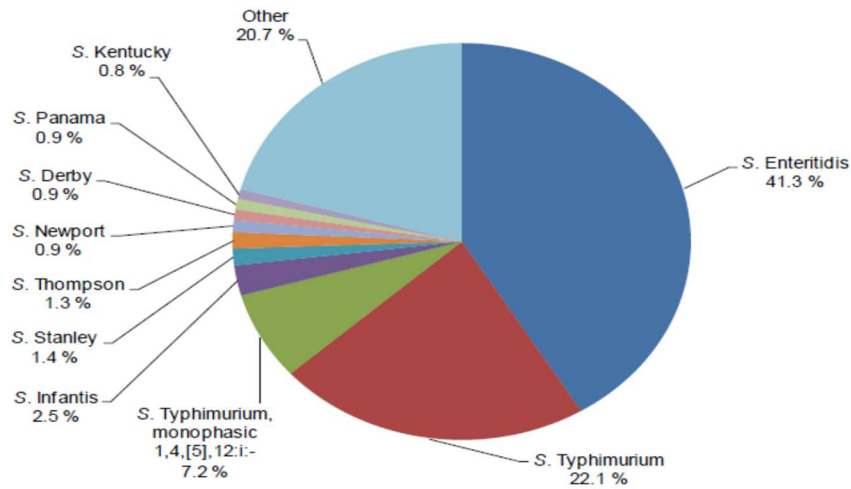
Salmonella besin eksikliği, oksidatif stres ve sindirim enzimleri gibi çeşitli çevresel etkilerin altında canlı kalmasını sağlayan bir grup adaptif mekanizma ile desteklenmektedir. *aroA*, *narZ*, *fadF* ve *eutE* gibi genler bu metabolik adaptasyonda rol oynamaktadır. (Spector, 1998).

1.6. Epidemiyoloji

Salmonella enfeksiyonuna bağlı Gastroenterit nedeniyle dünya çapında yılda 155,000 ölüm görülmektedir (Majowicz ve ark., 2010). 1995 yılında *Salmonella*

Enteritidis serotipi 35 ülkede en çok izole edilen serotip olarak kayıtlara geçmiştir (Herikstad ve ark., 2002). Dünya Sağlık Örgütü tarafından sağlanan verilere göre, 2001-2005 yılları arasında dünya çapında gastroenterit olgularında en sık izole edilen serotipin *Salmonella* Enteritidis'in olduğu kayıt edilmiştir (Galanis ve ark., 2006). *Salmonella* Enteritidis Asya, Latin Amerika ve Avrupa'da en sık görülen serotiptir. Kuzey Amerika'da ve Afrika'da ise *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium en yaygın serotiplerdir (Barrow ve Thomson., 2010 ve Eng Shu-Kee ve ark., 2015).

2012 yılında, şekil 1.2.'de gösterildiği gibi, *Salmonella* Enteritidis'in insanlardan en çok izole edilmiş serovar olduğu (%41,3), bunu takiben *Salmonella* Typhimurium (%22,1) ve monofazik *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:- ve ardından *Salmonella* Infantis'in geldiği bildirilmiştir (EFSA, 2014).



Şekil 1.2. 2012 yılında, Avrupa Birliğinde insanlarda bulunan *Salmonella* serovarlarının dağılımı (EFSA, 2014).

Türkiye’de, Sağlık Bakanlığından alınan verilere göre 2012-2016 yılları arasında insanlarda klinik vakalardan alınan materyallerden en sık izole edilen *Salmonella* serotipi *Salmonella* Enteritidis’tir (%57,3-74,1). Birincil üretimde, genel *Salmonella*

pozitifliği broyler, yumurtacı, hindi ve damızlık epidemiyolojik birimlerinde sırasıyla %24,5, %7,5, %21,5 ve %4,3 olarak bulunmuştur. *Salmonella* Enteritidis'in broyler, yumurtacılar, hindi, damızlık ve kesimhane örneklerindeki 3.baskın serotip olduğu saptanmıştır.

1.7. Teşhis

Salmonellozun teşhisinde, bakteriyel izolasyon veya Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), tam kan aglütinasyon testi (WBT), hızlı lam aglütinasyon testi (RSA), serum aglütinasyon testi (SAT) ve ELISA kullanılarak yapılabilmektedir (OIE Terrestrial Manual, 2018). *Salmonella*'nın serolojik teşhisinde Kauffmann-White şemasına göre serum aglütinasyonu ile bakteri hücre yüzeyinde lipopolisakkarit (somatik veya O antijeni), flagella (H antijeni, faz I ve II), ve kapsüler (Vi) antijenin varlığına göre yapılmaktadır (Fitzgerald ve ark., 2003). Faj tiplendirme, Pulse Field Jel Elektroforezi, biyotiplendirme, antibiyotik direnç modellerinin belirlenmesi veya plazmid profil analizi gibi diğer yöntemler serovar seviyesinden daha detaylı bir şekilde izolatların tanımlanması için kullanılmakta ve epidemiyolojik çalışmalarda uygun yöntemlerdir (Barker ve Old, 1989).

1.8. Sağaltım

İnsanlarda *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavisi için geleneksel olarak ampicilin, kloramfenikol ve trimetoprim-sülfametoksazol gibi antimikrobiyaller kullanılmakta, ancak bu antimikrobiyallere karşı direnç ortaya çıkmasından dolayı florokinolonlar'ın ve geniş spektrumlu sefalosporinler'in çoklu ilaca dirençli *Salmonella* enfeksiyonları tedavisinde kullanılması tercih edilmiştir (Eng, Shu-Kee ve ark., 2015 ve Sood ve ark., 1999). Ancak, gelişmekte olan ülkelerde florokinolonlara *Salmonella* dirençliliğinin artmasından *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilen kinolonlar ve

üçüncü nesil sefalosporinler gibi antibiyotikler neden olmuştur (Hasan ve ark., 2008 ve Karon ve ark., 2007).

Florokinolonlar farklı ülkelerde kanatlı endüstrisinde çeşitli şekillerle kullanılmaktadır (Randall ve ark., 2006). Trimetoprim ile polimiksin B sülfat uygulanması, 1 günlük civcivlerde *Salmonella* Enteritidis'in kolonizasyonunu engellemiş ve enfeksiyonu ortadan kaldırmıştır (Goodnough ve Johnson, 1991). Bir çalışmada normal tavuk bağırsak florası ile enrofloksasin kullanılarak 1 günlük civcivlerde *Salmonella* Enteritidis enfeksiyonu elimine edilmiştir (Seo ve ark., 2000).

Antimikrobiyallerle tedavi etkinliğinin sınırlı olması, örnekleme sırasında enfeksiyonun maskelenebilmesi, et ve yumurtada kalıntı bırakması ve dirençliliğe neden olması gibi nedenlerle kanatlı hayvanlarda *Salmonella* enfeksiyonunu kontrol etmek için antimikrobiyallerin kullanılmaması tavsiye edilmektedir. Ayrıca antimikrobiyaller normal florayı azaltmakta ve böylece *Salmonella* ile kolonizasyon olasılığını artırmaktadır (OIE manual, 2021).

1.9. Koruma

Aşılar, salmonelloz gibi hastalıklara karşı en güçlü biyolojik etkenlerdir. 2600 serotipin herhangi birinden yapılan aşı, diğerine karşı çapraz koruma sağlayamamaktadır (Singh, 2009). Kanatlıların aşılınması, maliyeti ve bakterilerin antibiyotik direncinin artması nedeniyle en önemli kontrol önlemlerinden birisidir (Zhang ve ark., 1999). *Salmonella*'nın kontrolü için canlı attenüe, inaktive (ölü) ve subünit aşıları kullanılmaktadır.

1.9.1. Canlı Attenüe Aşılar

İnsanlarda *Salmonella* tifosu aşısı ilk geliştirilmiş attenüe aşıdır (Wright, 1997). Daha sonra kanatlılarda tifo hastalığının kontrolü için *S. Gallinarum*'un 9R ve 9S suşları geliştirilmiştir (Smith, 1956).

İnaktif aşılar sadece antikor üretimini uyarırken, canlı atenüe aşılar hem hücresel hem de humoral immun yanıtı uyarmaktadır (Barrow, 1996 ve Chatfield ve ark., 1993). Genellikle tüm uygun antijenleri *in vivo* olarak eksprese ettikleri ve kolayca oral yolundan verilebildikleri için çeşitli avantajları bulunmaktadır (Desin, 2013 ve Gast ve Beard., 1989). Yumurtadan yeni çıkmış civcivler *Salmonella* infeksiyonuna çok duyarlı olduğundan, canlı *Salmonella* aşısının 1 günlük civcivlerin aşılmasından 18 gün sonra LPS antijenine karşı antikor üretimini sağlayabilmesi avantajlardan birisidir. (Cooper ve ark., 1994 ve Desmidt, 1997).

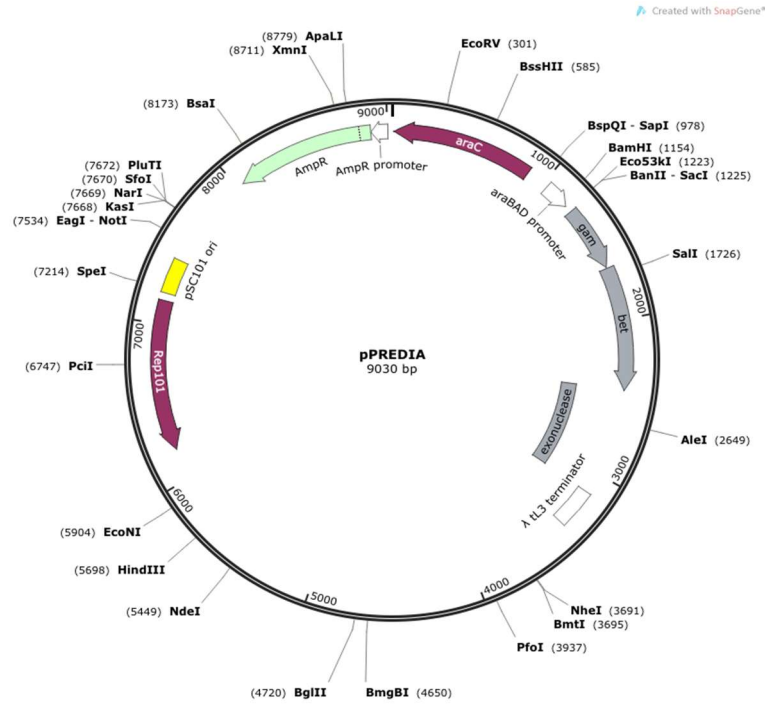
İnsanlarda, hayvanlarda ve kanatlı hayvanlarda genetik delesyon veya insersiyon yoluyla bölgeye spesifik ya da spesifik olmayan mutasyonlara sahip birçok *Salmonella* attenüe aşıları geliştirilmiştir (Singh, 2009).

1.9.1.1. Mutasyonları Oluşturmak için Kullanılan Yöntemler

E. coli kromozomunda gen transformasyonu için iki yöntem kullanılmıştır. Birincisi, bir plazmidin bakteri kromozomuna insersiyonuna dayanan “in-out” yöntemidir. İkincisi “linear fragment” yöntemi (aynı zamanda homolog rekombinasyon yöntemi olarak adlandırılır), linear DNA molekülünün uçlarında oluşturulan kısa homolog kollar aracılığıyla homolog-rekombinasyona dayanan bir metottur (Madyagol ve ark., 2011).

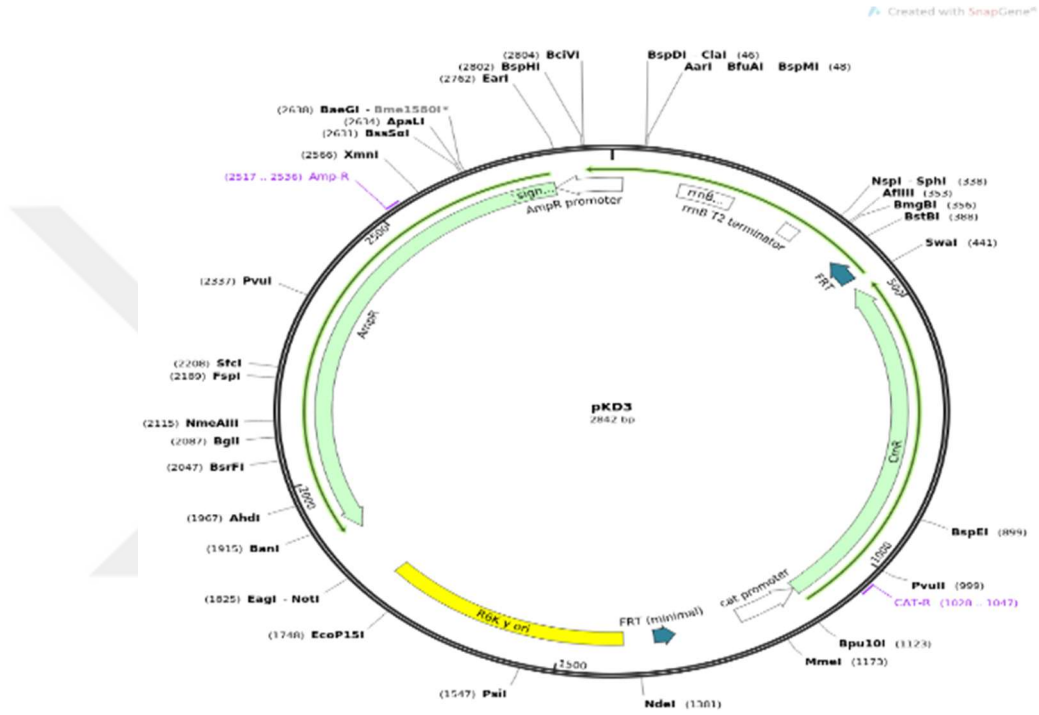
Homolog rekombinasyonda hedef DNA molekülleri, rekombinasyon enzimleri eksprese eden konakçı hücrelerde kesin olarak değiştirilmektedir. *E. coli*'de rekombinasyon için sıklıkla Lambda (λ) red rekombinasyon fajının fonksiyonlarından faydalanır (Datsenko ve Wanner, 2000 ve Murphy, 1998). Lambda (λ) red genleri: *Exo*, *Bet* ve *Gam* red rekombinasyonunda çok önemli bir rol oynamaktadır. *Exo*, lineer dsDNA'nın 5 ucunu bozmakta ve *Bet*, *Exo*'nun oluşturduğu ssDNA'nın hücrede tamamlayıcı bir hedefe bağlanmasını desteklemektedir (Kuzminov, 1999; Murphy, 1998; Poteete ve Fenton., 2000 ve Yu ve ark., 2000). *Gam* geni, lineer DNA'nın (PCR ürünü) bozulmaması için *E. coli*'nin RecBCD ve SbcCD eksonükleaz aktivitesini inhibe etmektedir (Karu, 1975; Murphy, 1991 ve Murphy, 1998).

Lambda (λ) red plazmidi, arabinoz-indükleyebilen promotörün kontrolü altında eksprese edilen lambda genlerini (*gam*, *exo*, ve *beta*) içeren, sıcaklığa duyarlı, antibiyotik direnç geni (ampisilin ve tetrasiklin gibi) içeren ve düşük sayıda DNA kopyasına sahip bir plazmittir (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. *E. coli* genomunun modifikasyonunda kullanılan pPREDIA plazmidi (Yang ve ark., 2014).

Genelde, PCR’da şablon olarak, rekombinasyon aşamasında PKD3 (kloramfenikol) ya da PKD4 (kanamisin) plazmidleri kullanılmaktadır. Şekil 1.4.’te gösterildiği gibi, PKD3, FRT bölgeleri ile çevrili cat kaseti, antibiyotik direnç genleri (kloramfenikol ve ampisilin), ve promotör içeren bir şablon plazmittir (Datsenko ve Wanner, 2000).



Şekil 1.4. Rekombinasyon aşamasında kullanılan olan PKD3 plazmid.

Rekombinasyon için kullanılan lineer DNA fragmentleri, bir antibiyotik direnç markerini çevreleyen PCR fragmentleri ile üretilebilmektedir. *E. coli* kromozomuna homolojiye sahip olmayan üç π -bağımlı plazmidin (örn. pKD3) hedef geninin kısa homoloji bölgeleri (genelde 36 ila 50 bp) ile çevrili seçici bir marker üreten PCR amplifikasyonunda şablon olarak kullanılması için tasarlanmaktadır. Sadece modifikasyonu taşıyan koloniler agar plaklarındaki antibiyotik seçiminde üreyebilmektedir (Datsenko ve Wanner, 2000).

1.9.1.2. Daha Önce Yapılmış Mutasyon Çalışmaları

Mutasyonların prensibi iki genel kategoriye ayrılır: metabolik fonksiyonlar veya virülans faktörleridir. En yaygın çalışılan metabolik olarak zayıflatılmış suşlar, defektif aromatik amino asitleri (örn. *aroA* veya *aroC* ve *aroD*), defektif purinler (örn. *purA*, *purE*), defektif adenilat siklaz (örn. *cya*), veya defektif siklik AMP reseptör proteini (*crp*). Virülans-attenüe mutant aşılarda ise iki bileşenli düzenleyici sistem *phoP/phoQ* veya *Salmonella* patojenite adası 2 (SPI2) kullanılarak mutasyon oluşturulmaktadır (Gamazo ve Irache, 2007).

Birçok çalışmada *S. Enteritidis* atenüasyonu sağlamak amacıyla farklı genler üzerinde defektler yapılmıştır. *AroA* geni, glikolizi doğrudan aromatik amino asitlerin sentezine bağlayan “shikimate” yolun bir parçasıdır (Bentley ve Haslam., 1990). Bu nedenle *aroA*'nın silinmesi ile birlikte aromatik amino asitlerin eksikliğine bağlı *Salmonella* okzotrofik hale gelmekte ve *aroA* eksikliği olan *Salmonella* suşlarının oldukça zayıfladığı tahmin edilmektedir (Hoiseth ve Stocker, 1981).

Salmonella genlerinin büyük bir kısmı, *Salmonella* patojenite adaları (SPI's) adı verilen farklı bölgelerdeki kromozomda kümelenmektedir. Yaklaşık olarak 21 *Salmonella* patojenite adası (SPI's) tespit edilmiştir (Amanda ve ark., 2012). *Salmonella*'nın hücrelere invazyonu SPI-1'de bulunan tip III salgılama sistemi (T3SS) ile sağlanmaktadır (Baumler ve ark., 1996 ve Marcus ve ark., 2000). Cıvcıvlerin SPI-1 mutanıtı ile aşılamasından sonra inflamatuvar bir yanıt vermeden *S. Enteritidis* saha suşuna karşı koruyucu bağışıklığı sağlanmıştır (Marta ve ark; 2015). İnsan intestinal epitel hücreleri (Caco-2) kullanılarak yapılan bir *in vitro* analizde, SPI-1 mutant suşunun saha suşundan daha az invazif olduğu ve eprüvasyon testinde SPI-1 mutant ile aşılınmış kanatlılarda sistemik enfeksiyonunun geciktiği saptanmıştır (Taseen ve ark; 2009). SPI-1 defektif bazı suşların, oral yol ile murin tifosuna neden olma yetenekleri büyük ölçüde azalmıştır (Penheiter ve ark., 1997). Başka bir çalışmada, SPI-1 ve SPI-2'nin tavuklarda kolonizasyon için *S. Enteritidis*'in en önemli iki patojenik adası olduğu bildirilmiştir (Rychlik ve ark; 2009 ve Matulova ve ark; 2012).

Kanatlı hayvanların *SPI-1-lon-fliC* mutant ile oral aşılannasından sonra suşun etkinlik testlerinde attenüe ve immünojenik olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda aşıllı tavukların enfekte tavuklardan serolojik olarak ayırt edilmesi sağlanmıştır (Marta ve ark., 2013).

Birçok çalışmada, flagellaya bağı bakteriyel motilitenin adezyon veya invazyon için önemli olduğu bulunmuştur (Allen ve Woodward, 1999b; Jones ve ark., 1992 ve Khoramian ve ark., 1990). *Salmonella* serovarlarının çoğu, H1 (faz 1 *fliC*) ve H2 (faz 2, *fljB*) flagellin olarak adlandırılan ve antijenik olarak birbirinden farklı iki filament proteinine sahiptir (Kutsukake ve ark., 1990 ve Macnab ve ark., 1996). *Salmonella*, her iki proteini de kodlamakta, ancak aynı anda eksprese etmemektedir (Amanda ve ark., 2012). Ancak *S. Enteritidis*'in sadece *fliC* genini içerdđiği kanıtlanmıştır (Van Asten ve ark., 1995). Çalışmalardan birisinde, flagella barındırmayan mutant suşların, saha suşuna göre daha az bağlanma gösterdđiği kanıtlanmıştır (Allen ve Woodward, 1999a). Başka bir araştırmada, invazyon açısından *S. Enteritidis fliC* mutant suşu, saha suşundan 50 kat daha az bulunmuş (Fons ve ark., 2000) ve farklı bir çalışmada, *fliC* mutant suşunun attenüe olduğu saptanmıştır (Craig ve Jean, 2001). *FliC*'nin silinmesi, ticari olarak temin edilmiş ELISA kiti kullanılarak aşılannmış tavukların enfekte olmuş tavuklardan ayırt edilmesini sağlamıştır (Ulrich ve ark., 2011 ve Marta ve ark., 2013).

InvH bir dış membran lipoproteinidir ve *Salmonella* suşlarında T3SS'nin önemli bir parçasıdır (Altmeyer ve ark., 1993 ve Galan ve Watz, 2006). *InvH*'nin, *Salmonella*'nın patojenitesi, makrofajların lizisi, birkaç proteinin salgılanması, salgılayıcı ve enflamatuar immün yanıtları ve T3SS'nin bir kısmının lokalizasyonu için gerekli olduğunu bildirilmiştir (Daefler ve Russel, 1998 ve Kimbrough ve Miller, 2002). Ayrıca, *InvH* *Salmonella*'nın epitelyal hücrelere bağlanmasında ve konakçı-hücre etkileşiminde rol oynadđığını göstermektedir (Altmeyer ve ark., 1993). *S. Dublin* ve *S. Typhimurium invH* mutant suşlarının invazyonu, MDCK ve Int 407 hücre kültürü deneyleriyle test edilmiş ve bulgulara her iki hücre kültüründe invazyonun azaldđı gözlenmiştir (Watson ve ark., 1995). Bir araştırmada, *in-vitro* çalışmalarda, *S. Typhimurium invH* mutant suşunun invazyonunun saha suşunun invazyonuna kıyasla,

% 70-80'e düştüğü ve *invH-ssaV* çift mutant suşunun saha suşuna kıyasla *Sip* (*Salmonella* invasion protein) efektörünün salgılanmasını azalttığını göstermiştir (Pati ve ark., 2013).

Hücre içi proteoliz, stres kaynaklı proteinler olarak bilinen olan, *Lon*, *Clp* familyası, *HslUV* ve *FtsH* dahil olmak üzere, dört enerjiye bağlı proteaz tarafından başlatılmaktadır (Akiko ve ark., 2002). *Clp* proteaz, *Lon* ile birlikte hücrede protein degradasyonunun % 80'ini oluşturan ATP'ye bağlı proteazlardan biridir (Thomsen ve ark., 2002). *Clp* kompleksi arasında, ATP hidrolizini gerektiren bir işlemde peptitleri parçalayan ve yanlış katlanmış proteinlerin parçalanmasında rol oynayan proteolitik bir bileşen olan *ClpP* bulunmaktadır (Nicholas ve ark., 2008). Önceki çalışmalarda, *ClpP* eksikliğinin farelerde virölans azalmasına, *Salmonella* patojenite adası 1'in (SPI1) ve SPI4 virölans genlerinin transkripsiyonunun azalmasına neden olduğunu gösterilmiştir (Ran ve ark., 2018).

Salmonella proteini tirozin fosfataz (*SptP*), *Salmonella* patojenite adalarında (SPI-1) kodlanmış bir *Salmonella* T3SS efektör proteinidir. Bu protein, tirozin fosfataz ve GTPaz aktive edici protein (GAP) içermekte, konakçı hücre fizyolojisini değiştirmekte ve hücrede bakteriyel yaşamı desteklemektedir (Fu ve Galan, 1999 ve Kaniga ve ark., 1996). *SptP*, interlöykin-8'in üretimini bastırmakta ve bunun sonucu olarak *Salmonella* invazyonu ve hücre içi replikasyonu desteklemektedir (Haraga ve Miller, 2003 ve Lin ve ark., 2003). *S. Enteritidis sptP* mutant suşunun farelerde immünojenik ve güvenli olduğu, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak bakteriyel kolonizasyonu azalttığını bildirilmiştir (Lin ve ark., 2017).

Ayrıca, *Salmonella* attenüasyonu için yapılan farklı çalışmalarda, *lon*, *aroD*, *ompR* ve *htrA* (Karasova ve ark., 2009), *HupAB* (Milanez ve ark., 2018), *phoPfliC* (Ulrich ve ark., 2011), *hilAssrAfliG* (De Cort ve ark., 2015) ve *Lon-cpxR* (Rahul ve ark., 2011) gibi genlerde delesyonlar yapılmıştır.

1.9.2. İnaktif Aşılar

İnaktif aşılar fiziksel (ısı) veya kimyasal maddeler (β -propiolakton, glutaraldehit veya formaldehit) kullanılarak tüm organizma inaktif hale getirilmektedir (Gamazo ve Irache, 2007).

İnaktif aşılar, ilk kez atlarda salmonellozun kontrolü için başarıyla kullanılmıştır. Daha sonra, *S. Typhimurium*, *S. Abortusequi*, *S. Dublin*, *S. Virchow*, *S. Gallinarum*, ve *S. Enteritidis* inaktif aşıları geliştirilmiştir. Ancak, canlı ve inaktif aşıların karşılaştırmalı analizinde, yalnızca yüzey antijenlerin bulunması sebebiyle eksik bir koruyucu antikor yanıtı vermesi, salmonellozda gereken uzun süreli koruma için önemli olan hücresel yanıtı vermemesi, ve mukozal yüzeylerdeki salgılayıcı immünoglobulin (sIgA) üretimini sağlamaması gibi nedenlerle inaktif aşıların etkisinin canlı aşıların etkisinden daha az olduğu tespit edilmiştir (Singh, 2009).

1.9.3. Subünit Aşılar

Subünit aşılar, bakterinin immünodominant bileşenlerini içeren aşılardır. Patojenin, sentetik peptitlerinin ham veya saflaştırılmış ekstraktlarından hazırlanmakta, veya rekombinant DNA teknolojisi kullanarak, saf DNA veya RNA kullanımıyla elde edilmektedir (Gamazo ve Irache, 2007). *Salmonella*'nın yaygın hücre altı bileşenleri, dış membran proteinleri (OMP), porinler, toksinler, ve ribozomal fraksiyonları gibi antijenik ürün, yapı ve komponentleri bu tür aşıların geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Singh, 2009).

1.10. Kontrol

İnsanlarda salmonellozun kontrolü için, gıda hijyeni, tüketime hazır ve/veya işlenmiş gıdaların kontrolü ile tavuklarda enfeksiyon kontrolü gerekmektedir (Ehuwa ve ark., 2021).

Kanatlı hayvanlarda ise, güvenlik önlemleri, kesim öncesi (örneğin: çiftlikte), kesim esnasında (örneğin: kesimhaneye nakliye ve kesim hattında) ve kesim sonrası (örneğin: işleme ve hazırlık sırasında) olmak üzere farklı aşamalarda önlemler alınabilmektedir. Ayrıca, salmonelloz kontrolü için biyogüvenlik önlemleri, *Salmonella* içermeyen kanatlı yemleri ve içme suları, ek olarak aşılama, ve kolonizasyon-inhibisyon uygulamaları gerekmektedir (De Cort, 2015).

Bu tezin amacı, bakterinin virülens antijenlerini kodlayan genlerde delesyon yaparak, kanatlı hayvanlarda aşı potansiyeli olan *Salmonella* Enteritidis *aroA* ve *ClpP* mutant suşlarının geliştirilmesi ve *in vitro* koşullarda özelliklerinin karşılaştırılmasıdır.

1. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. *Salmonella* Enteritidis Suşları

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda kanatlı kümeslerinin altlık örneklerinden izole ve identifiye edilen ve daha önce pulsed field jel elektroforezi ile tiplendirilen SEI-WT (kod: Düzce 138-10635) ve SEIII-WT (kod: Sultanbey 9699C) *Salmonella* Enteritidis suşları kullanıldı. Bu suşlardan SEI-WT suşu mutantları oluşturmak için, SEIII-WT suşu ise genotipik değerlendirme için seçildi.

2.1.2. Besiyerleri

2.1.2.1. Luria Bertoni (LB) Broth-Lennox (LAB-İngiltere)

Trypton 10 g, maya ekstraktı 5 g, sodyum klorid 5 g. Besiyeri içeriği distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Sterilizasyon işleminden önce pH $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı. Otoklavda 121°C 'de 15 dk sterilize edildi. Soğutulduktan sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'te saklandı.

2.1.2.2. Luria Bertoni (LB) Agar-Lennox (LAB-İngiltere)

Trypton 10 g, maya ekstraktı 5 g, sodyum klorid 5 g, agar 15 g. Besiyeri içeriği distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Sterilizasyon işleminden önce pH $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı. Otoklavda 121°C 'de 15 dk steril edildi. Katı besiyerleri 47°C 'ye soğutulduktan sonra petrilere dağıtıldı.

2.1.2.3. Ampisilin içeren (50 µg/mL) LB Broth-Lennox (LAB-İngiltere)

Tripton 10 g, maya ekstraktı 5 g, sodyum klorid 5 g. Besiyeri içeriği distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Sterilizasyon işleminden önce pH $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edildi. Soğutulduktan sonra 50 µg/mL olacak şekilde ampisilin selektif supplement (Oxoid-Thermo Fisher, USA) eklendi ve +4°C'de saklandı.

2.1.2.4. Kloramfenikol içeren (100 µg/mL) LB Agar-Lennox (LAB-İngiltere)

Tripton 10 g, maya ekstraktı 5 g, sodyum klorid 5 g, agar 15 g. Besiyeri içeriği distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Sterilizasyon işleminden önce pH $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edildi. Katı besiyerleri 47°C'ye soğutulduktan sonra 100 µg/mL olacak şekilde kloramfenikol selektif supplementi (Oxoid-Thermo Fisher, USA) eklendi ve petrilere dağıtıldı.

2.1.2.5. Nutrient Agar (Merck, Almanya)

Et peptonu 5 g; Et ekstraktı 3 gr; Agar 12 gr. Besiyeri distile su içinde ısıtılarak eritildi, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi ve 45-50°C'ye soğutulup steril petrilere döküldü.

2.1.2.6. Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar (Neogen- İngiltere)

Maya ekstraktı 3 g, sodyum klorid 5,0 g, ksiloz 3,75 g, laktoz 7,5 g, sükroz 7,5 g, L-lizin hidroklorid 5 g, sodyum tiyosülfat 6,8 g, ferrik amonyum sitrat 0,8 g, fenol kırmızısı 0,08 g, sodyum deoksikolat 1 g, agar 13 g. Besiyeri içeriği distile su ile 1000

ml'ye tamamlandı. Sık sık karıştırılarak hızlıca kaynama noktasına getirildi ve hemen 45-50°C'lik bir su banyosuna koyuldu. Soğutulduktan sonra petrilere dağıtıldı.

2.1.2.7. Mueller-Hinton (MH) Agar (Merck, Almanya)

Et infüzyonu 2 g, kazein hidrolizatı 17,5 g, nişasta 1,5 g, agar 13 g. Besiyeri 1000 ml distile su içinde ısıtılarak eritildi, otoklavda 121°C'de 10 dakika sterilize edildi. 45-50°C'ye soğutulduktan sonra steril petrilere döküldü.

2.1.2.8. Mueller-Hinton (MH) Broth (Merck, Almanya)

Et infüzyonu 2 g, kazein hidrolizatı 17,5 g, nişasta 1,5 g. Besiyeri 1000 ml distile su içinde ısıtılarak eritildi, otoklavda 121°C'de 10 dakika sterilize edildi. Soğutulduktan sonra +4 °C'de saklandı.

2.1.2.9. Modifiye Edilmiş Rappaport Vassiliadis (MSRV) Yarı Katı Besiyeri (Merck, Almanya)

Hayvan ve bitki dokusunun enzimatik sindirimi 4,6 g, Kazein Hidrolizat 4,6 g, NaCl 7,3 g, KH₂PO₄ 1,5 g, anhydrous MgCl₂ 10,9 g, Malakit Yeşil Oksalat 0,04 g, agar 2,7 g, novobiocin sodyum supplement tuzu 0,01 g. MSRV yarı katı besiyeri ISO 6579 protokoluna göre hazırlandı. Besiyeriden 15,8 g alındı ve 500 ml distile su içinde çözüldü. Sık sık çalkalanarak kaynayan suda eritildi. Bir şişe MSRV selective supplement'in liyofilizatı, 1 ml steril, saf su eklenerek çözüldü ve besiyerine eklendi. 45-50°C'ye soğutulduktan sonra petrilere döküldü.

2.1.2.10. Super Optimal Broth with Catabolite Repression (SOC) Broth Besiyeri (ABD)

Trypton: 20 g, maya ekstraktı: 5 g, NaCl: 0,5 g, MgSO₄: 0,96 g, Glikoz: 3,6 g, KCl: 0,186 g. Besiyeri içeriği distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Sterilizasyon işleminden önce pH 7,0 ± 0,2'ye ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edildi ve +4°C de saklandı.

2.1.3. Ticari Kitler, Tampon Solüsyonlar ve Çözeltiler

Çizelge 2.1. Testlerde Kullanılan Ticari Kitler, Tampon Solüsyonlar ve Çözeltiler.

No.	Kitler/ Tampon solüsyonlar/ Çözeltiler/ Kimyasallar	Üretici Firma	Orijini
1.	Microgen™ GnA+B-ID System	Microgen Bioproducts	İngiltere
2.	GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher	ABD
3.	GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher	ABD
4.	PCR Master Mix (2X)	Thermo Fisher	ABD
5.	UltraPure™ Agarose	Thermo Fisher	ABD
6.	Tris Borate EDTA Buffer (TBE, 10X)	Thermo Fisher	ABD
7.	Phosphate Buffered Saline (PBS)	Oxoid	İngiltere
8.	Egg Yolk Tellurite	Merck	Almanya
9.	Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Thermo Fisher	ABD
10.	Domuz Serum	Thermo Fisher	ABD
11.	L-(+)-Arabinose 99%	Sigma-Aldrich	ABD
12.	Glycerol 99.5%	Sigma-Aldrich	ABD
13.	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich	ABD
14.	Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich	ABD
15.	Fetal Bovine Serum	Sigma-Aldrich	ABD
16.	BSA, Molecular Biology Grade	New England Biolabs	ABD
17.	N-Lauroylsarcosine sodium salt 94%	Sigma-Aldrich	ABD
18.	SeaKem® Gold Agarose	Lonza Bioscience	İsviçre
19.	Sodium Dodecyl Sulphate	VWR	ABD
20.	TiO ÜRE	Labshop	Türkiye
21.	TRIS borate- EDTA	Sigma-Aldrich	ABD
22.	Ethidium Bromide	Sigma-Aldrich	ABD
23.	SYBR Safe-DNA Gel Stain	Thermo Fisher	ABD
24.	Cell Suspension Buffer	Sigma-Aldrich	ABD
25.	Proteinase K	New England Biolabs	ABD
26.	TE Buffer	Thermo Fisher	ABD
27.	DpnI (10 U/ µL)	Thermo Fisher	ABD
28.	XbaI (10 U/ µL)	Thermo Fisher	ABD
29.	100 bp DNA Ladder	Himedia	Hindistan
30.	1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen	ABD
31.	1 kb/1000bp DNA Ladder	GeneON	Almanya

32.	10X Fast Digest Buffer	Thermo Fisher	ABD
33.	S. Braenderup (H9812) Standard	ATCC	ABD
34.	Triton X-100	Sigma-Aldrich	ABD
35.	Gentamicin Solution (Cell Cultured Tested)	Sigma-Aldrich	ABD

2.1.4. Cihaz ve Ekipmanlar

Çizelge 2.2. Testlerde Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar.

No.	Ekipmen/Cihaz	Üretici Firma	Orijini
1.	Soğutmalı Santrifüj Z 366 K	Hermle	Almanya
2.	Spektrofotometre (BD PhoenixSpec™nephelometer)	BD	ABD
3.	Isı Bloğu	Bio TDB-100	Letonya
4.	Hassas Terazı	Scaltec	ABD
5.	Vorteks	Fine Vortex	Kore
6.	Nano-Drop 2000 Spektrofotometre	Thermo-Scientific	ABD
7.	ARKTIK PCR Cihazı	Thermo-Scientific	ABD
8.	Jel Elektrophorez Ünitesi	Thermo-Scientific	ABD
9.	Güç Kaynağı (WEALTEC ELITE 300 Plus Power Supply)	WEALTEC	ABD
10.	PFGE CHEF-DR III	Bio-Rad	ABD
11.	MicroPulser Electroporator	Bio-Rad	ABD
12.	Görüntüleme Cihazı	SYNGENE	ABD
13.	Safe 2020 Biyolojik Güvenlik Kabini	Thermo-Scientific	ABD
14.	pH Metre	Model 420A	Hollanda

2.1.5. Plazmidler

Bu çalışmada *S. Enteritidis* mutant suşları oluşturmak için Gene Bridges firmasından temin edilen pRedET (ampisilin) ve Nova Lifetech firmasından elde edilen PKD3 (kloramfenikol) plazmidler kullanılmıştır.

2.1.6. PCR Primer Çiftleri

Tezde kullanılan primerler NCBI Primer-BLAST web sitesi kullanılarak tasarlanmıştır. Primerler Sentebiyolab firmasında sentezlettiler.

Çizelge 2.3. Primer Çiftleri.

Gen	Primer	Oligonükleotid Dizisi	Ürün	Referans
<i>Gam</i>	⁺ P3-F	5'TAGCGGATCCTACCTGAC'3	596 bp	Ran ve ark., 2018
	⁺ P4-R	5'ATCAGTTCCTGTGGGTCG'3		
<i>aroA</i>	[*] <i>aroA</i> 45F	5'ATGGAATCCCTGACGTTACAACCCA TCGCGCGGGTCGATGGCGCCGTGTAGGCT <u>GGAGCTGCTTC</u> '3	1104 bp	Bu Çalışmada
	[*] <i>aroA</i> 45R	5'TTAGGCAGGCGTACTCATTGCGCCAGT TGTTTCGAAATAATCAGGCATATGAATATC <u>CTCCTTAG</u> '3		
	^{**} <i>aroAF</i> _CTR	5'TCTATCTATAACGCCATGCC'3	1652 bp (WT), 1470 bp (mutant)	Karasova ve ark., 2009
	^{**} <i>aroAR</i> _CTR	5'ATTCACGCCATTTTACATC'3		
	⁺⁺ <i>aroAF</i> _CTR	5'TCTATCTATAACGCCATGCC'3	0 bp (WT), 428 bp (mutant)	Karasova ve ark., 2009
	⁺⁺ CM-R	5'TTTTCACCATGGGCAAATAT'3		
	^{****} <i>aroA</i> -F	5'TGAAAACCTTTGGCGTGAG'3	177 bp (WT), 0 bp (mutant)	Bu Çalışmada
	^{****} <i>aroA</i> -R	5'GGCCAATCCGGTCACTTTT'3		
<i>ClpP</i>	[*] P1-F	5'TTGTTATGCTTGAATTATGGCGATGCCG TACCCATTACAGAGGGACTGGCTGATAAT <u>AGCGATTGTGTAGGCTGGAG</u> '3	1166 bp	Ran ve ark., 2018
	[*] P2-R	5'TCAATTACGATGGGTCAAAATTGAGTCA ACCAAACCGTACTCTACCGCTTCAGGCGC <u>TTAACGGCTGACATGGGAATTAG</u> '3		
	^{**} P5-F	5'GCTTGAATTATGGCGATGC'3	728 bp (WT), 1152 bp (mutant)	Ran ve ark., 2018
	^{**} P6-R	5'ACGATGGGTCAAAATTGAGTC'3		
	⁺⁺ P5-F	5'GCTTGAATTATGGCGATGC'3	0 bp (WT), 291 bp (mutant)	Ran ve ark., 2018
	⁺⁺ CM-R	5'TTTTCACCATGGGCAAATAT'3		

*: Lambda red rekombinasyonda kullanılan primerler. Şablon olarak kullanılmış olan PKD3 plazmidin dizisinin altı çizilmiştir. **: Dış konfirmasyon primerleri (Tüm PKD3 kaseti amplifiye etmek için). ++: Konfirmasyon primerleri (Genomda pKD3 kasetinin 5' ucunu tespit etmek için kullanılmıştır). ***: *aroA* genini iç primerleri. +: pRedET plazmidin transformasyonu olup olmadığını tespit etmek için kullanılan konfirmasyon primerleri.

2.2. Yöntem

2.2.1. Mutantların Oluşturulması

S. Enteritidis'in saha tipi suşlarının (SEI-WT) mutantları Datsenko ve Wanner (2000)'ın yöntemine göre *ClpP* ve *aroA* genlerinin delesyonu ile elde edildi.

2.2.1.1. Elektrokompotent SEI-WT Suşunun Oluşturulması ve pRedET Plazmidinin Transformasyonu

LB agarda üretilmiş SEI-WT suşundan bir koloninin 10 ml LB brotha ekim yapıldı ve gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Kültürden 50 µl'lik hacim, 50 ml LB broth içeren bir falkon tüpüne inoküle edildi ve 37°C'de 200 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. OD₆₀₀, 0,5'e (~2 saat) ulaştığında kültür, 30 dakika buzda bekletildi. Sonra, kültür 4°C'de 15 dakika 4500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pelet 1 kez soğuk steril distile su ile, 2 kez soğuk steril %10 gliserol ile yıkandı. Pelet, 500 µl steril soğuk %10 gliserol ile çözüldü ve önceden soğutulmuş 5 adet eppendorf tüpüne (her biri 100 µl) dağıtıldı. Elektro-kompotent bakterileri içeren eppendorf tüplerinden birisi transformasyon için kullanılmış ve diğer tüpler -80°C'de saklandı. pRedET plazmidinden 2 µl (40 ng), 100 µl elektro-kompotent bakteriye aktarıldı ve 15 dakika buzda bekletildi. Bakteriler, 0.1 cm'lik bir elektroporasyon küvetine aktarıldı. Plazmidin transformasyonu için 1800 V'ta elektroporasyon yapıldı ve 30

dakika buzda bekletildi. Bakteri, 900 µl SOC besiyeri içeren bir eppendorf tüpüne aktarıldı ve 30°C'de 2 saat inkübe edildi. Kültür santrifüj edildi ve süpernatantdan 900 µl atıldı. Pelet içeren kalan 100 µl, ampicilinli LBA besiyeri (50 µg /ml) içeren petrilere dağıtıldı ve gece boyunca 30°C'de inkübe edildi. Üremiş kültürden tek bir koloni alındı ve yeni ampicilinli LBA (50 µg /ml) besiyerine ekim yapıldı.

2.2.1.1.1. pRedET plazmidin Ekstraksiyonu ve Transformasyonun PCR ile Doğrulanması

2.2.1.1.1.1. Plazmidin Ekstraksiyonu

pRedET plazmidin ekstraksiyonu GeneJET Plazmid Miniprep Kiti (Thermo-Scientific) ile kitin önerdiği koşullar doğrultusunda yapıldı:

Ampicilinli LB agarda üretilmiş transforme suşundan bir koloni sterilize edilen öze ile alınarak 5 ml LB brotha ekimi yapıldı ve gece boyunca 30°C'de inkübe edildi. Kültür oda sıcaklığında 2 dakika 8000 rpm santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pelet 250 µl süspansiyon tamponunda süspanse edildi ve mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 250 µl lizis tamponu eklendi ve karıştırıldı. 350 µl nötralizasyon solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. Karışım 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant GeneJET kolonuna aktarıldı ve 1 dakika santrifüj edildi. Süzüntü atıldı ve kolon aynı toplama tüpüne geri yerleştirildi. 500 µl yıkama tamponu eklendi ve 1 dakika santrifüjlendi. Süzüntü atıldı ve kolon aynı toplama tüpüne geri yerleştirildi. Kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve 50 µl elüsyon tamponu eklendi. Kolon 2 dakika oda sıcaklığında bırakıldı ve 2 dakika santrifüj edildi. Kolon atıldı ve plazmid DNA'yı içeren mikrosantrifüj tüpü -20°C'de saklandı.

2.2.1.1.1.2. Transformasyonun PCR ile Doğrulanması

PCR reaksiyonunda forward P3 ve reverse P4 primer çifti kullanılarak *Gam* genindeki 596 bazlık hedef bölge çoğaltıldı. PCR reaksiyonu karışımı örnek başına 2X PCR master mix 12,5 µl, forward primer 1 µl, reverse primer 1 µl, moleküler saflıkta su 8,5 µl, ve plazmid ekstraksiyonundan elde edilen kalıp DNA 2 µl olarak reaksiyona eklendi. Reaksiyon karışımlarının hazırlanması süresince kuru buz üzerine çalışıldı. Kalıp DNA'nın çoğaltılması aşaması önceden programlanmış olan thermal cycler'da 95°C 5 dakikalık ön denatürasyondan sonra 95°C 20 saniye denatürasyon, 51°C 1 dakika primer bağlanması, 72°C 90 saniye ekstensiyon şeklinde toplamda 35 siklusa gerçekleştirildi. Son siklusu takiben 72°C 'de 10 dakikalık final ekstensiyon aşamasının ardından örnekler agaroz jel elektroforezinde incelendi.

2.2.1.1.1.2.1. PCR Ürünün Görüntülenmesi

2.2.1.1.1.2.1.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifiye edilmiş olan örneklerin elektroforezinde %1'lik yoğunlukta agaroz jel kullanıldı. Bunun için 1 g agaroz 100 ml TBE tamponu (1X konsantrasyonda) içeren bir erlenmayere konuldu. Mikrodalga fırında 1.5 dakikada kaynatılarak eritildi. Soğutulduktan sonra içerisine SYBR safe stain (10 µl) eklenerek karıştırıldı ve tarak yerleştikten sonra yatay elektroforez cihazının kalıbına döküldü. Agaroz gel katılaştıktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı.

2.2.1.1.1.2.1.2. Jelin Görüntülenmesi

Agaroz jelin katılaşmasından sonra elektroforez tankına konuldu ve üzerine 1X TBE tamponu döküldü. Negatif kontrol dahil olmak üzere her numuneden 12 µl, 2 µl 6X yükleme boyasıyla karıştırıldı ve jelin gözlerine ayrı ayrı yüklendi. Son göze 10 µl

marker (Invitrogen1 kb plus DNA Ladder) eklendi. Jel 180 V'de 45 dakika elektroforeze edildi. Elektroforezin sonunda jel SYNGENE görüntüleme cihazında görüntülendi. Spesifik bant veren numuneler başarıyla transforme edilmiş kabul edildi ve 'SEI-WT-RedET' olarak adlandırıldı.

2.2.1.2. Homolog Uçlu Lineer DNA Kasetinin Amplifikasyonu

Bu çalışmada PCR ile iki kaset (*aroA* ve *ClpP* homolog uçları olan lineer DNA) çoğaltıldı. , Her iki kasetin çoğaltması, *ClpP* geninin delesyonu için P1-F ve P2-R primer çifti ve *aroA* geninin delesyonu için *aroA* 45F ve *aroA* 45R primer çifti kullanılarak Datsenko ve Wanner (2000)'ın yöntemine göre gerçekleştirildi. Şablon olarak kullanan pKD3 plazmidi, *ClpP* geni için *ClpP*-PKD3 kaseti (1166 bp) ve *aroA* geni için *aroA*-PKD3 kaseti (1104 bp) oluşturuldu.

AroA-PKD3 kaseti oluşturmak için, PCR reaksiyonu karışımı örnek başına 2X PCR master mix 12,5 µl, forward primer 1 µl, reverse primer 1 µl, moleküler saflıkta su 10 µl, ve PKD3 plazmidinden 0,5 µl olarak karışım yapıldı. *ClpP*-PKD3 kaseti oluşturmak için, PCR reaksiyonu karışımı örnek başına 2X PCR master mix 12,5 µl, forward primer 2,5 µl, reverse primer 2,5 µl, moleküler saflıkta su 7 µl, ve PKD3 plazmidinden 0,5 µl (50 ng) olarak karışım yapıldı. Her kaset için toplam 20 PCR reaksiyonu hazırlandı. Reaksiyon karışımlarının hazırlanması süresince kuru buz üzerine çalışıldı.

Kasetlerin çoğaltması için, önceden programlanmış olan thermal cycler'da 95°C'de 7 dakika ön denatürasyonun ardından 98°C 10 saniye denatürasyon, 55°C 30 saniye primer bağlanması, 72°C 2 dakika ekstensiyon şeklinde toplam 35 siklуста gerçekleştirildi. Son siklusu takiben 72°C 'de 10 dakikalık final ekstensiyon aşamasının ardından PCR ürünleri tek bir tüpte toplandı, *DpnI* restriksiyon enzimi

(Thermo-Scientific) ile muamele edildikten sonra GeneJET PCR pürifikasyon kiti ile saflaştırıldı ve agaroz jel elektroforezinde incelendi.

2.2.1.2.1. *DpnI* Restriksiyon Enzimi ile PKD3 Plazmid Eliminasyonu

PCR ürünüde kalan PKD3 plazmidi *DpnI* restriksiyon enzimi (10 U/ µl) ile uzaklaştırıldı. Önce PCR ürünüdeki DNA miktarı Nano-Drop 2000 Spektrofotometre cihazı ile ölçüldü ve miktarına göre *DpnI* restriksiyon enzimi karışımına eklendi. *DpnI* restriksiyon enziminin karışımı hazırlamak için 240 µl nükleaz içermeyen suyu, 30 µl 10X Tango tamponu, ve 7,5 µl *DpnI* enzimi sterile bir mikrosentrifüj tüpünde karıştırıldı ve PCR ürünü (~ 30 ng/ µl) bu karışıma eklendi. Karışım 37°C'de 1 saat inkübe edilmesinin ardından -20°C'de saklandı.

2.2.1.2.2. *ClpP*-PKD3 ve *aroA*-PKD3 Kasetlerinin Pürifikasyonu

GeneJET PCR pürifikasyon kiti (Thermo-Scientific) ile kitin önerdiği koşullar doğrultusunda *ClpP*-PKD3 ve *aroA*-PKD3 kasetlerinin pürifikasyonu yapıldı.

PCR ürününe bağlama tamponu eklendi (1:1) ve karıştırıldı. Karışım, GeneJET saflaştırma kolonuna aktarıldı ve 1 dakika santrifüj edildi. Süzüntü atıldıktan sonra 700 µl yıkama tamponu tüpe eklendi ve 1 dakika santrifüj edildi. Süzüntü atıldı ve kalan yıkama tamponunu uzaklaştırmak için boş kolon ekstra 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve kolon, yeni steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolonun ortasına 100 µl nükleaz içermeyen su konuldu ve 1 dakika santrifüj edildi. Son olarak, kolon atıldı ve saflaştırılmış PCR ürünü -20°C'de saklandı.

2.2.1.2.3. Saflaştırılmış PCR Ürünün Görüntülenmesi

2.2.1.2.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz Jel Elektroforezi 2.2.1.1.1.2.1.1. paragrafında anlatıldığı gibi yapıldı.

2.2.1.2.3.2. Jelin Görüntülenmesi

Jelin görüntülenmesi 2.2.1.1.1.2.1.2. paragrafında anlatıldığı gibi yapıldı, fakat numuneden 2 µl, 10 µl steril distile suyunda sulandırıldıktan sonra 2 µl 6X yükleme boyasıyla karıştırıldı ve jelin gözeneklerine yüklendi.

2.2.1.3. Lineer DNA Kasetlerinin Transformasyonu

Lineer DNA kasetinin transformasyonunun amacıyla SEI-WT-RedET suşundan elektro-kompetent bakteri oluşturuldu. *ClpP* ve *aroA* mutanları oluşturmak için aynı yöntem kullanıldı.

Bunun için, ampisilinli LB agarda (50 µg/ml) üretilmiş SEI-WT-RedET suşundan bir koloni 10 ml ampisilinli LB brotha (50 µg /ml) ekimi yapıldı ve gece boyunca 30°C'de inkübe edildi. %10 L-arabinoz (%99) distile suda çözündürüldü ve 0,22µm filtre ile steril edildi. L-arabinoz solüsyonundan 900 µl 50 ml LB broth içeren bir falkon tüpe ilave edildikten sonra kültürden 50 µl inoküle edildi ve 30°C'de 200 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. OD₆₀₀, 0,5'e (~2.5 saat) ulaştığında kültür, 30 dakika buzda bekletildi. Sonra, kültür 4°C'de 15 dakika 4500 rpm santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pelet 2 kez soğuk steril distile su ile, 2 kez soğuk steril %10 gliserol ile yıkandı. Pelet, 450 µl steril soğuk %10 gliserol ile çözüldü ve önceden soğutulmuş

5 adet eppendorf tüpüne (her biri 90 µl) dağıtıldı. SEI-WT-RedET elektro-kompetent bakterileri içeren eppendorf tüplerinden birisi transformasyon için kullanılmış ve diğer tüpler -80°C'de saklandı. Kasetten 10 µl (1500 ng), 100 µl elektro-kompetent bakteriye eklendi ve 15 dakika buzda bekletildi. Bakteriler, 0,1 cm'lik bir elektroporasyon küvetine aktarıldı. Kasetin transformasyonu için 1800 V'ta elektroporasyon yapıldı ve ardından 30 dakika buzda bekletildi. Bakteri, 900 µl SOC besiyeri içeren bir eppendorf tüpüne aktarıldı ve 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Kültür santrifüj edildi ve süpernatanttan 900 µl atıldı. Pelet içeren kalan 100 µl SOC besiyeri, kloramfenikollü LBA besiyeri (100 µg /ml) içeren petrilere dağıtıldı ve gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Üremiş kültürden tek bir koloni alındı ve kloramfenikollü LBA besiyeri (100 µg /ml) içeren petrilere ekim yapıldı.

2.2.1.4. Suşların DNA Ekstraksiyonu ve Mutasyonların PCR ile Konfirmasyonu

Mutantların (*ClpP* ve *aroA*) ve SEI-WT suşlarından DNA ekstraksiyonu ve PCR yapıldı.

2.2.1.4.1. DNA Ekstraksiyonu

GeneJET genomik DNA pürifikasyon Kiti (Thermo-Scientific) ile aşağıda belirtilen kitin önerdiği koşullar doğrultusunda mutantların DNA ekstraksiyonu yapıldı.

LB agarda üremiş suşundan bir koloni 5 ml LB brota ekim yapıldı ve gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Kültürden 2 ml mikrosentrifüj tüpüne aktarıldı. Kültür oda sıcaklığında 10 dakika 6000 rpm santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pelleti 180 µl sindirim tamponunda yeniden süspansiyon haline getirildi, üzerine 20 µl Proteinaz

K eklendi ve vorteksleyerek karıştırıldı. Karışım 56°C'de yaklaşık 30 dakika çalkanarak inkübe edildi. RNase A solüsyonundan 20 µl eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Liziz solüsyonundan 200 µl eklendi ve vorteksleyerek karıştırıldı. 400 µl %50 alkol eklendi ve vorteksleyerek karıştırıldı. Lizat GeneJET genomik DNA pürifikasyon kolona aktarıldı ve 8000 rpm 1 dakika santrifüj edildi. Süzüntü atıldı ve kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. 500 µl yıkama tamponu I solüsyonundan kolona eklendi ve 10000 rpm 1 dakika santrifüj edildi. Süzüntü atıldı ve 500 µl yıkama tamponu II solüsyonundan kolona eklendi ve 13000 rpm 3 dakika sentrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolonun ortasına 200 µl elüsyon tamponu eklendi, 2 dakika oda sıcaklığında bırakıldı ve 10000 rpm 2 dakika santrifüj edildi. Kolon atıldı ve bakterinin DNA'sı içeren mikrosantrifüj tüpü -20°C'de saklandı.

2.2.1.4.2. Mutasyonların PCR ile Konfirmasyonu

Mutasyonların olup olmadığı doğrulanması için çeşitli primer çifti kullanılarak koloni PCR yapıldı. PCR reaksiyonunda kullanılan konfirmasyon primer çifti, PCR karışımı, thermal cycler programı, ve beklenen PCR ürünün uzunluğu aşağıdaki tabloda gösterildi.

Çizelge 2.4. SEI-WT ve kloramfenikol dirençli kolonilerin koloni PCR taraması.

Gen	*Primer Çifti	PCR Karışımı	Thermal Cycler Programı	Beklenen PCR Ürünün Uzunluğu (bp)	
				WT	**Mutant
<i>ClpP</i>	P5-F ve P6-R	2X mastermix: 12,5 µl, P5-F: 1 µl, P6-R: 1 µl, nüleaz içermeyen suyu: 7,5 µl, DNA: 3 µl	Ön denatürasyon: 95°C'de 300 saniye. 35 siklus (denatürasyon: 95°C'de 20 saniye, bağlanma: 1 dakika 47°C, ekstensiyon 72°C'de 90 saniye). Son ekstensiyon: 72°C 10 dakika.	728	1152
	P5-F ve +CM-R	2X mastermix: 12,5 µl, P5-F: 1,5 µl, CM-R: 1,5 µl, nüleaz içermeyen suyu: 7,5 µl, DNA: 2 µl	Ön denatürasyon: 95 °C 300 saniye. 35 siklus (denatürasyon: 95 °C 20 saniye, bağlanma: 1 dakika 45 °C, ekstensiyon 72 °C 60 saniye). Son ekstensiyon: 72 °C 10 dakika.	0	291
<i>aroA</i>	<i>aroAF_CT</i> R ve <i>aroAR_C</i> TR	2X mastermix: 12,5 µl, <i>aroAF_CTR</i> : 1 µl, <i>aroAR_CTR</i> : 1 µl, nüleaz içermeyen suyu: 7,5 µl, DNA: 3 µl	Ön denatürasyon: 95 °C 300 saniye. 35 siklus (denatürasyon: 95 °C 20 saniye, bağlanma: 1 dakika 50 °C, ekstensiyon 72 °C 90 saniye). Son ekstensiyon: 72 °C 10 dakika.	1652	1470

	<i>aroAF_CT</i> R ve ⁺ CM-R	2X mastermix: 12,5 µl, <i>aroAF_CTR</i> : 1,5 µl, CM-R: 1,5 µl, nüleaz içermeyen suyu: 7,5 µl, DNA: 2 µl	Ön denatürasyon: 95 °C 300 saniye. 35 siklus (denatürasyon: 95 °C 20 saniye, bağlanma: 1 dakika 45 °C, ekstensiyon 72 °C 60 saniye). Son ekstensiyon: 72 °C 10 dakika.	0	428
	<i>aroA-F</i> ve <i>aroA-R</i>	2X mastermix: 12,5 µl, <i>aroAF_CTR</i> : 1 µl, <i>aroAR_CTR</i> : 1 µl, nüleaz içermeyen suyu: 6,5 µl, DNA: 4 µl	Ön denatürasyon: 95 °C 300 saniye. 35 siklus (denatürasyon: 95 °C 20 saniye, bağlanma: 1 dakika 55 °C, ekstensiyon 72 °C 60 saniye). Son ekstensiyon: 72 °C 10 dakika.	177	0

*: ClpP rekombinantı için 2 farklı primer seti ve *aroA* rekombinantı için 3 farklı primer seti kullanıldı.

** : Pozitif rekombinantlar, fonksiyonel *aroA* ve *ClpP* genleri yerine lineer kaseti içermektedir. ⁺: Kloramfenikol asetiltransferaz primerinin 1. bağlanma yeri.

2.2.1.4.2.1. Rekombinantların ve SEI-WT PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

2.2.1.4.2.2. Agaroz Jel Elektroföresi

Agaroz Jel Elektroföresi 2.2.1.1.2.1.1. paragrafında anlatıldığı gibi yapıldı.

2.2.1.4.2.3. Jelin Görüntülenmesi

Jelin görüntülenmesi 2.2.1.1.2.1.2. paragrafında anlatıldığı gibi yapıldı. PCR ile doğrulandıktan sonra, pozitif suşlar, fonksiyonel *ClpP* veya *aroA* genleri yerine lineer

kaseti (Kloramfenikol) içermekte, rekombinant suşlar olarak kabul edildi ve SEI- $\Delta ClpP$:CmR, SEI- $\Delta aroA$:CmR olarak adlandırıldı.

2.2.1.5. pRedET Plazmidinin Eliminasyonu

Plazmidin eliminasyonu amacıyla 24 saatlik LB agarda üremiş rekombinant suşlardan tek koloni alındı, kloramfenikol içeren 3 mL LB (100 µg/ml) brotha inoküle edildi ve 42°C'de gece boyunca inkübe edildi. pRedET plazmidinin elimine olup olmadığını test etmek için, 5. pasaj yapıldıktan sonra, kültürden 100 µl ampisilin içeren (50 µg/ml) ve içermeyen 10 ml LB brotha ekim yapıldı ve gece boyunca 30°C'de inkübe edildi. Ampisilin içermeyen LB brothta üremiş ve aynı zamanda ampisilin içeren LB brothta ürememiş suşların pRedET plazmiti içermeyen suşu olarak düşünüldü. Bunu doğrulaması için 2.2.1.1.1 pragrafta anlatıldığı gibi PCR yapıldı.

2.2.2. SEI- $\Delta ClpP$:CmR, SEI- $\Delta aroA$:CmR ve SEI-WT arasında Fenotipik Özelliklerinin Karşılaştırması

2.2.2.1. LB Besiyerinde ve Stres Koşullarda Üreme Özellikleri

Milanez ve ark. (2018) ile Ran ve ark. (2018)'nin metotlarına göre, WT, $\Delta ClpP$ ve $\Delta aroA$ mutantlarının 37°C ve 42°C'de klasik LB broth veya %5 NaCl-LB broth veya 4,5 pH'lı LB broth kullanılarak üreme kinetiği değerlendirildi. Üreme kinetiğini 37°C ve 42°C'de test etmek için, her suş için besiyerlerin inokülasyonu ikiye ikiye yapıldı. LB brothta gece boyunca üremiş her suştan 50 µl, 50 ml LB broth, veya %5 NaCl-LB broth veya 4,5 pH'lı LB broth içeren falkon tüpüne inoküle edildi. Kültürler hem 37°C hem de 42°C'de 12 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinde, 2

saatte bir OD₆₀₀ değerleri spektrofotometre (BD PhoenixSpec™nephelometer) ile ölçölüyordu. OD₆₀₀ değerlerine göre bakterinin sayısı (CFU/ml) hesaplandı.

2.2.2.2. Mutantların XLD Besiyerinde Üremesi

XLD agar besiyerinde üreme özelliği değerlendirmek için gece boyunca LB agarda üremiş her suştan tek bir koloni alındı ve yuvarlak uçlu öze ile XLD agar besiyeri içeren petrilere çizme plak yöntemi kullanılarak geçirildi. Petriler gece boyunca 37°C’de inkübe edildi.

2.2.2.3. Mutantların Hareket Özellikleri

Hareket özelliği değerlendirmek için MSRV Yarı Katı Besiyeri kullanıldı. Gece boyunca LB agarda üremiş her suştan yuvarlak uçlu öze kullanılarak tek bir koloni alındı, besiyerinin ortasına konuldu ve Oda sıcaklığı, 37°C ve 42°C’de 20 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üremiş kültürün çapı milimetre cinsinde ölçöldü.

2.2.2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Antibiyotik duyarlılık testinin (disk difüzyon yöntemi) gerçekleştirilmesi için Kirby-Bauer yöntemi kullanıldı (Bauer ve ark., 1966). Bunun için, 24 saatlik LB agarda üremiş kültürden yuvarlak uçlu öze kullanılarak birkaç koloni alındı 5 ml steril PBS solüsyonunda süspanse edildi ve bulanıklığı 0,5 McFarland olacak şekilde ayarlandı. Sıvı kültüre steril svap daldırılıp iyice eminceye kadar bekletildi ve petri yüzeyine 120 derecelik açıyla sürölerek MH agar içeren petrilere ekim gerçekleştirildi. Antibiyotik diskleri, petrilerin yüzeyine steril pens yardımıyla yerleştirildi ve 37 °C’de

24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, disk etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonları, milimetre cinsinde ölçüldü. Kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları çizelge 2.5.'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Kullanılan antibiyotikler.

Antibiyotik	Konsantrasyonu	Üretici Firma	Orijini
CEFTRIAXONE (CRO)	30 µg	OXOID	ABD
CEPHALEXIN (CL)	30 µg	OXOID	ABD
FLORFENICOL (FFC)	30 µg	OXOID	ABD
DOXYCYCLINE (DXT)	30 µg	BIOLAB	İTALYA
ENROFLAXACIN (ENR)	5 µg	OXOID	ABD
CEFTAZIDIME (CAZ)	30 µg	OXOID	ABD
STREPTOMYCIN (S)	10 µg	OXOID	ABD
NALIDIXIC ACID (NA)	30 µg	OXOID	ABD
TETRACYCLINE (TE)	30 µg	OXOID	ABD
SULPHAMETHAZOLE (SMX)	50 µg	BIOLAB	İTALYA
GENTAMYCIN (CN)	10 µg	OXOID	ABD
GENTAMYCIN (CN)	30 µg	OXOID	ABD
METRONIDAZOLE (MTZ)	50 µg	OXOID	ABD
CEFOPERAZONE / SULBACTAM (SCF)	105 µg	OXOID	ABD
CIPROFLOXACIN (CIP)	5 µg	OXOID	ABD
COMPOUND SULPHONAMIDES (S3)	300 µg	OXOID	ABD
CLINDAMYCIN (DA)	2 µg	OXOID	ABD
AMOXYCILLIN / CLAVULANIC ACID (AMC)	30 µg	OXOID	ABD
OXYTETRACYCLINE (OT)	30 µg	OXOID	ABD
AMPICILLIN (AMP)	10 µg	OXOID	ABD
CHLORAMPHENICOL (C)	30 µg	OXOID	ABD
AMOXYCILLIN (AML)	25 µg	OXOID	ABD
ERYTHROMYCIN (E)	15 µg	OXOID	ABD
KANAMYCIN (K)	30 µg	OXOID	ABD
CEFOTAXIME (CTX)	30 µg	OXOID	ABD
SULPHAMETHOXOLE/ TRIMETHOPRIM (SXT)	25 µg	OXOID	ABD

2.2.2.5. Biyokimyasal Testleri

Suşlara, glukoz, Lisin, Mannitol, Ksiloz, sitrat, TDA, Ornitin, H₂S, üre hidrolizi, indol oluşumu, Voges Proskauer-VP, ve β - galaktosidaz(ONPG) gibi biyokimyasal testleri gerçekleştirmek için Microgen™ GnA+B-ID Sistem kiti kullanıldı. Bunun için, 24 saatlik LB agarda üremiş suşun kolonilerinden alındı ve 3ml steril % 0.85'lik fizyolojik tuzlu su (FTS) içinde süspanse edildi. Süspansiyondan test kitinin her bir kuyucuğuna 100'er μ L damlatıldı. Kullanım kılavuzuna göre 1, 2, 3 ve 9 numaralı kuyucuklara 3-4 damla steril mineral yağ damlatıldı. Testin üzeri test kitinden çıkan bir şerit ile örtüldü ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra şerit çıkarılarak; 8. kuyucuğa kovaks ayıracı, 10. kuyucuğa önce VP I ayıracı sonra VP II ayıracı damlatıldı, 12 numaralı kuyucuğa ise TDA (triptofan deaminaz) ayıracı damlatıldı. Ayıraçlar eklendikten sonra renk oluşan renk değişiklikleri renk skalasına göre pozitif ve negatif sonuçlar değerlendirildi.

2.2.2.6. Yumurta Sarısı, Domuz Serumı ve EDTA Duyarlılık Testi

EDTA solüsyonu (50 mg/ml), %50 steril domuz serumu ve steril yumurta sarısının suşların üzerinde duyarlılığı belirlenmek için MIC testi (Minimum İnhibisyon Konsantrasyon) yöntemi kullanılarak ayrı ayrı steril U şeklinde 96 kuyucuklu mikrotitre pleytlerinde test edildi.

200 μ l test materyalinden mikrotitre pleytindeki ilk sütunun kuyucuklarına (1A ila 1F), aktarıldı. 100 μ l steril MH brottan diğer tüm kuyucuklara konuldu. Çok kanallı pipet kullanılarak, pozitif kontrol ve negatif kontrol satırları hariç (G ve H), 1. sütundan başlayarak 12. sütuna kadar iki kat sulandırma yapıldı.

Materyalin dilüsiyonlara suşların duyarlılığı test etmek için, SEI-WT suşuna, SEI- Δ aroA:CmR suşuna ve SEI- Δ ClpP:CmR suşuna, sırasıyla (A ve B), (C ve D) ve (E ve F) satırları ayarlandı. Pozitif kontrol için, SEI-WT suşuna, SEI- Δ aroA:CmR

suşuna, ve SEI- $\Delta ClpP$:CmR suşuna, sırasıyla (G1 ila G4), (G5 ila G8), (G9 ila G12) kuyucukları ayarlandı. Negatif kontrol için, SEI-WT suşuna, SEI- $\Delta aroA$:CmR suşuna, ve SEI- $\Delta ClpP$:CmR suşuna, sırasıyla (H1 ila H4), (H5 ile H8), (H9 ila H12) kuyucukları ayarlandı.

24 saatlik LB brotta üremiş suşların kültürü, 10^7 CFU/ml konsantrasyonu elde etmek için steril PBS tamponu ile seyreltildi. Seyretilmiş kültürden 10 μ l, negatif kontrol kuyucukları hariç, yukarıda bahsedildiği gibi diğer kuyuculara aktarıldı. Pleytler 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüm kuyucuklara 30 μ l steril resazurin indikatör solüsyonu (%0,1) eklendi ve 37 C'de 4 saat inkübe edildi. Mor rengi negatif, ve pembe rengi pozitif olarak değerlendirildi. Renk değişimi olmayan en düşük konsantrasyon, test materyali ve bakteri suşu için minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değeri olarak değerlendirildi.

2.2.3. Mutantların Genotiplendirilmesi

Fenotipik değerlendirme yapmak amacıyla Center for Disease Control and Prevention (CDC)'nin önerdiği protokole göre Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) yapıldı. Bunun için, SEIII-WT, SEI-WT, SEI- $\Delta aroA$:CmR, ve SEI- $\Delta ClpP$:CmR suşları kullanıldı. Görüntülemeye marker olarak kullanılmak amacıyla *Salmonella* Braenderup standart suşu (H 9812) eklendi.

2.2.3.1. Suşların Hazırlanması

Her suş, NA besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Steril yuvarlak öze ile koloniler alındı ve 2 ml hücre süspansiyon tamponu (CSB) içeren şeffaf kapaklı 10 ml'lik tüpüne vorteksleyerek süspanse edildi ve MacFarland 4'e ayarlandı.

2.2.3.2. Agaroza Gömülmesi

56°C'ye ayarlanmış ısı bloğuna boş ve kapağı kesilmiş 1,5 ml'lik ependorf tüpü konuldu. 10 ml Plug jeli (10 ml TE tamponu+ 0,1 g seakem gold agaroz) hazırlandı ve 200 µl ısı bloğundaki tüpe aktarıldı. 200 µl yoğunluğu ayarlanmış bakteri süspansiyonundan ependorf tüpüne aktarıldı ve 10 µl proteinaz K solüsyonundan eklendi. süspansiyon karışımından 200 µl alındı, ısı bloğundaki jel ile 8 kez pipetleme yapılarak karıştırıldı ve plug molda döküldükten sonra +4 °C'de donması için bekletildi.

2.2.3.3. Agaroza İçindeki Bakterinin Liziz Aşaması

Plugtaki jeli 50 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı, 5 ml liziz tamponu (50 ml 1 M Tris, 100 ml 0.5 M EDTA, 10 g N-Lauroylsarcosine sodium salt, 5 ml %1 proteinaz K, 835 ml dH₂O) ve 25 µl proteinaz K eklendikten sonra çalkalamalı su banyosunda 2 saat 55 C'de inkübe edildi.

2.2.3.4. Yıkama Aşaması

Liziz tamponu aspire edildi. Distile su ile 2 kez ve TE tamponu ile 4 kez su banyosunda çalkalayarak 10 dakika 55°C'de yıkama yapıldı. Son yıkamadan sonra TE tamponu aspire edildi ve 5 ml TE tamponu eklendikten sonra +4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Ertesi günde TE tamponu ile 2 kez su banyosunda çalkalayarak 10 dakika 55°C'de yıkama yapıldı.

2.2.3.5. Restriksiyon Enzimi (RE) ile Kesim

TE tamponu aspire edildi. DNA içeren agaroz kalıbı petriye aktarıldı, pistüre ile 1X2 olacak şekilde kesildi. Agarozun küçük parçası ependorf tüpüne konuldu. Ön restriksiyon aşamasında, 10 µl 10X Fastdigest tamponundan 90 µl moleküler saflıkta suyu ile karıştırıldı. Karışım ependorf tüpündeki agaroz dilimine aktarıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Restriksiyon aşamasında, agaroz dilimi alındı, 100 µl restriksiyon solüsyonu (*Xba*I restriksiyon enzimi: 3 µl, 10X Fastdigest buffer: 10 µl, BSA: 0,5 µl, moleküler saflıkta su: 85,5 µl) içeren bir ependorf tüpüne aktarıldı ve su banyosunda 2 saat 37 °C'de inkübe edildi.

2.2.3.6. Elektroforeze Jelin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi

RE ile kesilmiş olan agaroz kalıbı jel tırağına uygun şekilde yerleştirildi. Elektroforez jelin döküleceği kalıba agaroz içeren tarak yerleştirildi. Elektroforez kalıbına tarak dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Kaynatılmış PFGE jeli (1 g seakem gold agaroz, 5 ml 10X TBE buffer, 95 ml dH₂O) Elektroforez kalıbına döküldü ve donması için 15 dakika bekletildi. Jelin donmasından sonra tarak çok dikkatli bir şekilde çıkartıldı.

TBE buffer (10X TBE buffer: 115 ml, dH₂O: 2185, Tio-üre: 760 µl) CHEF DR III cihazının tankına eklendi. CHEF DR III cihazı çalıştırıldı ve çalışmaya uygun programı (Initial switch time: 2,2 S, Final switch time: 63,8, Voltage: 6 V, Included angle: 120°, Run time: 16 h, Temperature: 14 °C) ayarlandı. Kalıp içindeki jel dikkatli bir şekilde çıkartıldı, cihazın tankına yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı.

2.2.3.7. Boyama ve Yıkama Aşaması

Jel cihazdan çıkartıldı ve özel boyama kalıbına yerleştirildi. Kalıba etidium bromid solüsyonu (2. stok etidium bromid: 750 µl, dH₂O: 900 µl) jele geçek şekilde eklendi ve karanlık ortamda yarım saat çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 3 kez dH₂O ile yarım saat yıkama yapıldı.

2.2.3.8. Görüntüleme ve Analiz

Yıkamanın sonunda, jel görüntüleme cihazında görüntülendi, Bionumerix 7 programında analiz edildi ve dendogram oluşturuldu.

2.2.4. Hücre Kültüründe Adesyon ve İnvazyon Testi

Hücre kültüründe *S. Enteritidis* suşlarının (SEI-WT, SEI-ΔaroA:CmR, ve SEI-ΔClpP:CmR) adezyonu ve invazyonunu belirlemek amacıyla, Ran ve ark. (2018), Roof ve ark. (1992), ve Lin ve ark. (2017)'nin yöntemine göre adezyon ve invazyon testi yapıldı.

African Green Monkey kidney (Vero D 11-1) hücre kültürü içeren T-175'lik hücre kültürü flask DOLLVET Veteriner Aşı İlaç Biyolojik Madde Üretimi Sanayi ve Ticaret A.Ş. firmasından temin edildi. Vero hücreleri, %10 fetal bovine serum içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium'u kullanarak $0,3 \times 10^6$ /göz olacak şekilde 6 adet NUNC 6-gözlü hücre pleytlere (Thermo-USA) dağıtıldı ve %5 CO₂ 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

24 saatlik LB besiyerinde üremiş suşlardan 50 µl, 50 ml yeni LB besiyeri içeren falkon tüpüne ekildi ve 37°C'de inkübe edildi. OD₆₀₀, 0,5'e (~2 saat) ulaştığında

kültürler 4500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra 50 ml DMEM vasatı her tüpe eklendi ve bakterinin tortusu süspanse edildi. Her suş için ayrı 2 adet 6-gözlü hücre kültürü pleyti, birisi adezyon testi için ve diğeri invazyon testi için ayarlandı. MOI (Multiplicity of Infection) 100:1 elde etmek için bakterinin süspansiyonun 1 ml'si (1.5×10^8 PFU), hücre kültürü pleytinin her gözüne (1.2×10^6 hücre/göz) aktarıldı ve %5 CO₂ 37°C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleytler 3 kere steril PBS tamponu ile yıkama yapıldı.

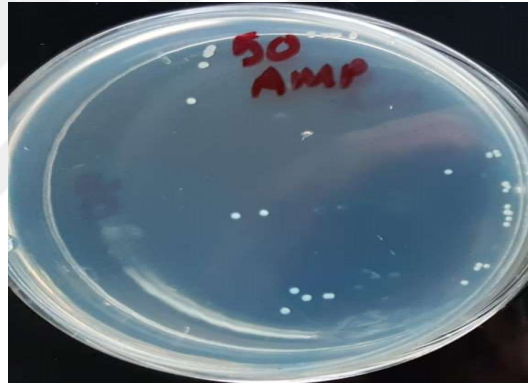
Adezyon testinde, hücreleri lize etmek amacıyla, 1 ml %1 Triton X-100 solüsyonundan her göze eklendi ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. İnvazyon testi için vero hücrelerin dışındaki bakterileri öldürmek amacıyla 1 ml gentamisin içeren DMEM vasatından (100 µg/ml) her göze eklendi ve ekstra 2 saat %5 CO₂ 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, 3 kez steril PBS ile yıkama yapıldı, 1 ml %1 Triton X-100 solüsyonundan her göze eklendi ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. hücreleri lize etmek amacıyla, 1 ml %1 Triton X-100 solüsyonundan her göze eklendi ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Her pleytin gözlerindeki hücre lizatları bir falkon tüpüne aktarıldı. Bakterinin sayısını belirlemek amacıyla 10 kat sulandırma yapıldı ve LB agara ekildi.

3. BULGULAR

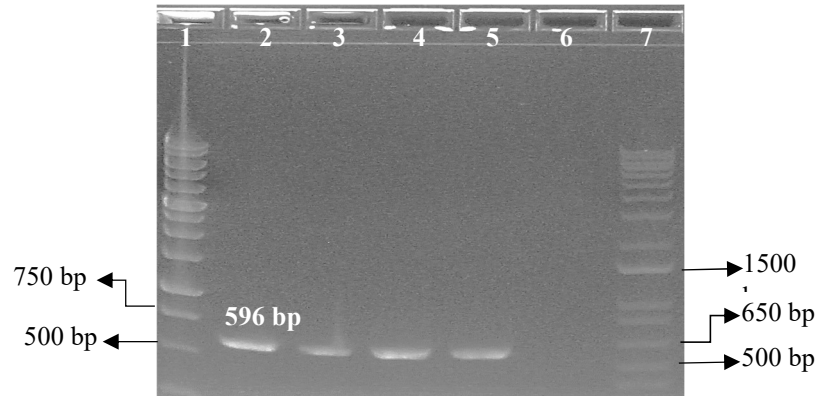
3.1. Mutantların Oluşturulması

3.1.1. pRedET Plazmidin Transformasyonu ve PCR ile Doğrulanması

pRedET plazmidi ile transformasyon başarıyla gerçekleştirildi. Şekil 3.1.'de LB-Amp (50 µg/ml) agarda üremiş SEI-WT-pRedET suşu ve şekil 3.2.'de PCR ile doğrulanmasına bağlı ortaya çıkan 596 bp'lik bandı gösterildi.



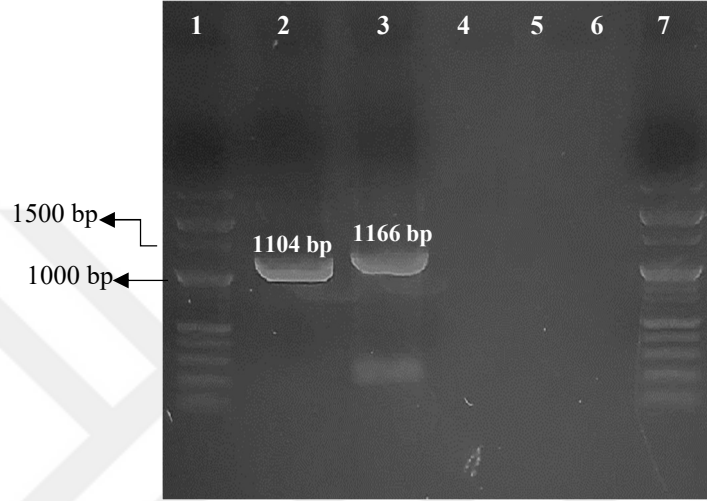
Şekil 3.1. LB- Amp (50 µg/ml) agarda üremiş SEI-WT-pRedET suşunun görüntüsü.



Şekil 3.2. pRedET ile transformasyonun PCR ile doğrulanması sonucunun jel görüntüsü. 1: Marker (GeneOn 1 kb/1000 bp DNA Ladder); 2, 3, 4, 5: SEI-WT-pRedET; 6: NC; 7: Marker (Invitrogen 1 kb plus DNA Ladder).

3.1.2. PCR ile Homolog Uçlu Lineer DNA Kasetlerinin Amplifikasyonu

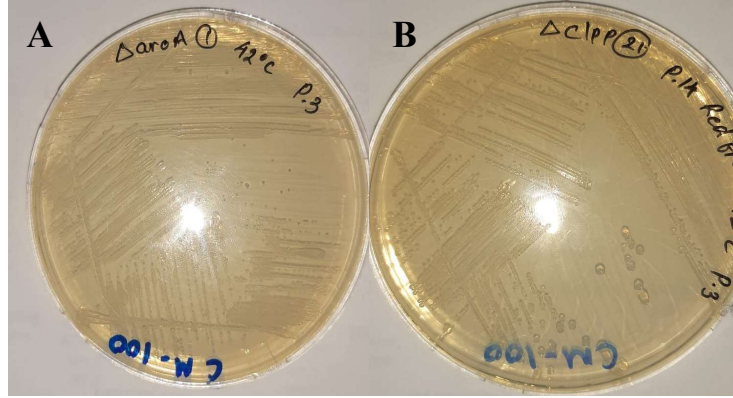
Mutantları oluşturmak amacıyla homolog uçlu lineer DNA kasetlerinin amplifikasyonu PCR ile yapıldı. Şekil 3.3.'te oluşturulan *ClpP*-PKD3 kaseti (1166 bp) ve *aroA*-PKD3 kaseti (1104 bp) gösterildi.



Şekil 3.3. PCR ile amplifiye edilmiş kasetlerin jel görüntüsü. 1: Marker (Higeno 100 bp DNA ladder Himedia); 2: *aroA*-PKD3 kaseti; 3: *ClpP*-PKD3 kaseti; 4, 5, 6: NC; 7: Marker (Higeno 100 bp DNA ladder Himedia).

3.1.3. Lineer DNA Kasetlerinin Transformasyonu

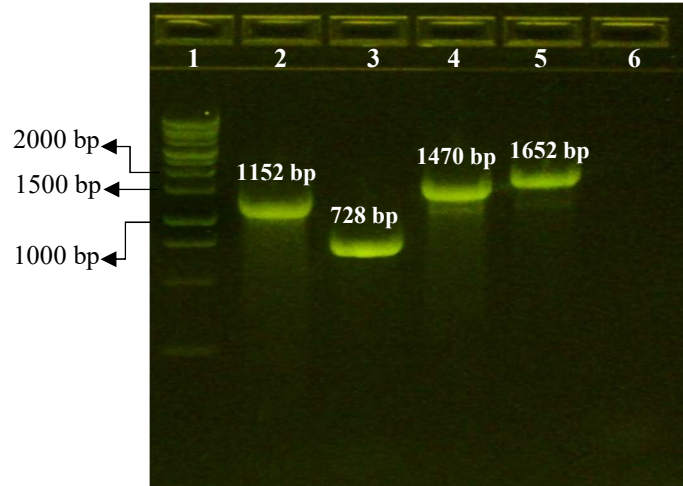
SEI-WT-pRedET suşu, lineer DNA kasetlerinin transformasyonundan sonra kloramfenikollü LB agarda (100 mg/ml) üremiştir. Şekil 3.4. A ve B'de üremiş suşlar gösterildi.



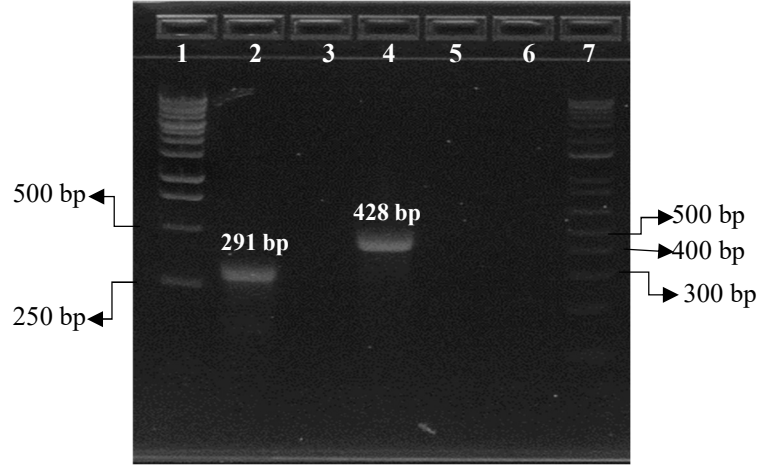
Şekil 3.4. Kaset transformasyonları sonucunda kloramfenikollü LB agarda üremiş suşların görüntüsü. A: *aroA*-PKD3 kaseti ile transforme edilmiş SEI-WT-pRedET suşu; B: *ClpP*-PKD3 kaseti ile transforme edilmiş SEI-WT-pRedET suşu.

3.1.4. Mutasyonların PCR ile Konfirmasyonu

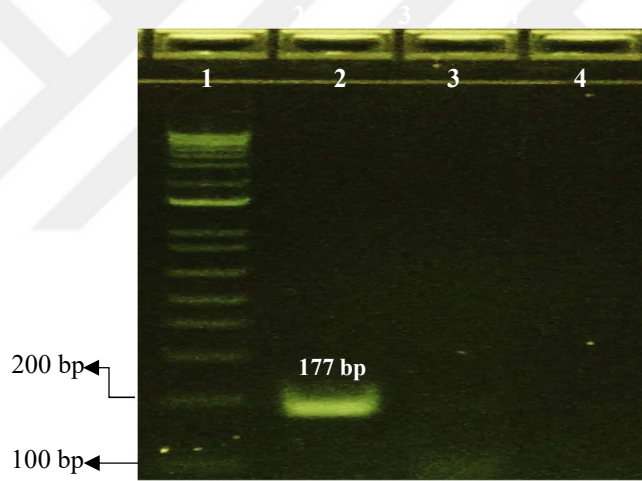
Kloramfenikollü LB agarda (100 µg /ml) üremiş mutantlar (*aroA* ve *ClpP*) PCR ile doğrulandı. SEI- $\Delta ClpP$:CmR, SEI- $\Delta aroA$:CmR ve SEI-WT suşlardan beklenen PCR ürünleri şekil 3.5., 3.6., ve 3.7.'de gösterildi.



Şekil 3.5. Dış konfirmasyon primerlerinin PCR sonucunun jel görüntüsü (*ClpP*: 2 ve 3; *aroA*: 4 ve 5). 1: Marker (GeneOn 1 kb/1000 bp DNA Ladder); 2: SEI- $\Delta ClpP$:CmR; 3: SEI-WT; 4: SEI- $\Delta aroA$:CmR; 5: SEI-WT; 6: NC.



Şekil 3.6. Genomda pKD3 kasetinin 5' ucunu tespit etmek için kullanılan primerlerin PCR sonucunun jel görüntüsü (*ClpP*: 2 ve 3; *aroA*: 4 ve 5). 1: Marker (GeneOn 1 kb/1000 bp DNA Ladder); 2: SEI- Δ *ClpP*:CmR; 3: SEI-WT; 4: SEI- Δ *aroA*:CmR; 5: SEI-WT; 6: NC; 7: Marker (Invitrogen 1 kb plus DNA Ladder).



Şekil 3.7. *aroA* geninin iç primerlerin PCR sonucunun jel görüntüsü. 1: Marker (Invitrogen 1 kb plus DNA Ladder); 2: SEI-WT; 3: SEI- Δ *aroA*:CmR; 4: NC.

3.1.5. pRedET Plazmidinin Eliminasyonu

Kloramfenikol içeren LB brothta 42°C'de 5. pasajından sonra, ampisilin içeren (50 µg/ml) 10 ml LB brotha ekilen olan SEI- Δ *ClpP*:CmR ve SEI- Δ *aroA*:CmR mutant suşları üremedi. pRedET varlığının olup olmadığı tespit etmek için kloramfenikol

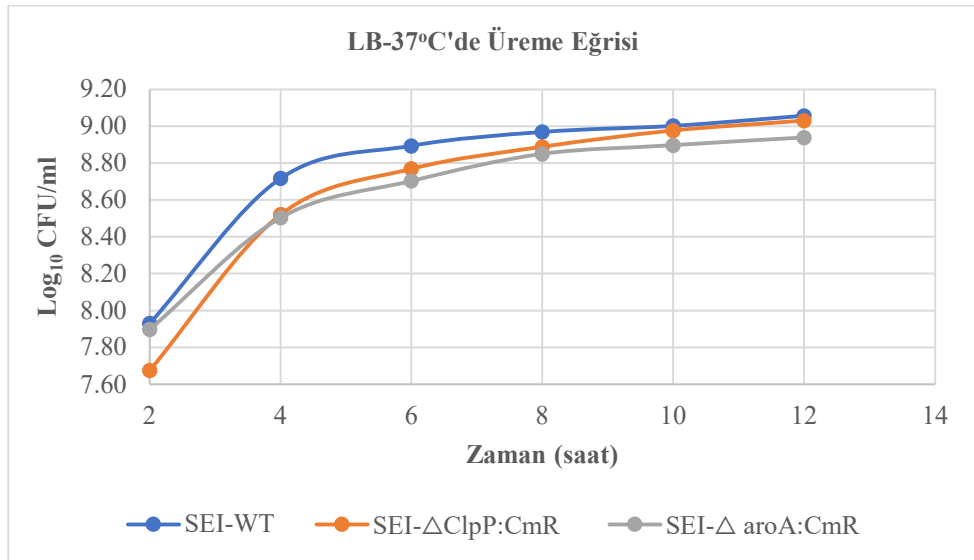
içeren LB brothta 42°C’de üremiş mutantların 5. pasajına yapılan PCR sonucunda hiç bir bant (596 bp) görülmedi.

3.2. SEI- Δ ClpP:CmR, SEI- Δ aroA:CmR ve SEI-WT arasında Fenotipik Özelliklerin Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi

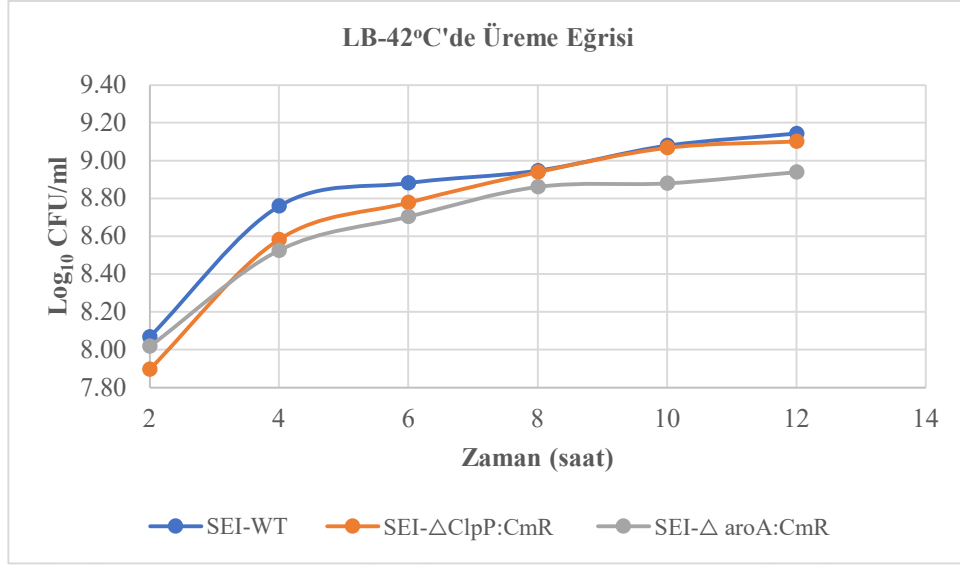
3.2.1. LB Besiyerinde ve Stres Koşullarda Üreme Özelliklerinin Karşılaştırılması

LB besiyeri kullanılarak stres koşullarda SEI- Δ ClpP:CmR ve SEI- Δ aroA:CmR mutant suşları ile SEI-WT saha suşuyla karşılaştırmanın sonucunda:

LB brothta, 37°C ve 42°C’de lag fazında mutantlar saha suşundan daha yavaş üredi. Mutantların arasında SEI- Δ aroA:CmR mutant suşu SEI- Δ ClpP:CmR suşundan daha yavaş üredi (şekil 3.8 ve 3.9).

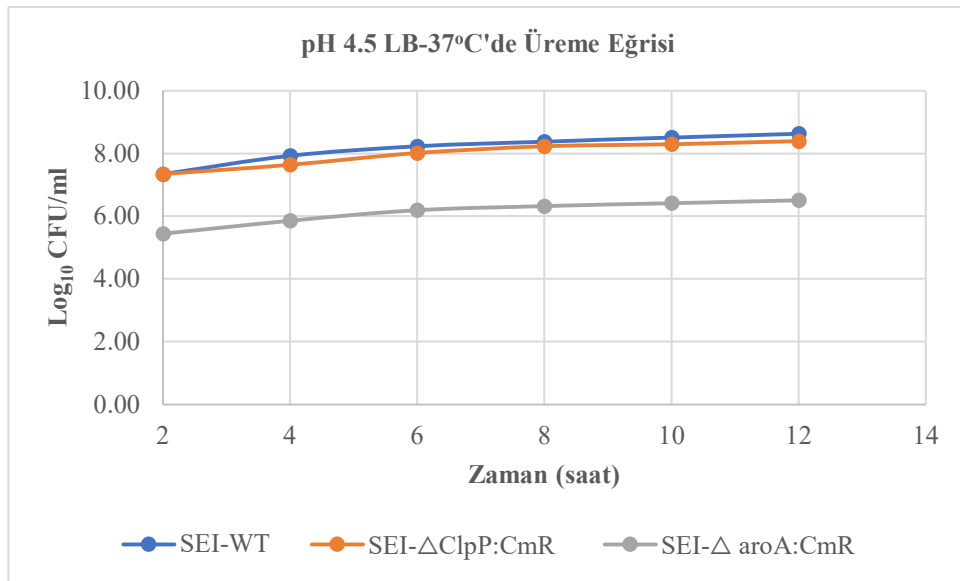


Şekil 3.8. LB-37°C’de suşların üreme eğrisi grafiği.

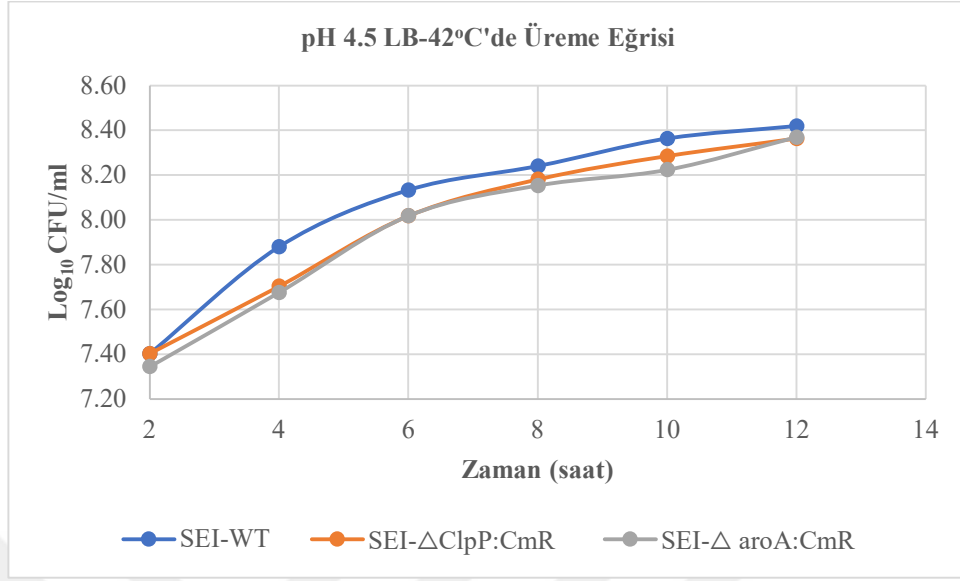


Şekil 3.9. LB-42 °C'de suşların üreme eğrisi grafiği.

4,5 pH'lı LB brothta, 37°C ve 42°C'de üreme eğrisine göre: 37°C'de SEI- $\Delta ClpP$:CmR mutant suşu ve SEI-WT suşunun arasında önemli bir farklılık bulunmazken, SEI- $\Delta aroA$:CmR suşu diğer suşlardan daha yavaş üredi. 42°C'de ise lag fazında mutant suşlar saha suşundan daha yavaş üredi ve inkübasyon sonunda suşların arasında çok önemli bir farklılık görülmedi. Mutant suşlar neredeyse aynı üreme oranıyla üredi (şekil 3.10 ve 3.11).

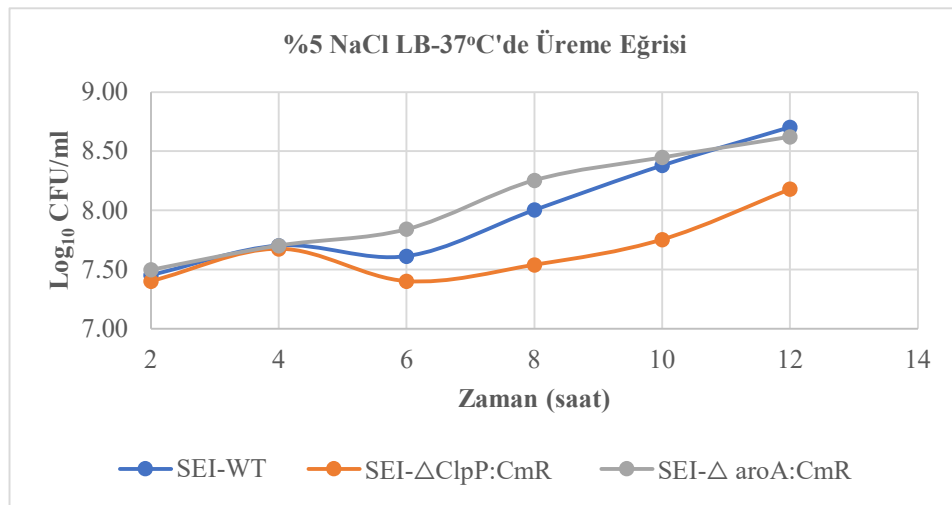


Şekil 3.10. pH 4,5 LB-37°C'de suşların üreme eğrisi grafiği.

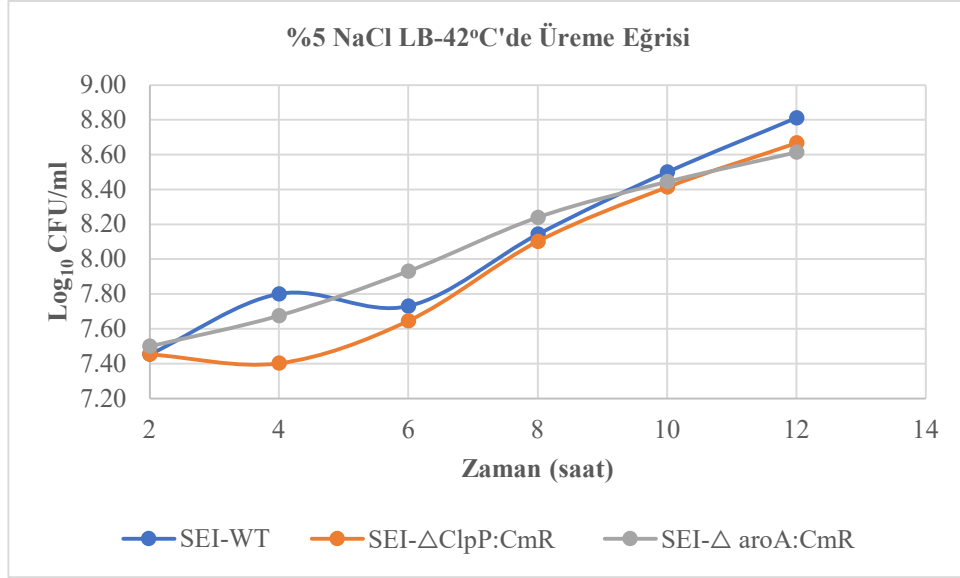


Şekil 3.11. pH 4,5 LB-42°C'de suşların üreme eğrisi grafiği.

%5 NaCl LB brothta, 37°C ve 42°C'de lag fazında SEI-Δ *aroA*:CmR suşu diğer suşlardan daha iyi üredi fakat 12 saatlik inkübasyonun sonunda SEI-WT suşu mutant suşlardan daha yüksek sayı (CFU) gösterdi. İki sıcaklıkta ve özellikle 37°C'deki lag fazında SEI-Δ *ClpP*:CmR suşu diğer suşlardan çok yavaş bir üreme gösterdi (şekil 3.12 ve 3.13).



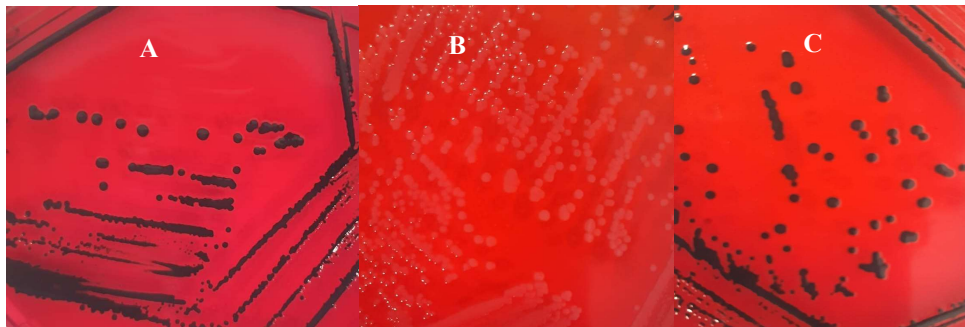
Şekil 3.12. %5 NaCl LB-37°C'de suşların üreme eğrisi grafiği.



Şekil 3.13. %5 NaCl LB-42°C'de suşların üreme eğrisi grafiği.

3.2.2. Mutantların XLD Besiyerinde Üreme Özellikleri

XLD agarda SEI-Δ*ClpP*:CmR mutant suşu SEI-WT suşu ile aynı üreme özelliklerini gösterirken SEI-Δ*aroA*:CmR mutant suşu aynı besiyerinde H₂S üretmedi (şekil 3.14).

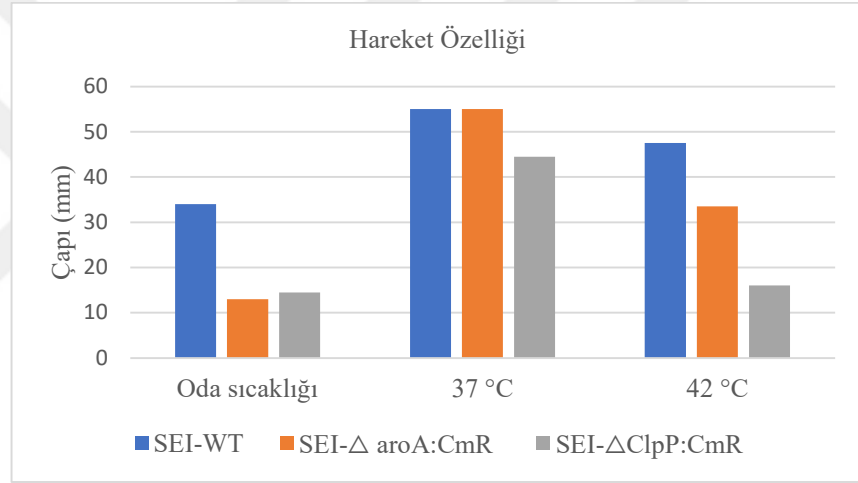


Şekil 3.14. XLD agarda üremiş suşların görüntüsü. A: SEI-WT suşu; B: SEI-Δ*aroA*:CmR mutant suşu; C: SEI-Δ*ClpP*:CmR mutant suşu .

3.2.3. Mutantların Hareket Testi Bulguları

Farklı sıcaklıklarda motilite testinin sonucu aşağıdaki gibidir:

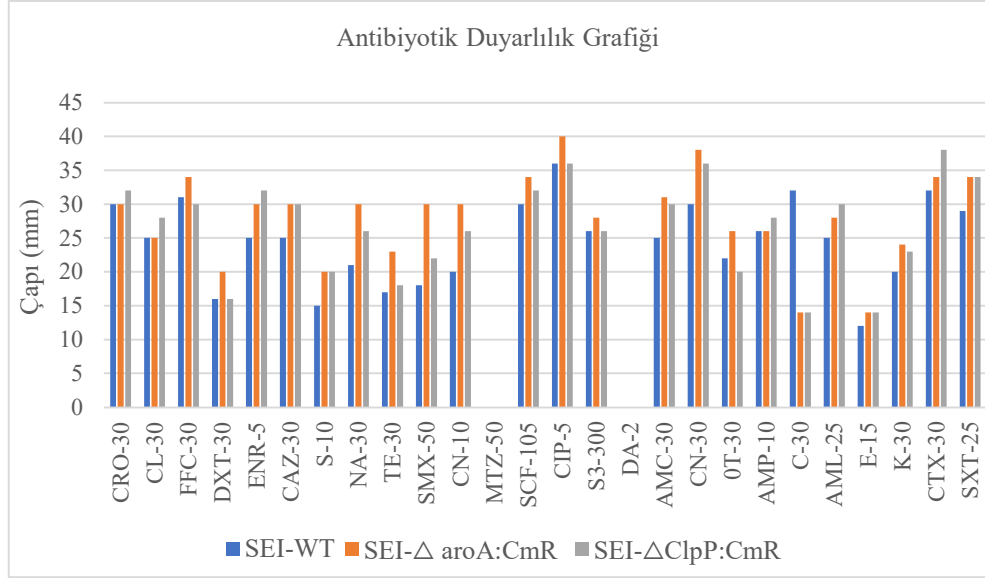
Oda sıcaklığında, mutant suşların hareketliliği SEI-WT suşa kıyasla önemli ölçüde azaldı. 37°C'de, SEI- Δ *aroA*:CmR suşu ve SEI-WT suşu aynı değer gösterirken SEI- Δ *ClpP*:CmR suşu daha az hareketlilik gösterdi. 42°C'de ise mutant suşlarının (özellikle SEI- Δ *ClpP*:CmR suşu) hareketliliği SEI-WT suşa kıyasla önemli ölçüde azaldı (şekil 3.15).



Şekil 3.15. Suşların hareketlilik grafiği.

3.2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testi Bulguları

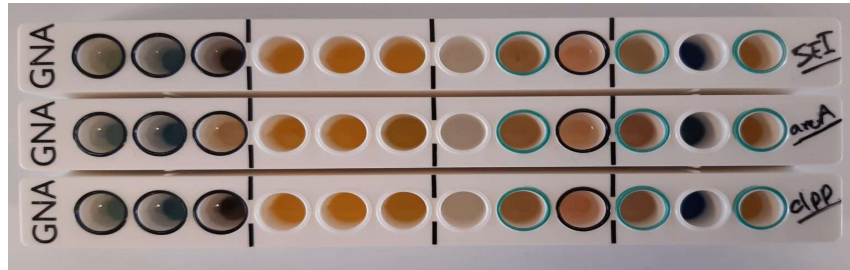
Mutant suşların duyarlılığı SEI-WT suşunun duyarlılığına kıyasla arttı, özellikle SXT-25, CTX-30, K-30, AML-25, CN-30, AMC-30, SCF-105, CN-10, SMX-50, TE-30, NA-30, S-10, CAZ-30, ENR-5, E-15 ve OT-30 antibiyotikleri (şekil 3.16). Ayrıca, SEI- Δ *aroA*:CmR suşu, test edilen antibiyotikler arasında daha fazla duyarlılık gösterdi (13/26).



Şekil 3.16. Antibiyotik duyarlılık grafiği.

3.2.5. Biyokimyasal Test Bulguları

Şekil 3.17 ve çizelge 3.1'de gösterildiği gibi, Microgen™ GnA+B-ID sistem kiti ile yapılan biyokimyasal testlerde, H₂S testinde negatif veren SEI-Δ *aroA*:CmR suşu hariç (şekil 3.17'de soldan üçüncü kuyucuk), tüm suşlar benzer sonuç verdi.



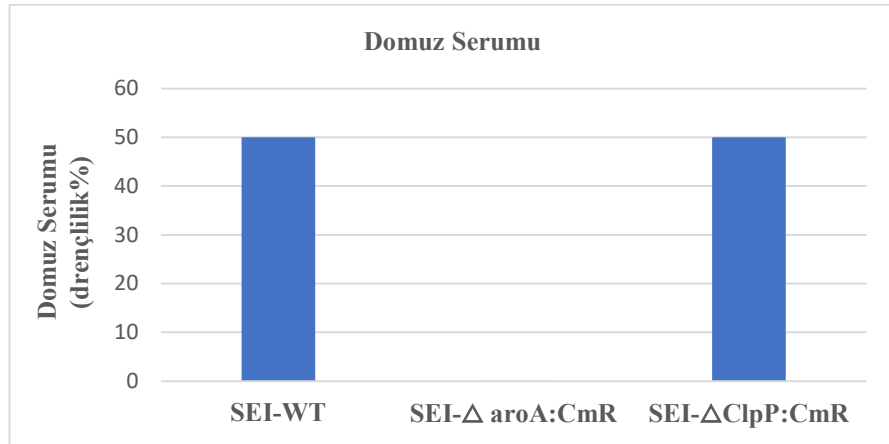
Şekil 3.17. Biyokimyasal testlerinin görüntüsü.

Çizelge 3.1. Biyokimyasal test sonuçları.

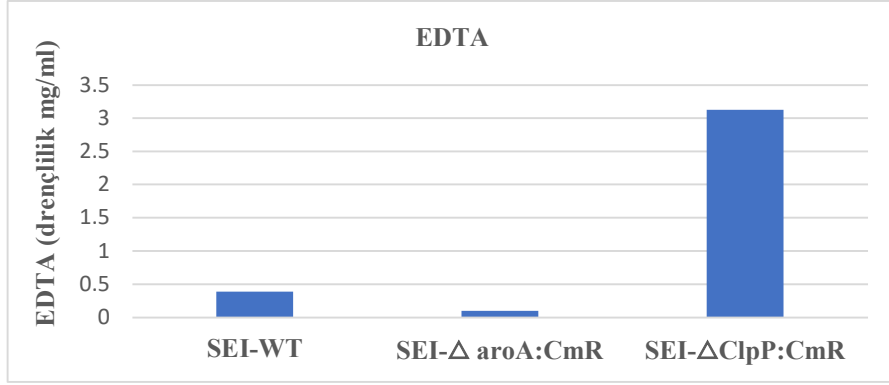
	Lisin	Ornitin	H ₂ S	Glikoz	Mannitol	Ksiloz	ONPG	İndol	Üre	V.P	Sitrat	TDA
SEI-WT	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
SEI- Δ aroA:CmR	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
SEI- Δ ClpP:CmR	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-

3.2.6. Yumurta Sarısı, Domuz Serumı ve EDTA Duyarlılık Testi Bulguları

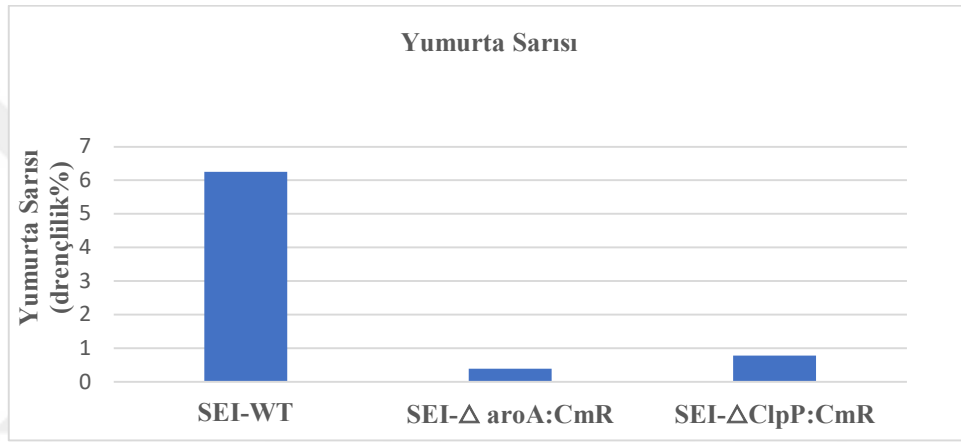
Şekil 3.18, 3.19 ve 3.20'de gösterildiği gibi, yumurta sarısı, EDTA ve domuz serumu duyarlılık testinde, SEI- Δ *aroA*:CmR suşu SEI-WT ve SEI- Δ ClpP:CmR suşlarına kıyaslandığında daha fazla duyarlılık gösterdi. SEI- Δ ClpP:CmR suşu SEI-WT suşuna kıyaslandığında, EDTA'ya karşı daha fazla dirençlilik, yumurta sarısına karşı daha az dirençlilik, ve domuz serumuna karşı benzer dirençlilik gösterdi.



Şekil 3.18. Suşların domuz serumuna karşı dirençlilik grafiği.



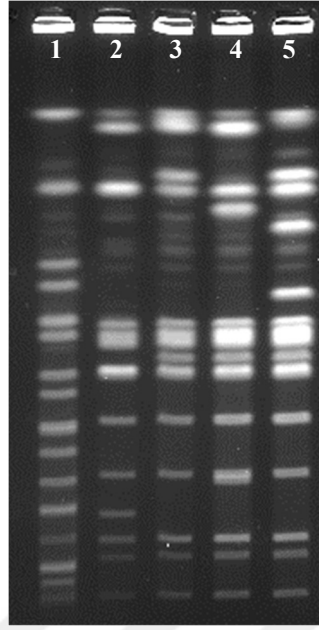
Şekil 3.19. Suşların EDTA'ya karşı dirençlilik grafiği.



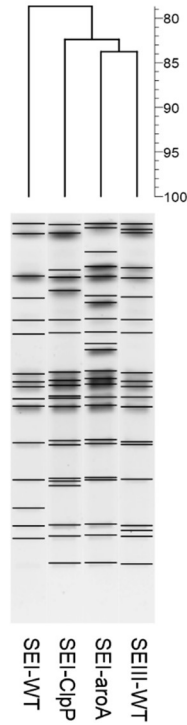
Şekil 3.20. Suşların yumurta sarısına karşı dirençlilik grafiği.

3.3. Mutantların Genotiplendirilmesi

PGEF analizinde, mutant suşların paternleri (SEI-Δ *aroA*:CmR ve SEI-Δ *ClpP*:CmR) ana suşunun (SEI-WT) paterninden farklı bulundu (Şekil 3.21). Bionumerix 7 programının analizinden oluşturulan dendogram mutant suşların paternlerinin SEI-WT suşunun paternine daha yakın olduğunu gösterdi (Şekil 3.22).



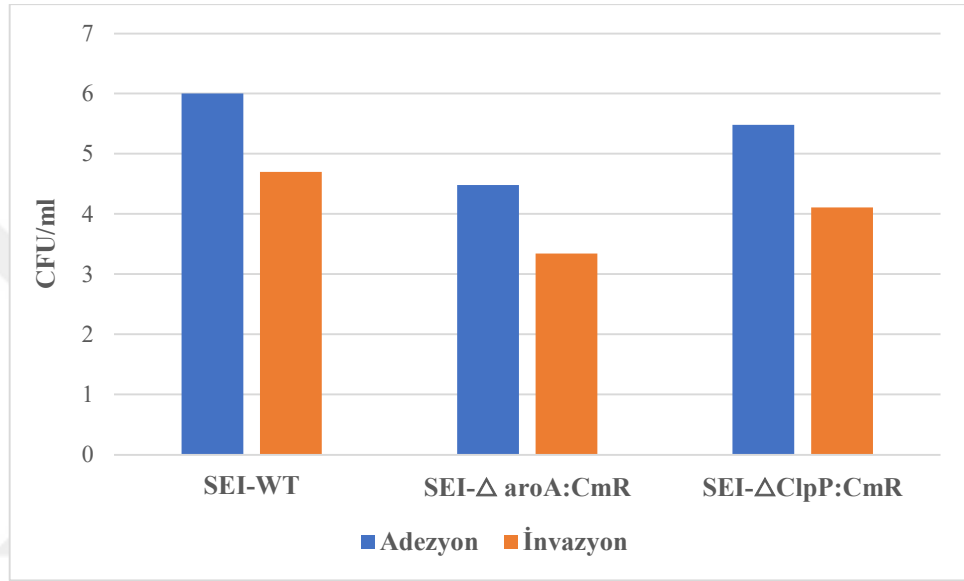
Şekil 3.21. PFGE görüntüsü. 1: Marker (*S. Braenderup* (H9812) Standard); 2: SEI-WT; 3: SEIII-WT; 4: SEI- Δ *ClpP*:CmR; 5: SEI- Δ *aroA*:CmR.



Şekil 3.22. PFGE dendrogram görüntüsü.

3.4. Hücre Kültüründe Adezyon ve İnvazyon Testi Bulguları

Vero hücre kültüründe, mutantlar ana bakteriden (SEI-WT suşu) daha az adezyon ve invazyon gösterdi. Mutantların arasında ise, SEI- Δ *aroA*:CmR suşu SEI- Δ *ClpP*:CmR suşundan daha az adezyon ve invazyon gösterdi (Şekil 3.23).



Şekil 3.23. Vero hücre kültüründe suşların adezyonu ve invazyonu grafiği.

4. TARTIŞMA

Salmonella serovarları, sürüngenler, kuşlar, insanlar dahil olmak üzere memelilere kadar çok çeşitli konakçıda hastalık yapabilmektedir. *Salmonella* Enteritidis'in, gıda kaynaklı hastalıkların ana nedenlerinden biri olması sebebiyle, en önemli zoonotik hastalıklar arasında gösterilmektedir (Mesfin ve Dejene., 2017). *Salmonella* Enteritidis'in Avrupa'da 2012 yılında, Türkiye'de ise 2012-2016 yılları arasında insanlardan en çok izole edilen serotip olduğu saptanmıştır (EFSA, 2014). Broyler, yumurtacılar, hindi, damızlık ve kesimhane örneklerinde *Salmonella* Enteritidis'in en yaygın 3. serotip olduğu bildirilmiştir (Ulusal *Salmonella* Kontrol Programı, 2018).

S. Enteritidis'in kanatlı hayvanların oral enfeksiyonu ardından herhangi bir klinik belirti görülmeden aylarca sekumlara kolonize olmakta, dışkıyla atıldığında diğer kanatlıları, kontamine yumurtaları ya da etleri tüketildiğinde ise insanları infekte etmektedir. Cıvcivlerde ise yüksek oranda ölüm kayıt edilmiştir (Suzuki, 1994). Avrupa Birliği standartlarına göre uygun örnekleme modeline göre kanatlı üretiminde *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* sıklığının %1 düzeyinin altında olması hedeflenmektedir. Bu hedefi gerçekleştirmek adına Avrupa Komisyonu, insanlarda hastalığı kontrol etmek için tavukların aşılmasının en önemli ve en pratik önlem olabileceğini bildirmiştir (Ulusal *Salmonella* Kontrol Programı, 2018).

Aşının amacı, uzun-sürelili immünolojik koruma sağlamak olup, bu sayede enfeksiyonun tamamen önlenmesi ya da hastalığın şiddetinin büyük ölçüde azaltılması mümkün olabilmektedir. Canlı aşılarda salmonelloza karşı etkili bir koruma sağlayabilmesi, kolay uygulanması, heterolog antijenler içermesi, mukozal, hücresel ve humoral immün yanıtı indükleyebilmesi gibi birçok avantajı bulunmaktadır. Buna karşın inaktif aşılarda immünojenitenin artırılması için genellikle adjuvantla birlikte uygulanması ve uzun süreli koruyucu bağışıklığın sağlanabilmesi için bir dozdan daha fazla uygulanması gerekmektedir (Singh, 2009).

Canlı aşı suşunun koruyucu bir immun yanıt oluşturmaya amacıyla, belli bir süre GALT (gut-associated lymphatic tissues) ve MALT (mucosa associated lymphatic tissues) dokulara invaze olması, bu dokularda canlı kalması ve çoğalabilmesi gerekmektedir. Bu hedef, metabolik enzimler veya temel virülans faktörlerini kodlayan genlerin delesyonu ile mutant suşlar geliştirilerek elde edilebilmektedir. *S. Enteritidis*'in geliştirilen mutant aşılarının arasında, oksotrofik çift-marker mutantı, metabolik drift mutantı, sıcaklığa duyarlı spontan mutantı, *cya-crp* mutantı ve *aroA* mutantı bulunmaktadır (Revolledo ve Ferreira., 2012). *AroA*, glikolizi aromatik amino asitlerin sentezlenmesine doğrudan bağlayan shikimate yolunun bir parçasıdır. *Aro* mutantları, fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik amino asitleri üretememektedir. Amino asitler konak içinde serbest bulunmadığından *aro* mutantları hücre içinde replikasyonu yapamamaktadır (Sebkova ve ark; 2008). Proteoliz, hücre içi ortamdaki istenmeyen proteinleri uzaklaştıran temel bir hücresel aktivitedir. Proteolitik sistemi, hücrenin proteostazı sürdürmesini, protein seviyelerini değiştirerek bakterinin değişen ortamlara adaptasyonunu sağlamaktadır. Bakterilerde, *ClpP* ve *Lon* genleri, hücresel proteolitik aktivitelerin %80'ini gerçekleştirmektedir. 1980 ve izleyen yıllarda hayvanlarda *Salmonella* oksotrofik aromatik amino asit mutantlarının virülansı azalttığı öğrenildikten sonra, farklı *Salmonella* serotiplerinin virülansını azaltmak için bu genlerde sıklıkla mutasyonlar yapılmıştır (Sebkova ve ark; 2008). *ClpP* geni ise stres koşulları altında proteinlerin parçalanmasında önemli bir rol oynadığından, bu genin delesyonu bakterilerin attenüasyonuna neden olmaktadır (Thomsen ve ark; 2002).

Bu tez çalışmasında, Türkiye'de kanatlı kümeslerinin altlık örneklerinden izole ve identifiye edilmiş olan *Salmonella* Enteritidis suşu kullanarak *aroA* ve *ClpP* mutantları oluşturuldu ve *in vitro* koşullarda fenotipik özellikleri saha suşuyla karşılaştırılarak değerlendirildi.

Bu çalışmada, Datsenko ve Wanner (2000)'in yöntemine göre, hedef genlerin delesyonu ve kloramfenikol geninin (*CmR*) insersiyonunu doğrulamak amacıyla *aroA* için 3 ve *ClpP* için ise 2 farklı primer çifti tasarlandı. Bakterinin genomuna yerleştirilen PKD3 kasetini çoğaltan dış primerler, hedef genlerin dışındaki dizilerden tasarlandı. Bu sebeple, bu primerler ile, mutant PCR ürünün uzunluğu ana bakterinin PCR ürünün uzunluğundan farklıydı. İkinci primer setinde, forward primer hedef genin dışında bulunan diziden ve reverse primer sokulan kasetteki diziden tasarlandı. Bu nedenle, PCR ürünü sadece mutantın genomundan amplifiye edildi. Üçüncü sette ise, forward ve reverse primerler *aroA* geninin ortasındaki diziden tasarlandı, *aroA* geni mutant suşta bulunmadığı için PCR ürünü sadece SEI-WT suşunun genomundan amplifiye edildi. Bu bahsedilen primerler ile beklenen sonuçlar elde edildi ve daha sonra mutantlar kloramfenikola direnç kazandığı için PKD3 kasetinin insersiyonu başarıyla gerçekleştirildi. Bu elde edilen *aroA* ve *ClpP* delesyon bulgusu, Karasova ve ark. (2009) ve Ran ve ark. (2018)'in sırayla elde ettikleri bulgularla benzerlik göstermektedir. Lambda red rekombinasyon yöntemi, klasik restriksiyon enzimleri klonlama yöntemiyle karşılaştırıldığında, lambda red daha hızlı (1 hafta), restriksiyon bölgelerinden bağımsız, ve daha büyük DNA fragmanları modifiye edilebilmektedir.

PFGE tekniği, restriksiyon enzimleri yardımıyla büyük DNA molekülleri parçalanarak ve jel matriksi içerisinde diagonal aralıklarla uygulanan elektrik akımı yardımıyla jelde DNA fragmentlerinin ayrılmasına dayalı güçlü bir moleküler tiplendirme (genotiplendirme) tekniğidir (Sharma ve ark; 2016). Bu çalışmada, mutantlara ait PFGE paternlerinin ana bakterinin PFGE paterninden genotipik olarak farklı olup olmadığını belirlemek için PFGE yapıldı. Bu teknikte kullanılan restriksiyon enziminin mutasyon stratejisine bağlı delesyon ve insersiyon sebebiyle ilgili suş genomlarını farklı bölgelerden kesmesi sonucunda, mutant suşların paternleri (SEI- Δ *aroA*:*CmR* ve SEI- Δ *ClpP*:*CmR*) ile ana suşunun (SEI-WT) paterni arasında farklılıklar saptandı. Bu çalışmada elde edilen PFGE bulguları Mustak ve Yardimci (2019)'in elde ettikleri bulgularla benzerlik göstermektedir.

Thongbai ve ark. (2006) ve Sebkova ve ark. (2008) yapmış oldukları çalışmada, 4.5'luk pH değerinde bakterinin dış membranının bozulduğunu, *aro* mutantlarının

attenüasyonunun hücre duvarı ve dış membranında defektlere neden olması nedeniyle *aroA* mutant suşu, düşük pH'ya saha suşundan daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında, 4.5 pH'lı LB brothta 37°C'de, SEI- Δ *aroA*:CmR suşunun membranındaki defektler nedeniyle düşük pH'den etkilenmiş ve diğer suşlardan daha yavaş üremiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada, *ClpP*'nin çeşitli stres koşullarında *S. Typhimurium*'un üremesi üzerinde önemli rolü olduğu saptanmıştır (Thomsen ve ark., 2002). Bu tez çalışmasında, SEI- Δ *ClpP*:CmR mutant suşu %5'lik NaCl konsantrasyonuna çok yüksek duyarlılık göstermiştir. Bu ve diğer bulgular Ran ve ark. (2018)'nin elde ettikleri bulgularla benzerlik göstermektedir.

Biyokimyasal testler ve XLD agarda üreme özellikleri değerlendirildiğinde, *ClpP* mutant ve saha suşu arasında bir farklılık görülmedi. *AroA* mutant suşu ise hem XLD agarda üreme ve hem de biyokimyasal testlerinde ticari olan Vaxsafe® STM-1 (*Salmonella Typhimurium*) aşı suşunda olduğu gibi, H₂S negatif özellik gösterdi. Tez çalışmasında *aroA* geni delesyonu nedeniyle H₂S üretiminden sorumlu olan *phsA* geninde bir değişiklik olduğu düşünülmektedir.

Frahm ve ark. (2015) ve Deditius ve ark. (2015)'nin yapmış oldukları çalışmalarda, hücre membran bütünlüğü ile LPS'deki değişikliklerin *Salmonella* hareketliliğini etkilediğini bildirmişlerdir. Flagella genlerinin ekspresyonunun azalmasının, *aroA* mutant suşunun motilitesinin azalmasına neden olduğu saptanmıştır (Sebastian ve ark., 2016). Bu çalışmada, mutantların hareket testi bulgularında, oda sıcaklığı ve 42°C'de SEI- Δ *aroA*:CmR suşunun hareketliliği SEI-WT suşuna kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. Yukarıda bahsedildiği gibi, *aroA* mutantlarının attenüasyonunun hücre duvarı ve dış membranında defektlere neden olması, flagella genlerinin ekspresyonunda azalmaya bağlı olarak *aroA* mutant suşunun motilitesinin azaldığı düşünülmektedir. *ClpP* ekspresyonunun, besin eksikliğinde rol oynayan proteinlerinin parçalanması, durma fazının adaptasyonu, ısı stresi, hücre siklusunun ilerlemesi, biyofilm formasyonu, motilite, beslenme ve metabolizma üzerinde önemli rolünün olduğu bulunmuştur (Bhandari ve ark., 2018). Knudsen ve ark. (2013)'in yaptığı çalışmada, proteolitik *ClpX* bileşeninin olmaması *S. Typhimurium clpP* mutant suşunun atenüasyonuna ve motilitesinin kaybolmasına neden olduğu saptanmıştır. Bu

tez çalışmasında, bütün test edilen sıcaklıklarda SEI- $\Delta ClpP$:CmR suşunun hareketliliği SEI-WT suşuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır.

Antibiyotik duyarlılık testi bulgularında, SEI- $\Delta aroA$:CmR suşunun, test edilen antibiyotiklere karşı daha fazla duyarlılık gösterdiği görülmüştür. Sebastian ve ark. (2016)'nın yaptığı çalışmada, gliserofosfolipidlerdeki değişiklikler ve putatif ubikinon sentezi bozukluklarının dış membranın bozulmasına neden olduğundan, *aroA* mutantlarının penisilin ve ampisiline daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bu nedenlerle, tez çalışmasında geliştirilen *aroA* mutantının antibiyotiklere duyarlılığının arttığı düşünülmektedir. *Clp* proteazlar, ribozom mekanizmasına üzerine etkili antibiyotiklerin kullanımına bağlı sitoplazmada yanlış katlanmış veya yanlış translasyon geçirmiş proteinleri uzaklaştırmaktadır (Pan ve ark., 2019). Vaubourgeix ve ark. (2015)'in yaptığı çalışmada, *Mycobacterium smegmatis*'te biriken proteinler ve ölüm oranı arasında bir ilişkinin bulunduğunu, ana hücrede biriken protein yükünün yeni nesil hücrelere eşit olmayan dağılımı sonucu bakterinin üreme hızını azalttığını ve/veya hücre ölümüne neden olduğunu bulmuştur. Bu çalışmada geliştirilen *ClpP* mutant suşunda saha suşuna kıyasla antibiyotiklere duyarlılığın artış nedeni yukarıda belirtilen nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında mutant suşlarının yumurta sarısı, EDTA ve seruma duyarlılığı test edildi. *Salmonella* Enteritidis yumurta kabuğundan yumurtanın hem sarısı hem de beyazına geçebilmekte, bu şekilde kontamine olan yumurtaları tüketen insanlarda enfeksiyona neden olmaktadır. Sebkova ve ark. (2008)'in yaptığı çalışmada, attenüasyondan kaynaklanan hücre duvarı ve dış membrandaki bozuklukları nedeniyle, *Salmonella* Enteritidis *aroA* ve *aroD* mutantlarının albümine duyarlılığının saha suşuna kıyasla 20 kat arttığını bulmuştur. Bu çalışmada, yumurta sarısına karşı, *aroA* mutant suşunun duyarlılığı 16 kat daha fazla, *ClpP* mutant suşunun duyarlılığı ise, saha suşunun duyarlılığından 8 kat daha fazla bulundu. *Salmonella* dış membranında, EDTA veya fiziksel muamele gibi çeşitli yöntemlerle bozukluk yapılabilmektedir (Thongbai ve ark., 2006). Alakomi ve ark. (2003)'in yaptığı çalışmada, EDTA'nın erken log fazında dış membranını çok daha fazla etkilediği saptanmıştır. Sebkova ve ark. (2008)'in yaptığı çalışmada, *aro* geninin delesyonundan

kaynaklanan hücre duvarı ve periplazm yapısal bozukluklarından dolayı *Salmonella* Enteritidis *aroA* ve *aroD* mutantlarının EDTA'ya duyarlılığı saha suşuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu tez çalışmasında, *aroA* mutant suşunun EDTA'ya duyarlılığı saha suşunun duyarlılığından 4 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen bulgular Sebkova ve ark. (2008)'in elde ettikleri bulgularla benzerlik göstermektedir. *ClpP* mutant suşunun duyarlılığı ise saha suşunun duyarlılığından daha az olduğu bulundu. *Salmonella* sıklıkla hücre içi bir etken olmasına rağmen, bazen hücre dışında da kan serumunda bulunan komplemente maruz kalabilmektedir (Conlan ve North, 1992). Sebkova ve ark. (2008) yaptığı çalışmada, *Salmonella* Enteritidis *aroA* mutantlarının insan ve tavuk serumuna karşı yapılan duyarlılık testi sonucu ile domuz serumunun duyarlılık testi sonucu arasında bir fark olmadığı, *Salmonella* Enteritidis *aroA* mutantının domuz serumuna karşı saha suşunun duyarlılığına kıyasla daha fazla duyarlılık gösterdiği ve bu duyarlılığın flagella üretiminin azalmasından kaynaklandığını bulmuştur. Bu çalışmada, *ClpP* mutant suşu ve saha suşunun domuz serumuna karşı aynı dirençlilik oranı gösterdiği (%50), *aroA* mutant suşunun ise çok daha yüksek duyarlılık gösterdiği görülmüştür. Bu elde edilen *aroA* mutant suşunun domuz serumuna yüksek oranda duyarlılık bulgusu Sebkova ve ark. (2008)'in elde ettikleri bulgularla benzerlik göstermektedir.

Bu tez çalışmasında, mutantların adezyonu ve invazyonu vero hücre kültüründe değerlendirildi. Patojenik *Salmonella* serotipleri, bağırsak epitel hücrelerine invaze olabilmektedir (Kusters ve ark., 1993). Sitotoksik *E. coli* izolatlarının sitotoksitesi, vero hücrelerinde incelenebilmekte (Ghadir ve ark, 2010) ve *Salmonella* invazyonunun kantifikasyonu, vero, HeLa, sığır ve tavuk böbreği, civciv embriyo fibroblast ve insan bağırsak hücre kültüründe *in vitro* olarak kolayca yapılabilmektedir (Barrow ve Lovell,1989). Roof ve ark. (1992)'nin yaptığı çalışmada, vero hücreleri hızlı üremeleri ve *Salmonella*'ya yüksek afinitesi için kullandı. Daha önce yapılan bir çalışmada, insan epitel hücre kültüründe *S. Typhimurium ClpP* mutant suşu invazyonu önemli ölçüde azaltılmıştır (Knudsen ve ark., 2013). Ran ve ark. (2018)'in yaptığı çalışmada, *S. Enteritidis ClpP* mutant suşunun invazyonunun J774 hücre kültüründe azaldığı saptanmıştır. Gaillot ve ark. (2000)'in yaptığı çalışmada, konak hücrelerine invazyondan sonra bakterinin fagositik vakuolden kaçabilmesi için konakta

gözenekleri oluşturan Listeriolysin O virülans faktörünün ekspresyonu için *ClpP2*'nin gerekli olduğu bulunmuş, bu nedenle makrofajlar tarafından fagosite edilen *ClpP2* mutantlarının hücreden kaçamadığı ve hücre içinde çoğalamadığı için enfeksiyonun yayılamadığı saptanmıştır. Bu tez çalışmasında, *ClpP* mutant suşunun adezyonu ve invazyonunun saha suşuna kıyasla sırasıyla 3 kat ve 4 kat azaldığı saptanmıştır. Bu tez çalışmasında, elde edilen *ClpP* mutant suşunda azalan invazyon düzeylerinin Ran ve ark. (2018), Knudsen ve ark. (2013) ve Gaillot ve ark. (2000)'in çalışmalarında elde ettikleri bulgularla benzerlik gösterdiği görülmektedir. Roof ve ark. (1992)'nin yaptığı çalışmada, *S. choleraesuis* 38 suşunun invazyonu için dış membran proteinlerinin önemli olduğu saptanmıştır. Barbosa ve ark. (2017)'nin yaptığı çalışmada, felçli bir flagella sentezleyen *S. Enteritidis* *motB* mutant suşunun bağırsak kolonizasyonunda etkisiz olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada, *aroA* mutant suşunun adezyonu ve invazyonu saha suşuna kıyaslandığında sırayla 33 kat ve 18 kat azalmıştır. *AroA* mutant suşlarında, hücre duvarı ve dış membranındaki defektler, flagella gen ekspresyonunda azalma ve konak hücrenin içinde serbest bulunmayan aromatik amino asitlerin üretimindeki eksiklikler nedeniyle adezyon ve invazyonun büyük ölçüde azaldığı düşünülmektedir.

Aşıların geliştirmesinde *in-vitro* çalışmalar, sonradan yapılacak *in-vivo* testler açısından bir aşının beklenen etkinliği hakkında önemli ipuçları sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen testler sonrasında elde edilen mutantların yüksek derecede attenüasyon göstermesi hayvanlarda aşı adayı olarak kullanılabilme potansiyelleri açısından oldukça umut verici bir sonuç olmuştur. Bu *aroA* mutasyonlarının *Salmonella* serotiplerinin atenüasyonu için yaygın olarak kullanılması nedeniyle beklenen bir sonuçtur (Karasova ve ark., 2009). *ClpP* geninin delesyonu ise, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *Salmonella* Enteritidis'in virülansında önemli derecede azalma ve attenüasyona neden olmuştur (Moreno-Cinos ve ark., 2019; Ran ve ark., 2018).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kanatlı hayvanlarda aşı potansiyeli mutantların geliştirilmesinin amaçlandığı çalışmada, lokal *Salmonella* Enteritidis suşundan *aroA* ve *ClpP* mutant suşları oluşturuldu ve *in vitro* koşullarda fenotipik ve genotipik özellikleri saha suşu ile karşılaştırıldı. Çalışmanın sonucunda, geliştirilen mutantların aşı olarak kullanılabilmesi için uygun olup olmadığı ortaya konuldu.

Türkiye'de, verilere göre *Salmonella* Enteritidis insanların enterit vakalarından diğer *Salmonella* serovarlarına kıyasla daha fazla izole edilmiştir. *Salmonella* Enteritidis'in enfeksiyonu kanatlı hayvanların tüketilen ürünlerinden bulaşması nedeniyle, bu hayvanlarda enfeksiyonun kontrol edilmesi gerekmektedir. Canlı aşılardan inaktif aşılardan daha iyi koruma sağlayabilmesinden dolayı rekombinasyon ile canlı attenüe mutant aşılardan geliştirilebilmektedir. *In vitro* koşullarda mutantların test edilmesi *in vivo* olarak test edildiğinde iyi bir görüş sağlayabilmektedir. 2000 yılından sonra lambda red rekombinasyon yöntemi ile çok sayıda mutantlar oluşturulmuştur.

Bu tez çalışmasında, elde edilen *Salmonella* Enteritidis *aroA* mutant suşunun 4,5 pH'lı LB brotta 37 °C ve 42 °C'de daha yavaş ürediği, biyokimyasal testlerinde ve XLD agarda H₂S negatif verdiği, motilitede azalma gösterdiği, antibiyotiklere duyarlılığı arttığı, yumurta sarısına duyarlılığı 16 kat arttığı, EDTA'ya duyarlılığı 4 kat arttığı, domuz serumuna duyarlılığı arttığı, adezyonu ve invazyonu sırayla 33 kat ve 18 kat azaldığı, PFGE paterninin saha suşuna göre farklı olduğu saptandı.

Elde edilen *Salmonella* Enteritidis *ClpP* mutant suşunun %5 NaCl konsantrasyonuna çok yüksek duyarlılık gösterdiği, motilitede azalma gösterdiği, antibiyotiklere duyarlılığı arttığı, yumurta sarısına duyarlılığı 8 kat arttığı, EDTA'ya duyarlılığı azaldığı, adezyonu ve invazyonu sırayla 3 kat ve 4 kat azaldığı, PFGE paterninin saha suşuna göre farklı olduğu saptandı.

Bu yapılan testlerin sonuçlarına göre elde edilen mutant suşlarının belirli bir attenüasyonu gösterdiğinden kanatlı hayvanlarda aşı adayı olarak kullanılabilme potansiyelleri açısından ve mutant suşu saha suşundan ayırt edilebilmesinden DIVA stratejisi açısından da uygun olduğu düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında geliştirilen mutantların, güvenliği, immünojenitesi ve kolonizasyonu değerlendirilmesi için in vivo olarak fare modelinde ve tavuklarda çalışmaya devam edilmesi gerekmektedir.



ÖZET

Kanatlı Hayvanlarda Aday Aşı Potansiyeli Olan *Salmonella* Enteritidis *AroA* ve *ClpP* Mutantlarının Geliştirilmesi

Bu çalışmada, virülans antijenlerini kodlayan *aroA* ve *ClpP* genlerinde delezyon yaparak kanatlı hayvanlarda aday aşı potansiyeli *Salmonella* Enteritidis mutantlarının geliştirmesi ve in vitro koşullarda özelliklerini karşılaştırması amaçlandı.

SEI- Δ ClpP:CmR ve SEI- Δ aroA:CmR mutant suşları lambda red rekombinasyonu yöntemi kullanılarak, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında, kanatlı kümeslerinin altlık örneklerinden izole edilen ve Pulsed Field Jel Elektroforezi ile genotiplendirilmiş olan *Salmonella* Enteritidis saha suşundan oluşturuldu. Elde edilen mutant suşlarının özellikleri saha suşuyla karşılaştırıldığında, SEI- Δ aroA:CmR'nin 37 °C ve 42°C'de 4,5 pH'lı LB besiyerinde yavaş ürediği ve SEI- Δ ClpP:CmR mutant suşunun %5 NaCl'li LB besiyerinde yüksek duyarlılık gösterdiği saptandı. SEI- Δ aroA:CmR mutant suşu, XLD agarda ve biyokimyasal testlerde H₂S negatif bir sonuç verdi. Oda sıcaklığında ve 42°C'de SEI- Δ aroA:CmR ve SEI- Δ ClpP:CmR mutant suşlarının motiliteleri azaldı, ve antibiyotiklere karşı duyarlılıkları arttı. SEI- Δ aroA:CmR mutantının yumurta sarısına ve EDTA'ya duyarlılığı sırasıyla 16 kat ve 4 kat arttı, domuz serumuna karşı çok yüksek duyarlılık gösterdi, SEI- Δ ClpP:CmR mutant suşunun yumurta sarısına karşı duyarlılığı 8 kat arttı. Vero hücre kültüründe mutantların adezyonu ve invazyonu, SEI- Δ aroA:CmR mutantının sırasıyla 33 kat ve 18 kat, SEI- Δ ClpP:CmR mutant suşu ise sırasıyla 3 kat ve 4 kat azaldı. PFGE genotiplendirmesinde, SEI- Δ aroA:CmR ve SEI- Δ ClpP:CmR mutant suşlarının PFGE paternleri, saha suşunun PFGE paterninden farklılık gösterdi.

Elde edilen sonuçlara göre, geliştirilen mutant suşlarının in vitro koşullarda net bir attenüasyon gösterdiklerinden, tavukları *Salmonella* Enteritidis enfeksiyonundan korumak için aday aşı suşları olarak kullanılmasında faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: *Salmonella* Enteritidis, *aroA*, *ClpP*, Mutant, Aşı.

SUMMARY

Development of Potential *Salmonella* Enteritidis *AroA* and *ClpP* Mutants candidate Vaccines in Poultry

This study was aimed to develop potential *Salmonella* Enteritidis mutant candidate vaccine strains in poultry by knocking out *aroA* and *ClpP* genes which encodes virulence antigens, and compare their properties under in vitro conditions.

The mutant strains SEI- Δ ClpP:CmR and SEI- Δ aroA:CmR were generated by using lambda red recombination method from *Salmonella* Enteritidis wild type strain which was isolated from litter samples of poultry houses, identified and genotyped by Pulsed Field Gel Electrophoresis at Ankara University Faculty of Veterinary Medicine Department of Microbiology. The results of the tested properties of the generated mutant strains compared with the wild-type strain revealed that the SEI- Δ aroA:CmR grew more slowly in LB broth with 4.5 pH at 37°C and 42°C, while the SEI- Δ ClpP:CmR showed very high sensitivity to 5% NaCl. The SEI- Δ aroA:CmR mutant strain was H₂S negative when cultured in XLD agar and tested by biochemical tests. The motility of SEI- Δ aroA:CmR and SEI- Δ ClpP:CmR mutant strains decreased especially at room temperature and 42°C, and their sensitivity to antibiotics increased. The sensitivity of SEI- Δ aroA:CmR mutant to egg yolk and EDTA increased by 16-fold and 4-fold respectively and showed very high sensitivity to pig serum, while the sensitivity of SEI- Δ ClpP:CmR mutant strain was increased against egg yolk only which was 8-fold. The ability of SEI- Δ aroA:CmR mutant to adhere and invade Vero cells decreased by 33-fold and 18-fold, and for SEI- Δ ClpP:CmR mutant strain decreased by 3-fold and 4-fold respectively. In genotyping, the PFGE patterns of SEI- Δ aroA:CmR and SEI- Δ ClpP:CmR mutant strains were different from the PFGE pattern of the field strain.

According to these results, since the generated mutant strains showed a clear attenuation under in vitro conditions, it is thought that it will be beneficial to be used as vaccine candidate strains to protect chickens from *Salmonella* Enteritidis infection.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, *aroA*, *ClpP*, Mutant, Vaccine.

KAYNAKLAR

- AKAN M (2008). Kanatlılarda *Salmonella* infeksiyonları ve kontrolünde temel prensipler. *Veteriner Tavukçuluk Derneği Dergisi*, **6**(2): 3-4.
- ALAKOMİ HL, SAARELA M, HELANDER IM (2003). Effect of EDTA on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium involves a component not assignable to lipopolysaccharide release. *Microbiology (Reading, England)*, **149**(8): 2015–2021.
- AKIKO TAKAYA, TOSHIFUMI TOMOYASU, AKANE TOKUMITSU, MIZUE MORIOKA, TOMOKO YAMAMOTO (2002). The ATP-dependent Lon protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium regulates invasion and expression of genes carried on *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol.*, **184**(1): 224–232.
- ALLEN-VERCOE E, MJ WOODWARD (1999a). The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to chick gut explant. *J Med Microbiol.*, **48**:771-780.
- ALLEN-VERCOE E, MJ WOODWARD (1999b). Colonisation of the chicken caecum by afimbriate and aflagellate derivatives of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Vet Microbiol.*, **69**:265-275.
- ALPHONS JAM VAN ASTEN, JAAP E VAN DIJK (2005). Distribution of classic virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **44**: 251–259.
- ALTMAYER RM, MCNERN JK, BOSSIO JC, ROSENSHINE I, FINLAY BB, GALÁN JE (1993). Cloning and molecular characterization of a gene involved in *Salmonella* adherence and invasion of cultured epithelial cells. *Mol Microbiol.*, **7**:89–98.
- AMANDA WISNER, TASEEN DESIN, AARON WHITE, ANDREW POTTER AND WOLFGANG KOSTER (2012). The *Salmonella* Pathogenicity Island-1 and -2 Encoded Type III Secretion Systems. In: *SALMONELLA –A DIVERSIFIED SUPERBUG*. Ed. Kumar Y. **p**: 469-494.
- ANNE HARDY (1999). Food, Hygiene, and the Laboratory. A Short History of Food Poisoning in Britain, circa 1850–1950. *Social History of Medicine*, **12**(2): 293–311.

- ASHKENAZI S, CLEARY TG, MURRAY BE, WANGER A, PICKERING LK (1988). Quantitative analysis and partial characterization of cytotoxin production by *Salmonella* strains. *Infect. Immun.*, **56**: 3089–3094.
- BARBOSA F DE O, FREITAS NETO OC DE BATISTA DFA, ALMEIDA AMDE, RUBIO M DA S, ALVES LBR, BERCHIERI JUNIOR A (2017). Contribution of flagella and motility to gut colonisation and pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in the chicken. *Brazilian Journal of Microbiology*, **48**(4): 754–759.
- BARKER RM, AND DC OLD (1989). The usefulness of biotyping in studying the epidemiology and phylogeny of *Salmonellae*. *J Med Microbiol.*, **29**: 81-88.
- BARROW PA (1996). Immunity to *Salmonella* and other bacteria. In: Proceedings of the Poultry Science Symposium Series. Ed: Davison TF, Morris TR, Payne LN. *Poultry immunology*, **24**: 243–63.
- BARROW PA, JONES MA, THOMSON N (2010). *Salmonella*. In: *Pathogenesis of Bacterial infections in Animals*. 4th ed. Ed: Carlton L Gyles, John F Prescott, J Glenn Songer, Charles O. Chapter **14**: 231-265.
- BARROW PA, LOVELL MA (1989). Invasion of Vero cells by *Salmonella* species. *Journal of Medical Microbiology*, **28**(1): 59–67.
- BARROW PA, LOVELL MA (1991). Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. *Avian Pathol.*, **20**: 335-348.
- BAUER AW, WMM KIRBY, JC SHERRIS, M TURCK (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**:493-496.
- BAUMLER AJ, RM TSOLIS, F HEFFRON (1996). The lpf fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci.*, **93**: 279-283.
- BENTLEY R, HASLAM E (1990). The shikimate pathway—a metabolic tree with many branches. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, **25**: 307–384.
- BHANDARI V, WONG KS, ZHOU JL, MABANGLO MF, BATEY RA, HOURY WA (2018). The Role of ClpP Protease in Bacterial Pathogenesis and Human Diseases. *ACS Chemical Biology*, **13**(6): 1413–1425.
- BURKINSHAW BJ, STRYNADKA NC (2014). Assembly and structure of the T3SS. *Biochim Biophys Acta.*, **1843**(8): 1649-1663.
- CHAPPELL L, P KAISER, P BARROW, MA JONES, C JOHNSTON, P WIGLEY (2009). The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **128**:53–59.

- CHATFIELD S, ROBERTS M, LONDONO P, CROPLEY I, DOUCE G, DOUGAN G (1993). The development of oral vaccines based on live attenuated *Salmonella* strains. *FEMS Immunol Med Microb.*, **7**: 1–8.
- CHOPRA AK, HUANG JH, XU XJ, BURDEN K, NIESEL DW, ROSENBAUM MW, POPOV VL, PETERSON JW (1999). Role of *Salmonella* enterotoxin in overall virulence of the organism. *Microb. Pathog.*, **27**: 155-171.
- CHOPRA AK, PETERSON JW, CHART P, PRASAD R (1994). Molecular characterization of an enterotoxin from *Salmonella* Typhimurium. *Microb. Pathog.*, **16**: 85-98.
- CONLAN JW, NORTH RJ (1992). Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect. Immun.*, **60**: 5164–5171.
- COOPER GL, VENABLES LM, WOODWARD MJ, HORMAECHCE CE (1994). Invasiveness and persistence of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, and a genetically defined *Salmonella* Enteritidis *aroA* strain in young chickens. *Infect Immun.*, **62**(11): 4739–4746.
- CRAIG T. PARKER, JEAN GUARD-PETTER (2001). Contribution of flagella and invasion proteins to pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicks. *FEMS Microbiol Lett.*, **204**: 287-291.
- CRUMP JA, LUBY SP, MINTZ ED (2004). The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Org.*, **82**:346–353.
- DAEFLER S, RUSSEL M (1998). The *Salmonella* Typhimurium InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG. *Mol Microbiol.*, **28**:1367-1380.
- DATSENKO KA, WANNER BL (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**(12): 6640–6645.
- DE CORT W, F HAESEBROUCK, R DUCATELLE, F VAN IMMERSEEL (2015). Administration of a *Salmonella* Enteritidis Δ hilAssrAflIG strain by coarse spray to newly hatched broilers reduces colonization and shedding of a *Salmonella* Enteritidis challenge strain. *Poult Sci.*, **94**(1): 131–135.
- DE CORT WOLFGANG (2015). Protection of broilers against *Salmonella* using colonization-inhibition. P.H.D Thesis, at the Ghent University, Faculty of Veterinary Medicine, Merelbeke, Belgium.

- DEDİTİUS JA, FELGNER S, SPÖRİNG I, KÜHNE C, FRAHM M, ROHDE M, WEİB S, ERHARDT M (2015). Characterization of novel factors involved in swimming and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS One*, **10**: e0135351.
- DESIN TS, KOSTER W, POTTER AA. (2013). *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. *Expert Rev Vaccines*, **12**: 87-96.
- DESMIDT M, DUCATELLE R, HAESEBROUCK F (1997). Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 after experimental infection of young chickens. *Vet Microbiol.*, **56**: 99–109.
- DEVENDRA H. SHAH, XIAOHUI ZHOU, HYE-YOUNG KIM, DOUGLAS R CALL, JEAN GUARD (2012). Transposon Mutagenesis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis identifies genes that contribute to invasiveness in human and chicken cells and survival in egg albumen. *Infect Immun.*, **80**(12): 4203–4215.
- EBERTH CJ (1880). Die Organismen in den Organen bei Typhus abdominalis. *Archiv f. pathol. Anat.*, **81**: 58–74.
- EDWARDS RA, DM SCHIFFERLI, SR MALOY (2000). A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **97**: 1258-1262.
- EFSA (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2010. *EFSA J.*, **10**: 442.
- EFSA (2014). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, **12**(2): 3547.
- EHUWA O, JAISWAL AK, JAISWAL S (2021). *Salmonella*, Food Safety and Food Handling Practices. *Foods*, **10**(5): 907.
- ENG, SHU-KEE, PUSPARAJAH, PRIYIA, AB MUTALIB, NURUL-SYAKIMA, SER, HOOI LENG, CHAN, KOK-GAN, LEE, LEARN HAN (2015). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, **8**: 1-10.
- FITZGERALD C, SHERWOOD R, GHEESLING LL, BRENNER FW, FIELDS PI (2003). Molecular analysis of the rfb O antigen gene cluster of *Salmonella enterica* serogroup O: 6, 14 and development of a serogroup-specific PCR assay. *Appl Environ Microbiol.*, **69**: 6099–6105.
- FOLEY SL, JOHNSON TJ, RICKE SC, NAYAK R, DANZEISEN J (2013). *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **77**:582-607.
- FONS JAM VAN ASTEN, HENNO GCJM HENDRIKS, JOS FJG KONINKX, BERNARD AM VAN DER ZEIJST, WIM GAASTRA (2000). Inactivation of the

flagellin gene of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strongly reduces into differentiated Caco-2 cells, *FEMS Microbiol Lett.*, **185**(2): 175–179.

FRAHM M, FELGNER S, KOCIJANCIC D, ROHDE M, HENSEL M, CURTISS R, ERHARDT M, WEISS S (2015). Efficiency of conditionally attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in bacterium-mediated tumor therapy. *mBio.*, **6**: e00254-15.

FU Y, GALAN JEA (1999). *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*, **401**(6750): 293–297.

GAÏLLOT O, PELLEGRINI E, BREGENHOLT S, NAÏR S, BERCHE P (2000). The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.*, **35**: 1286-1294.

GALAN J, WOLF-WATZ H (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, **444**: 567-573.

GALANIS E, LO FO WONG DM, PATRICK ME, BINSZTEIN N, CIESLIK A, CHALERMCHIKIT T, AIDARA-KANE A, ELLIS A, ANGULO FJ, WEGENER HC (2006). Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002, *Emerging Infectious Diseases*, **12**: 381–388.

GAL-MOR O, BOYLE EC, GRASSL GA (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Front Microbiol.*, **5**: 391.

GAMAZO C, IRACHE JM (2007). *Salmonella* vaccines. Ed.Méndez-Vilas A. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, **1**: 518–524.

GAST RK (2003). Paratyphoid Infections In: *Diseases of Poultry*. 11th ed. Ed: SAIF RK, BARNES HJ, GLISSON JR, FADY AM, MCDOUGALD LR, SWAYNE DE. Iowa State University Press, **p**: 583- 613.

GAST RK, BEARD CW (1989). Age-related changes in the persistence and pathogenicity of *Salmonella* Typhimurium in chicks. *Poult Sci.*, **68**: 1454-1460.

GHADIR S EL-HOUSSEINY, MOHAMMAD M ABOULWABA, NADIA A HASSOUNA (2010). Cytotoxic Activities of Some Escherichia coli Isolates: Possible Mechanisms and Approaches for Inhibition. *Journal of American Science*, **6**(10): 269-283.

GIANNELLA RA (1996). *Salmonella* In: *Medical Microbiology*. 4th ed. Ed: Baron S. Chapter **21**: PMID: 21413334.

ULUSAL *SALMONELLA* KONTROL PROGRAMI (2018). Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı,

- GOODNOUGH MC, JOHNSON EA (1991). Control of *Salmonella* Enteritidis infections in poultry by polymyxin B and trimethoprim. *Applied and environmental microbiology*, **57**(3): 785–788.
- GRIMONT PATRICK, WEILL FRANÇOIS-XAVIER (2007). Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars, (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur, **p**: 1-166.
- GUIANNELLA RA (1979). Importance of the intestinal inflammatory reaction in *Salmonella*-mediated intestinal secretion. *Infection and Immunity*, **23**: 140-145.
- HARAGA A, MILLER SI (2003). A *Salmonella enterica* serovar Typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF- B-dependent Gene expression. *Infect Immun.*, **71**(7): 4052–4058.
- HASAN R, ZAFAR A, ABBAS Z, MAHRAJ V, MALIK F, ZAIDI A (2008). Antibiotic resistance among *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A in Pakistan (2001–2006). *J Infect Dev Countr.*, **2**: 289–294.
- HENSEL M, JE SHEA, SR WATERMAN, R MUNDY, T NIKOLAUS, G BANKS, A VAZQUEZ-TORRES, C GLEESON, FC FANG, DW HOLDEN (1998). Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol.*, **30**: 163-174.
- HERIKSTAD HY, MOTARJEMI, YASMINE, TAUXE R (2002). *Salmonella* surveillance: A global survey of public health serotyping. *Epidemiology and infection*, **129**: 1-8.
- HITCHCOCK PJ, LEIVE L, MAKELA PH, RIETSCHER ET, STRITTMATTER W, MORRISON DC (1986). Minireview: Lipopolysaccharide nomenclature – past, present and future. *J. Bacteriol.*, **166**: 699–705.
- HOISETH SK, STOCKER BAD (1981). Aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*, **291**: 238–239.
- JIWA SFH (1981). Probing for enterotoxigenicity among the *Salmonellae*: an evaluation of biological assays. *J. Clin. Microbiol.*, **14**: 463-472.
- JONES BD, CA LEE, S FALKOW (1992). Invasion by *Salmonella* Typhimurium is affected by the direction of flagellar rotation. *Infect Immun.*, **60**: 2475-2480.
- KANIGA K, URALIL J, BLISKA JB, GALAN JE (1996). A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella* Typhimurium. *Mol. Microbiol.*, **21**: 633-641.

- KARASOVA D, A SEBKOVÁ, V VRBAS, H HAVLICKOVÁ, F SISÁK, I RYCHLÍK (2009). Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis mutants with a vaccine potential. *Vaccine*, 20; **27**(38): 5265–5270.
- KARON AE, ARCHER JR, SOTIR MJ, MONSON TA, KAZMIERCZAK JJ (2007). Human multidrug-resistant *Salmonella* newport infections, Wisconsin, 2003–2005. *Emerging Infectious Diseases*, **13**: 1777–1780.
- KARU AE, SAKAKI Y, ECHOLS H, LINN S (1975). The gamma protein specified by bacteriophage gamma. Structure and inhibitory activity for the recBC enzyme of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*, **250**: 7377–7387.
- KETYI I, PACSA S, EMODY L, VERTENYI A, KOCSIS B, KUCH B (1979). *Shigella* d vsenteriae l-like cytotoxic enterotoxins produced by *Salmonella* strains. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, **26**: 217–223.
- KHORAMIAN-FALSAFI T, S HARAYAMA, K KUTSUKAKE, JC PECHERE (1990). Effect of motility and chemotaxis on the invasion of *Salmonella* Typhimurium into HeLa cells. *Microb Pathog.*, **9**: 47–53.
- KIMBROUGH TG, MILLER SI (2002). Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella* Typhimurium. *Microbes Infect.*, **4**: 75–82.
- KNUDSEN GM, OLSEN JE, AABO S, BARROW P, RYCHLÍK I, THOMSEN LE (2013). ClpP deletion causes attenuation of *Salmonella* Typhimurium virulence through mis-regulation of RpoS and indirect control of CsrA and the SPI genes. *Microbiology*, **159**(7): 1497–1509.
- KOO FCW, PETERSON JW (1982). Cell-free extracts of *Salmonella* inhibit protein synthesis and cause cytotoxicity in eukaryotic cells. *Toxicon*, **21**: 309–320.
- KOO FCW, PETERSON JW, HOUSTON CW, MOLINA NC (1984). Pathogenesis of experimental salmonellosis: inhibition of protein synthesis by cytotoxin. *Infect. Immun.*, **43**: 93–100.
- KUSTERS JG, MULDER-KREMERS GA, VAN DOORNIK CE, VAN DER ZEIJST B A (1993). Effects of multiplicity of infection, bacterial protein synthesis, and growth phase on adhesion to and invasion of human cell lines by *Salmonella* typhimurium. *Infection and immunity*, **61**(12): 5013–5020.
- KUTSUKAKE K, Y OHYA, T IINO (1990). Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella* Typhimurium. *J. Bacteriol.*, **172**: 741–747.
- KUZMINOV A (1999). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **63**: 751–813.

- LIANG-TAKASAKI CJ, GROSSMAN N, LEIVE L (1983). *Salmonellae* activate complement differentially via the alternative pathway depending on the structure of their lipopolysaccharide O-antigen. *J. Immunol.*, **130**: 1867-1870.
- LIANG-TAKASAKI CJ, MIIKELA~I PH, LEIVE L (1982). Phagocytosis of bacteria by macrophages: changing the carbohydrate of lipopolysaccharide alters interaction with complement and macrophages. *J. Immunol.*, **128**: 1229-1235.
- LIN SL, LE TX, COWEN DS (2003). SptP, a *Salmonella* Typhimurium type III-secreted protein, inhibits the mitogen-activated protein kinase pathway by inhibiting Raf activation. *Cell Microbiol.*, **5**(4): 267-275.
- LIN Z, TANG P, JIAO Y, KANG X, LI Q, XU X, SUN J, PAN Z, JIAO X (2017). Immunogenicity and protective efficacy of a *Salmonella* Enteritidis *sptP* mutant as a live attenuated vaccine candidate. *BMC Vet Res.*, **24**;13 (1):194.
- MACNAB RM (1996). Flagella and motility. In: *Escherichia coli* and *Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. Ed: FC Neidhardt, R Curtiss, JL Ingraham, EC C Lin, KB Low, B Magasanik, WS Reznikoff, M Riley, M Schaechter, HE Umbarger. American Society for Microbiology, Washington, D.C. **p**: 123-145.
- MADYAGOL M, AL-ALAMI H, LEVARSKI Z, DRAHOVSKÁ H, TURŇA J, STUHLÍK S (2011). Gene replacement techniques for *Escherichia coli* genome modification. *Folia Microbiologica*, **56**(3): 253-263.
- MAJOWICZ SE, MUSTO J, SCALLAN E, ANGULO FJ, KIRK M, O'BRIEN SJ, JONES TF, FAZIL A, HOEKSTRA RM (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, **50**(6): 882-889.
- MARCUS SL, JH BRUMELL, CG PFEIFER, BB FINLAY (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.*, **2**:145-156.
- MARK GM, BILL TMD (2003). *Clinical Microbiology*. 3rd ed. **p**: 58-61.
- MARTA ELSHEIMER-MATULOVA, KAROLINA VARMUZOVA, KAMILA KYROVA, HANA HAVLICKOVA, FRANTISEK SISAK, MASUDUR RAHMAN, IVAN RYCHLIK (2015). *phoP*, SPI1, SPI2 and *aroA* mutants of *Salmonella* Enteritidis induce a different immune response in chickens. *Vet Res.*, **46**(1): 96.
- MARTA MATULOVA, HANA HAVLICKOVA, FRANTISEK SISAK, IVAN RYCHLIK (2013). Vaccination of chickens with SPI1-*lon* and SPI1-*lon*-*fliC* mutant of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *PLoS One*, **8**(6): e66172.

- MATULOVA M, H HAVLICKOVA, F SISAK, I RYCHLIK (2012). Vaccination of chickens with *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 and SPI2 defective mutants of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vaccine*, 9; **30**(12): 2090–2097.
- MESFIN ZEWDU, WONDIMAGEGN DEJENE. (2017). Review on Salmonellosis in Poultry and Its Public Health Importance. *Food Science and Quality Management*, **61**: 47-61.
- MILANEZ GP, WERLE CH, AMORIM MR, RIBEIRO RA, TIBO L, ROQUE-BARREIRA MC, OLIVEIRA AF, BROCCHI M (2018). HU-lacking mutants of *Salmonella enterica* Enteritidis are highly attenuated and can induce protection in murine model of infection. *Front Microbiol.*, **9**: 1780.
- MORENO-CINOS C, GOOSSENS K, SALADO IG, VAN DER VEKEN P, DE WINTER H, AUGUSTYNS K (2019). ClpP Protease, a Promising Antimicrobial Target. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**(9): 2232.
- MURPHY KC (1991). Lambda *gam* protein inhibits the helicase and chi-stimulated recombination activities of *Escherichia coli* RecBCD enzyme. *J Bacteriol.*, **173**: 5808-5821.
- MURPHY KC (1998). Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, **180**: 2063-2071.
- MUSTAK INCI, YARDIMCI VEYSI (2019). Construction and in vitro characterisation of *aroA* defective (*aroAΔ*) mutant *Salmonella* Infantis. *Archives of Microbiology*, (**201**): 1277-1284.
- NEVOLA J, STOCKER BAD, LAUX DC, COHEN PS (1985). Colonization of the mouse intestine by an avirulent *Salmonella* Typhimurium strain and its lipopolysaccharide-defective mutants. *Infect. Immun.*, **50**: 152-159.
- NICHOLAS R THOMSON, DEBRA J CLAYTON, DANIEL WINDHORST, GEORGIOS VERNIKOS, SUSANNE DAVIDSON, CAROL CHURCHER, MICHAEL A QUAIL, MARK STEVENS, MICHAEL A JONES, MICHAEL WATSON, ANDY BARRON, ABIGAIL LAYTON, DEREK PICKARD, ROBERT A KINGSLEY, ALEX BIGNELL, LOUISE CLARK, BARBARA HARRIS, DOUG ORMOND, ZAHRA ABDELLAH, KAREN BROOKS, INNA CHEREVACH, TRACEY CHILLINGWORTH, JOHN WOODWARD, HALINA NORBERCZAK, ANGELA LORD, CLAIRE ARROWSMITH, KAY JAGELS, SHARON MOULE, KAREN MUNGALL, MANDY SANDERS, SALLY WHITEHEAD, JOSE A CHABALGOITY, DUNCAN MASKELL, TOM HUMPHREY, MARK ROBERTS, PAUL A BARROW, GORDON DOUGAN, JULIAN PARKHILL (2008). Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.*, **18**(10): 1624–1637.

- OCHMAN H, FC SONCINI, F SOLOMON, EA GROISMAN (1996). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **93**: 7800-7804.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (2018). Terrestrial Manual. Fowl Typhoid and Pullorum Disease. Chapter **2.3.11**. p: 1-17.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (2021). Terrestrial Manual. Prevention, Detection and Control of *Salmonella* in Poultry. Chapter **6.6**: 1-5.
- OLDENKAMP EP (2004). Predecessors: veterinarians from earlier times, Daniel Elmer Salmon (1850-1914). *Tijdschr Diergeneeskd*, **129**(17): 554–555.
- OMWANDHO COA, KUBOTA T (2010). *Salmonella enterica* serovar Enteritidis: A Mini-review of Contamination Routes and Limitations to Effective Control. *Japan Agricultural Research Quarterly*, **44**(1): 7–16.
- PAN S, MALİK IT, THOMY D, HENRICHFREISE B, SASS P (2019). The functional ClpXP protease of *Chlamydia trachomatis* requires distinct clpP genes from separate genetic loci. *Scientific Reports*, **9**(1).
- PATI NB, VISHWAKARMA V, JAISWAL S, PERIASWAMY B, HARDT W, SUAR M (2013). Deletion of *invH* gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium limits the secretion of Sip effector proteins. *Microbes Infect.*, **15**(1): 66-73.
- PENHEITER KL, N MATHUR, D GILES, T FAHLEN, BD JONES (1997). Non-invasive *Salmonella* Typhimurium mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. *Mol Microbiol.*, **24**:697-709.
- POTEETE AR, FENTON AC (2000). Genetic requirements of phage lambda red-mediated gene replacement in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.*, **182**: 2336-2340.
- QUINN PJ, CARTER ME, MARKEY BK, CARTER GR (2004). *Clinical Veterinary Microbiology*. 6th ed. p: 226-231, 345-348.
- QUINN PJ, MARKEY BK, CARTER ME, DOMMELLY WJ & MAGHIRE D (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*. 1st ed. p:113-115.
- RAFAEL ACPF, JACQUELINE BP, MARIANA DS, ADRIANA MA, ANGELO JRB (2010). Control of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum in birds by using live vaccine candidate containing attenuated *Salmonella* Gallinarum mutant strain. *Vaccine*, **28** (16): 2853–2859.
- RAHMAN HS, MAHMOUD BM, OTHMAN HH, AMIN K (2018). A Review of History, Definition, Classification, Source, Transmission, and Pathogenesis of

- Salmonella*: A Model for Human Infection. *Journal of Zankoy Sulaimani*, **20**(3–4): 11–19.
- RAHUL M NANDRE, ATUL A CHAUDHARI, KIKU MATSUDA, JOHN HWA LEE (2011). Immunogenicity of a *Salmonella* Enteritidis mutant as vaccine candidate and its protective efficacy against salmonellosis in chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* **15**; **144**(3-4): 299–311.
- RAN X, YANG Z, SHAO G, WEN X, LIU S, NI H (2018). Avian *Salmonella* enteritidis serovar Enteritidis with *ClpP* deletion is attenuated and highly immunogenic in chickens. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **42** (4): 269-276.
- RANDALL LP, COOLES SW, COLDHAM NC, STAPLETON KS, PIDDOCK LJ, WOODWARD MJ (2006). Modification of enrofloxacin treatment regimens for poultry experimentally infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 to minimize selection of resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **50**(12): 4030–4037.
- REITMEYER JC, PETERSON JW, WILSON KJ (1986). *Salmonella* cytotoxin: a component of bacterial outer membrane. *Microbial Pathogen.*, **1**: 503-510.
- REVOLLEDO L, AJP FERREIRA (2012). Current perspectives in avian salmonellosis: Vaccines and immune mechanisms of protection. *J. appl. Poult. Res.*, **21**: 418–431.
- ROOF MB, KRAMER TT, ROTH JA (1992). A comparison of virulent and avirulent strains of *Salmonella* Choleraesuis and their ability to invade Vero cell monolayers. *Veterinary Microbiology*, **30**(4): 355–368.
- ROTGER R, CASADESUS J (1999). The virulence plasmid of *Salmonella*. *Int. Microbiol.*, **2**: 177–184.
- RYCHLIK I, KARASOVA D, SEBKOVA A, VOLF J, SISAK F, HAVLICKOVA H, KUMMER V, IMRE A, SZMOLKA A, NAGY B (2009). Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. *BMC Microbiol.*, **19**(9): 268.
- SEBASTIAN FELGNER, MICHAEL FRAHM, DINO KOCIJANCIC, MANFRED ROHDE, DENITSA ECKWEILER, AGATA BIELECKA, EMILIO BUENO, FELIPE CAVA, WOLF-RAINER ABRAHAM, ROY CURTISS, SUSANNE HÄUSSLER, MARC ERHARDT, SIEGFRIED WEISS (2016). *aroA*-Deficient *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is more than a metabolically attenuated mutant. *mBio Sep.*, **7** (5): e01220-16.
- SEBKOVA A, KARASOVA D, CRHANOVA M, BUDINSKA E, RYCHLIK I (2008). *aro* Mutations in *Salmonella enterica* Cause Defects in Cell Wall and Outer Membrane Integrity. *Journal of Bacteriology*, **190**(9): 3155–3160.

- SEO KH, PS HOLT, RK GAST, CL HOFACRE (2000). Elimination of early *Salmonella* Enteritidis infection after treatment with competitive-exclusion culture and enrofloxacin in experimentally infected chicks. *Poultry Science*, **79**(10):1408-1413.
- SHARMA-KUINKEL BK, RUDE TH, FOWLER VG JR (2016). Pulse Field Gel Electrophoresis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **1373**: 117–130.
- SINGH BR (2009). *Salmonella* vaccines for animals and birds and their future perspective. *Open Vaccine J.*, **2**:100-112.
- SMITH HW (1956). The use of live vaccines in experimental *Salmonella* Gallinarum infection in chickens with observations on their interference effect. *J. Hyg.*, **54**: 419-432.
- SOOD S, KAPIL A, DAS B, JAIN Y, KABRA SK (1999). Reemergence of chloramphenicol-sensitive *Salmonella* Typhi. *Lancet*, **353**(9160):1241–1242.
- SPECTOR MP (1998). The starvation-stress response (SSR) of *Salmonella*. *Adv Microb Physiol.*, **40**: 233-279.
- SU LH, CHIU CH (2007). *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J.*, **30** (3): 210–9.
- SUZUKI S (1994). Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in poultry. *International Journal of Food Microbiology*, **21**(1-2): 89–105.
- TASEEN S DESIN, PO-KING S LAM, BIRGIT KOCH, CLAUDIA MICKAEL, EMIL BERBEROV, AMANDA LS WISNER, HUGH GG TOWNSEND, ANDREW A POTTER, WOLFGANG KÖSTER. (2009). *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island 1 is not essential for but facilitates rapid systemic spread in chickens. *Infect Immun.*, **77**(7): 2866–2875.
- THOMSEN LE, OLSEN JE, FOSTER JW, INGMER H (2002). *ClpP* is involved in the stress response and degradation of misfolded proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbio.*, **148**(9): 2727-2733.
- THONGBAI B, GASALUCK P, WAİTES WM (2006). Morphological changes of temperature- and pH-stressed *Salmonella* following exposure to cetylpyridinium chloride and nisin. *LWT - Food Science and Technology*, **39**(10): 1180–1188.
- ULRICH METHNER, PAUL A BARROW, ANGELA BERNDT, IVAN RYCHLIK (2011). *Salmonella* Enteritidis with double deletion in *phoPfliC*--a potential live *Salmonella* vaccine candidate with novel characteristics for use in chickens. *Vaccine*, **29**(17): 3248–3253.

- VAN ASTEN AJAM, ZWAAGSTRA KA, BAAY MF, KUSTERS JG, HUIS IN 'T VELD JH, VAN DER ZEIJST BA (1995). Identification of the domain which determines the g,m serotype of the flagellin of *Salmonella* Enteritidis. *J. Bacterio.*, **177**: 1610-1613.
- VAUBOURGEIX J, LIN G, DHAR (2015). Stressed mycobacteria use the chaperone ClpB to sequester irreversibly oxidized proteins asymmetrically within and between cells. *Cell Host Microbe*, **17**:178–90.
- WATSON PR, PAULIN SM, BLAND AP, JONES PW, WALLIS TS (1995). Characterization of intestinal invasion by *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Dublin and effect of a mutation in the invH gene. *Infect Immun.*, **63**(7): 2743-2754.
- WRIGHT AE (1997). Sample, D. Typhoid vaccines. *Br. Med. J.*, **1**: 256-262.
- YANG J, SUN B, HUANG H, JIANG Y, DIAO L, CHEN B, XU C, WANG X, LIU J, JIANG W, YANG S (2014). High-Efficiency Scarless Genetic Modification in *Escherichia coli* by Using Lambda Red Recombination and I-SceI Cleavage. *Appl Environ Microbiol.*, **80**(13):3826-3834.
- YU D, ELLIS HM, LEE EC, JENKINS NA, COPELAND NG, COURT DL (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **97**: 5978-5983.
- ZHANG-BARBER L, TURNER AK, BARROW PA (1999). Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. *Vaccine*, **17**: 2538–2545.
- ZHAO Y (2002). Virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. P.H.D. Thesis at the Division of Bacteriology, Department of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Netherlands.