



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



KANATLI HAYVANLARDA AŞI ADAYI *SALMONELLA* INFANTIS MUTANT SUŞLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Mustafa ÖNOL

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI**

**ANKARA
2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANATLI HAYVANLARDA AŞI ADAYI *SALMONELLA*
INFANTIS MUTANT SUŞLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

Mustafa ÖNOL

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hakan YARDIMCI

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
345/21L0239005 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2022

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kanatlı Hayvanlarda Aşı Adayı *Salmonella* Infantis Mutant Suşlarının Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cmler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Mustafa ÖNOL

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Anabilim Dalında
Mustafa ÖNOL tarafından hazırlanan
“Kanatlı Hayvanlarda Aşı Adayı *Salmonella* Infantis Mutant Suşlarının
Geliştirilmesi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile
kabul / ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

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

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Taksonomi ve Nomanklatür	1
1.2. Etiyoloji	5
1.3. Epidemiyoloji	6
1.4. Virülans Faktörleri	8
1.4.1. Salmonella Patojenite Adaları	9
1.5. Salmonella Aşılı	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	15
2.1. Gereç	15
2.1.1. Bakteri Suşları	15
2.1.2. Besiyerleri	15
2.1.3. Antiserumlar	15
2.1.4. Antibiyotik Diskleri ve Suplementleri	16
2.1.5. Biyokimyasal ve Moleküler Kitler	16
2.1.6. Kimyasal Maddeler	16
2.1.7. Laboratuvar Ekipmanları	17
2.1.8. Primerler ve Plazmidler	18
2.2. Yöntem	18
2.2.1. Kullanılacak Suşun Belirlenmesi	18
2.2.2. Hedeflenen Gen Bölgesine Uygun Oligonükleotidlerin Tasarlanması	19
2.2.3. Uygun Besiyeri ve Solüsyonların Hazırlanması	19
2.2.4. Homoloji Kollarına Uygun Kaset Hazırlanması	20
2.2.5. Salmonella Infantis'in pRedET Plazmidi ile Transformasyonu	21
2.2.6. Hedeflenen Kromozomal DNA Bölgesinin Kesilmesi	22
2.2.7. Gen Delesyonunun Doğrulanması	24
2.2.8. pRedET Plazmidinin Mutant Salmonella Infantis Suşundan Çıkarılması	25
2.2.9. Mutant Bakterinin Değerlendirilmesi	25
3. BULGULAR	27
3.1. Kullanılacak Salmonella Infantis Suşunun Belirlenmesine Ait Bulgular	27
3.1.1. Biyokimyasal ve Serolojik Analizlere Ait Bulguları	27
3.1.2. DNA İzolasyonuna Ait Bulgular	28
3.2. Homoloji Kollarına Uygun Kaset Hazırlanmasına Ait Bulgular	28

3.3. <i>pRedET</i> plazmidinin Transformasyonuna Ait Bulgular	29
3.4. Hedeflenen Kromozomal DNA Bölgesinin Kesilmesine Ait Bulgular	30
3.5. <i>pRed/ET</i> Plazmidinin Mutant <i>Salmonella</i> Infantis Suşundan Çıkarılmasına Ait Bulgular	32
3.6. Mutant Bakterinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular	32
4. TARTIŞMA	33
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	38
ÖZET	39
SUMMARY	40
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	46



ÖNSÖZ

Salmonella etkenleri kanatlı hayvanlarda önemli verim kayıplarına ve hastalık tablolarına neden olmalarının yanı sıra insanlarda karşılaşılan gıda kaynaklı infeksiyonlarda önemli rol oynamaktadır. Günümüzde insan tüketimine sunulan etlik piliç işletmelerinde en çok karşılaşılan *Salmonella* serotipi *Salmonella* Infantis'tir. Bunun sonucu olarak insanlarda karşılaşılan gıda kaynaklı infeksiyonlarda *S. Infantis*'in prevalansı her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle kanatlı hayvanlarda önemli verim kayıplarına neden olmasının yanı sıra toplum sağlığına karşı tehdit oluşturan *S. Infantis* infeksiyonlarına karşı geliştirilecek aşılar önem taşımaktadır.

Toplum sağlığını korumak için gıda kaynaklı hastalıkların azaltılmasında koruma ve kontrol işlemlerinin üretim aşamasından başlatılması çok önemlidir. Bu amaçla uygulanan biyogüvenlik uygulamalarından en önemlisi aşılamadır. Ancak günümüzde kullanılan ve konvansiyonel yöntemlerle elde edilen *Salmonella* aşılarının etiyolojik ve ekolojik özelliklerine bağlı olarak sorunlar yaşandığı bilinmektedir. Bu nedenle rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak daha verimli aşılarda geliştirilmesine yönelik çalışmalar her geçen gün hız kazanmaktadır. Bu tez çalışmasında *Salmonella*, *Shigella* ve *Escherichia* gibi gram negatif bakterilerde başarıyla kullanılabilen klonlama veya genom mühendisliği ve homolog rekombinasyona dayanan alternatif bir yöntem olan Lambda-Red yöntemi kullanılarak aşı adayı *invH* mutan *Salmonella* Infantis suşu geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) koordinatörlüğüne, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 2211-C programına, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 2214-A programına ve 100/2000 YÖK Doktora Burs programına teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince yardım ve ilgilerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Hakan YARDIMCI başta olmak üzere Ankara Üniversitesi Veteriner

Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, bölüm sekreteri Yüksel Erol'a, başta Dr. Tajelser Idris Badri Adam, Dr. Asena Esra Erdem ve Dr. Tuğçe Üstün olmak üzere Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma, Hasan Sarıyıldırım'a, Nihat Aldemir'e, çalışma sürecimin her aşamasında bilgilerini, tecrübelerini ve değerli zamanını esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan babam Prof. Dr. Ahmet Gökhan Öñol'a annem Emine Öñol'a kardeşim Mehmet Öñol ile her koşulda yanımda olan değerli eşim İmge Duru Öñol ve tez yazım sürecim boyunca yanımdan ayrılmayan güzel kedim Mu'ya çok teşekkür ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
a_w	Su aktivitesi
amp	Ampisilin
bp	Base Pair
cm	Santimetre
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FRT	Flippase Tanıma Bölgesi
g	The Gravitational Force
H ₂ S	Hidrojen Sülfür
ISO	International Organization for Standardization
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LB	Luria-Bertani
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Δ	Genin önüne getirilince delesyonu temsil eder.
λ	Lambda

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. <i>Salmonella</i> nomanklatür (Ryan ve ark., 2017)	4
Şekil 1.2. Avrupa Birliği verilerine göre insanlardan izole edilen <i>Salmonella</i> serotiplerinin gıda kaynaklarına göre dağılımı (EFSA, 2021).	8
Şekil 3.1. Tasarlanan kasetin PCR görüntüsü ile konfirmasyonu.	29
Şekil 3.2. <i>pRedET</i> plazmidinin transformasyonu sonucunda Ampisilin içeren besi yerinde üreyen <i>S. Infantis</i> kolonileri.	30
Şekil 3.3. Transformasyon işlemi sonucunda Kanamisin'e karşı direnç kazanan <i>S. Infantis</i> kolonileri.	30
Şekil 3.4. Plazmid eliminasyonu yapılan suşa spesifik olarak dizayn edilen primerler ile yapılan PCR sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü (M: DNA Ladder MT-1: Mutant <i>S. Infantis</i> MT-2: Mutant <i>S. Infantis</i> WT: Saha suşu N: Negatif kontrol).	31

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. <i>Salmonella</i> 'nın biyokimyasal özellikleri.	5
Çizelge 1.2. <i>Salmonella</i> patojenite adaları (Wisner ve ark., 2012).	10
Çizelge 2.1. Kullanılan antibiyotik ajanlar.	26
Çizelge 3.1. Seçilen <i>S. Infantis</i> suşunun biyokimyasal özellikleri.	28



1. GİRİŞ

Salmonelloz ismiyle bilinen ve *Salmonella* etkenlerinin neden olduğu infeksiyonlar dünya genelinde en sık karşılaşılan gıda kaynaklı hastalıklar olmaya devam etmektedir. Günümüzde *Salmonella*'nın neden olduğu binlerce ciddi hastalık ve ölüm vakası artan bir şekilde bildirilmektedir. Bu durum önemli bir küresel sağlık ve ekonomik sorun olmaya devam etmektedir (WHO, 2018).

Önemli bir protein kaynağı olan kümes hayvanları insanlarda gıda kaynaklı *Salmonella* infeksiyonlarının odak noktasındadır. *S. Infantis*, kanatlı eti ile ilişkili son yıllarda prevalansı artan non-tifoid bir *Salmonella* serotipidir ve hem kanatlı hayvanlarda hem de insanlarda çeşitli salgınların oluşmasından sorumludur. Günümüzde *Salmonella* Infantis kümes hayvanları ile ilişkili infeksiyonlarda artan prevalansı ile önemli bir kamu endişesi haline gelmektedir. Ayrıca, antimikrobiyal ajanların kontrolsüz kullanımı, artan sıklıkta ortaya çıkan çoklu ilaç dirençli (multi drug resistant - MDR) suşların yayılmasına neden olmaktadır. MDR suşların varlığı, epidemiyolojik bir kriz oluşturabilecek bir tehdittir (Pardo-Este ve ark., 2021).

Günümüzde kanatlı hayvan sürülerinde *Salmonella* prevalansını düşürmek için kullanılan en ekonomik ve etkili yöntem aşılamadır. Ancak kümes hayvanları için canlı ticari aşılar yalnızca *S. Enteritidis*, *Typhimurium* ve *Gallinarum* için mevcuttur. Bu aşılarda diğer *Salmonella* serotiplerine karşı etkinlikleri hakkında çelişkili veriler bulunmaktadır (Mustak ve Yardimci, 2019).

1.1. Taksonomi ve Nomenklatür

Salmonella adını, 1884 yılında domuz bağırsağından bakterinin ilk kez izole edilmesini sağlayan (o zamanki adıyla *Bacillus choleraesuis*) veteriner hekim Daniel E. Salmon'dan almıştır. Bu isim 1900 yılında Lignieres tarafından "*Salmonella choleraesuis*" olarak değiştirilmiştir (Ryan ve ark., 2017).

Günümüzde *Salmonella* cinsine ait iki tür bulunmaktadır. Bunlar *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori*'dir. *Salmonella enterica*, kendi içerisinde romen rakamları ile belirtilen altı alt tür barındırmaktadır. Bu alt türler I (*enterica*), II (*salamae*), IIIa (*arizonae*), IIIb (*diarizonae*), IV (*houtenae*) ve VI (*indica*) olarak isimlendirilmiştir (Switt ve ark., 2009).

Bu alt türlerden *Salmonella enterica* subsp. *enterica* hücrelerinde lipopolisakkarit O-antijeni, flagellar H-antijeni ve kapsüler polisakaritlerin antijenlerini (Vi-antijeni) bulundurur. Bu antijenlerin değişimlerine bağlı olarak oluşan spesifik kombinasyonlar serotipleri (veya serovarları) belirler (Switt ve ark., 2009). O-antijeni *Salmonella* izolatının ait olduğu grubu belirlerken H-antijeni serotipi belirler. Kapsüler antijen sadece *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* (bu antijen *Paratyphi A* veya *B*'de bulunmaz) ve *S. Dublin*'de bulunur (Ryan ve ark., 2017).

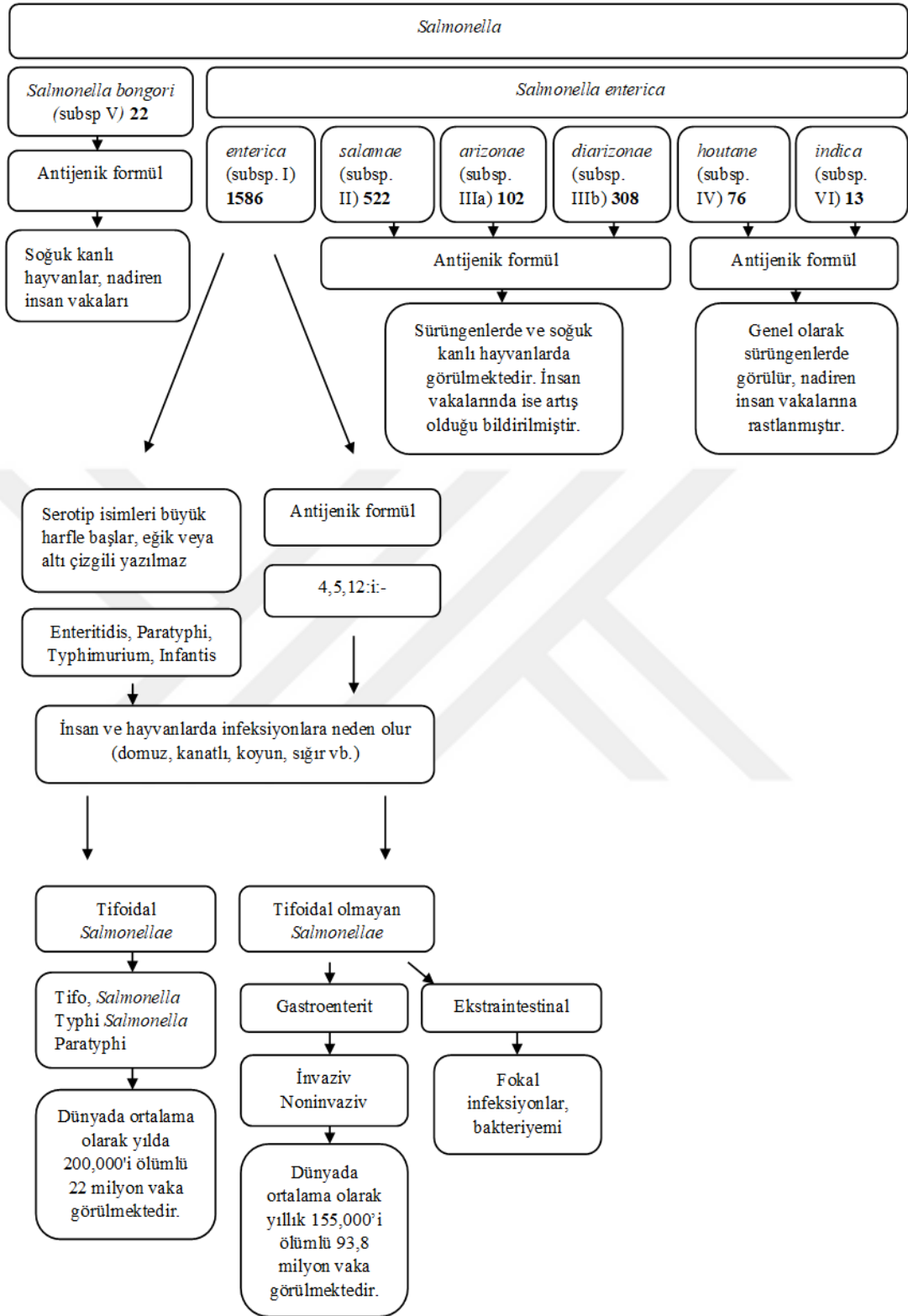
O-antijeni, lipopolisakkaritin dış yüzeyinde bulunan ısıya dayanıklı bir polisakkarittir. Her O-antijeni 5-6 şeker biriminden, bu birimlerdeki varyasyondan, birimler arasındaki kovalent bağlardan ve O-antijeni alt birimleri arasındaki bağlantıdan oluşur. H-antijenleri, flagellin alt birimlerinden oluşur ve bakteri kamçısının filamentli kısmıdır. *Salmonella* serovarları ya bir tip H-antijeni ile monofazik ya da iki tip H-antijeni ile difazik olabilir. *Salmonella* bu açıdan enterik bakteriler arasında benzersizdir. Vi-kapsüler antijeni en yaygın olarak *S. Typhi*'de bulunur, ancak bazen *S. Dublin*, *S. Paratyphi C* ve bazı *Citrobacter* suşlarında da tanımlanır. Spesifik antiserum ile slayt aglütinasyonu, Vi-kapsüler antijeni tanımlamak için kullanılır (Ryan ve ark., 2017).

S. enterica subsp. *enterica*'ya ait serovarlar, genellikle serovarin ilk izole edildiği coğrafi yerle ilgili bir adla belirtilir. Serovar adı italik olmayan Roma harfleriyle yazılır ve ilk harf büyük yazılır. Ayrıca bazı *Salmonella* serotipleri konak spesifik olmaları nedeniyle özel olarak isimlendirilmişlerdir. Bu serotipler; *Salmonella Typhi* (insan), *Salmonella Pullorum* ve *Gallinarum* (kanatlı), *Salmonella Dublin* (sığır), *Salmonella Abortus ovis* (koyun), *Salmonella Abortus equi* (at), *Salmonella Choleraesuis* (domuz) olarak tanımlanmıştır. Diğer alt türlere ait serovarlar, alt tür adının ardından antijenik formülleri ile gösterilir (Şekil 1.1).

Salmonella serovarlarının antijenik form  lleri, White-Kauffmann-Le Minor Şemasında listelenir. Bu listenin güncellenmesi, Dünya Sağlık  rg t  (DSÖ) *Salmonella* Referans ve Araştırma  řbirlięi Merkezi (WHO-Salm) ile Pasteur Enstitüsü sorumluluğundadır (Guibourdenche ve ark., 2010 ve Sariçam, 2017).

White-Kauffmann-Le Minor Şemasında 2.650'den fazla *Salmonella* serotipi tanımlanmıştır (Şekil 1.1) (Issenhuth-Jeanjean ve ark., 2014).





Şekil 1.1. *Salmonella* nomanklatür (Ryan ve ark., 2017)

1.2. Etiyoloji

Salmonella cinsi Enterobacteriaceae familyasından Gram negatif, oksidaz negatif, katalaz pozitif, spor oluşturmeyan çubuk şeklinde bakterilerden oluşmaktadır. Bu bakteriler fakültatif anaeroblardır. *Salmonella* türleri *Salmonella* Gallinarum ve *Salmonella* Pullorum hariç peritrik kamçı yoluyla hareketlidir (Lopes ve ark., 2016).

Salmonella için optimal üreme sıcaklığı 37°C'dir; ancak 2 ile 4°C arasından 54°C'ye kadar üreme gösterebildikleri kaydedilmiştir. *Salmonella* için optimum pH aralığı 6,5-7,5 olmasına karşın daha düşük veya daha yüksek pH'larda (pH 3,8 – pH 9,5 aralığında) yaşayabildikleri gösterilmiştir (Ryan ve ark., 2017). Su aktivitesinin (a_w) 0,94'ten düşük olması *Salmonella* üremesini inhibe eder (Hew ve ark., 2005). Bununla birlikte, belirli sıcaklıklarda düşük bir su aktivitesinin *Salmonella* üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir (Aljarallah ve Adams, 2007). *Salmonella*'nın katı besi yerinde oluşturduğu koloniler yuvarlak, düz kenarlı ve parlaktır (Akan, 2008).

Salmonella'yı tanımlamak için kullanılan biyokimyasal özellikler arasında hidrojen sülfür üretimi, lizin ve ornitin dekarboksilasyonu ve üreyi hidrolize edememeleri (Çizelge 1.1) bulunmaktadır (Ryan ve ark., 2017).

Çizelge 1.1. *Salmonella*'nın biyokimyasal özellikleri.

Biyokimyasal Özellik	Sonuç	Biyokimyasal Özellik	Sonuç
Oksidaz	Negatif	Metil Red	Pozitif
Katalaz	Pozitif	Lizin	Pozitif
H ₂ S	Pozitif	Lizin dekarboksidaz	Pozitif
Glikoz	Pozitif	İndol	Negatif
Sükroz	Negatif	Üre	Negatif
Laktoz	Negatif	Arjinin	Değişken
Beta galaktoz	Negatif	Ornitin	Değişken
O/F	Fakültatif	Sitrat	Değişken

1.3. Epidemiyoloji

Salmonella doğal kaynaklarda yaygın olarak bulunur ve hem insanlarda hem de hayvanlarda çok çeşitli hastalıklara neden olabilir. İnsanlarda *Salmonella* etkenleri tifo, sepsisemi, çeşitli vücut dokularının lokalize enfeksiyonları ve gastroenterit gibi birçok farklı hastalığa yol açar (Ryan ve ark., 2011).

Salmonella enterica subsp. *enterica*'ya ait serotipler; insan ve hayvanlarda, *Salmonella* enfeksiyonlarının (sistemik enfeksiyonlar ve enterit) yaklaşık %99'unu oluşturmaktadır. Bu serotiplerin küçük bir kısmı; belirli hayvan türlerinde ve insanlarda, tifoid salmonellozise sebep olurken; *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium gibi paratifoid serotipler; geniş bir konak spektrumuna sahiptir. Konağın bağırsağına yerleşen ve akut enterit ya da subklinik enfeksiyona yol açabilen bu serotipler aynı zamanda zoonotik öneme sahiptir (Karasova ve ark., 2009).

Salmonella etkenlerinin kanatlı ürünlerine bulaşması; kanatlı etlerinde, dışkı-karkas ve yumurtalarda, dışkı-kabuk yoluyla olmaktadır. İnsanlara bulaşmada özellikle bulaşık yumurta ve tavuk eti tüketimi önemli rol oynamaktadır (Akan, 2008 ve Pardo-Este ve ark., 2021). *Salmonella*'nın kanatlı bağırsağına kolonizasyonu ve yüksek düzeyde dışkıyla saçılımı; özellikle hayvansal gıdaların tüketilmesiyle birlikte insan gıda zincirine girmekte ve insanlarda gastroenteritlere sebep olmaktadır. Bu nedenle kanatlı hayvanlardaki *Salmonella* enfeksiyonları önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Bu durum *Salmonella* enfeksiyonlarını sosyo-ekonomik açıdan önemli bir konuma getirmektedir (Barrow ve ark., June 2010).

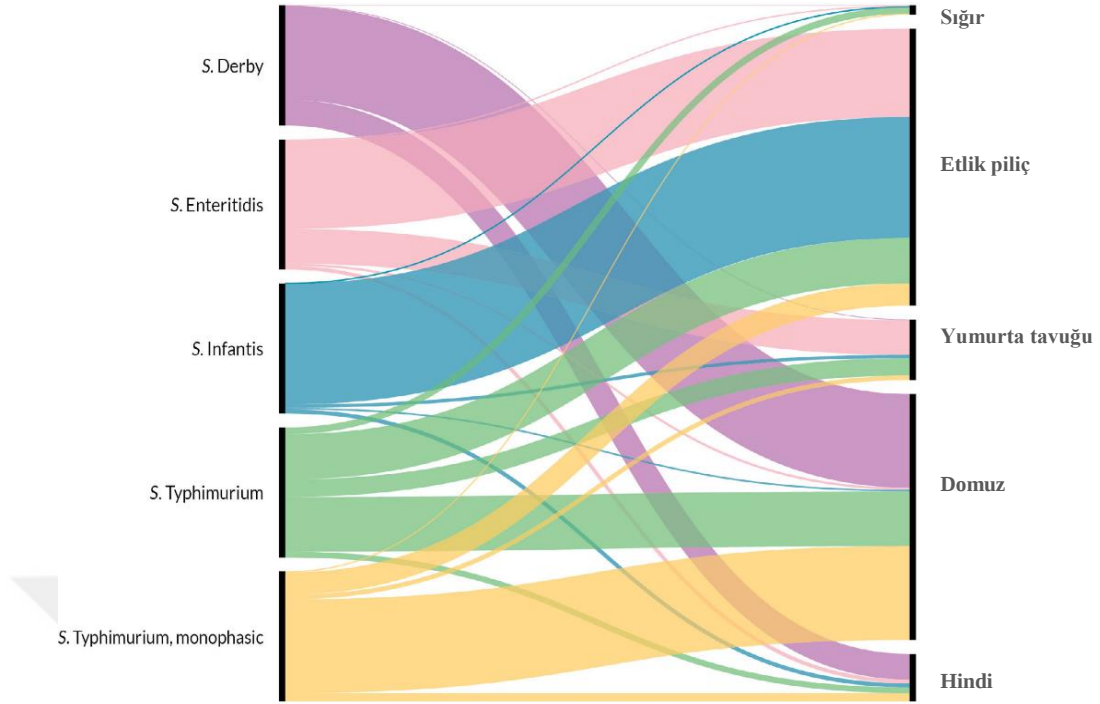
Salmonella enterica serovar Infantis (S. Infantis), Avrupa'da piliç sürülerinde (%45,6) ve piliç etinde (%50,6) en sık görülen serovar olarak rapor edilmiştir ve diğer ülkelerde bulunan damızlık tavuk çiftliklerinde prevalansı artmaktadır. İnsanlarda S. Infantis, Avrupa'da tifoid olmayan *Salmonella* (non-typhoidal *Salmonella* - NTS) insan enfeksiyonlarında en yaygın dördüncü serovar olarak sınıflandırılmıştır (Alba ve ark., 2020 ve Mughini-Gras ve ark., 2021). European Food Safety Authority (EFSA)'nın raporlarına göre en sık karşılaşılan insan

Salmonella serotipleri sırasıyla; *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, monofazik *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:- ve *S. Infantis*'tir. *S. Infantis*'in farklı çevresel kaynaklardan izolasyon oranının artması, bu serotipin önemli düzeyde adaptasyon yeteneğine sahip olduğunu kanıtlar niteliktedir. Bu durum *S. Infantis*'in halk sağlığı açısından yarattığı endişeyi arttırmaktadır (EFSA, 2021).

Son yirmi yılda dünya genelinde yapılan çalışmalar kanatlı hayvanlardan ve insanlardan izole edilen *S. Infantis* suşlarında artan bir antibiyotik dirençliliği olduğunu ortaya koymaktadır (Nogrady ve ark., 2007 ve Asgharpour ve ark., 2014 ve Mughini-Gras ve ark., 2021). Antibiyotiklere karşı çoklu direnç kazanımının en etkili yolu spesifik direnç genlerini barındıran integron, transpozon ya da plazmid gibi mobil genetik elementlerdir. İntegronlar tarafından taşınan direnç genleri konjugatif plazmid ve transpozonlar aracılığıyla diğer komşu bakterilere aktarılabilmektedir. Direnç faktörlerine sahip kanatlı hayvan kökenli *Salmonella Infantis* serotipleri halk sağlığını ciddi düzeyde tehdit etmektedir (Recchia ve Sherratt, 2002).

2001 yılından itibaren Almanya başta olmak üzere tüm Avrupa Birliği üye ülkelerinde yaşanan insan Salmonelloz vakalarından en çok izole edilen ve konağa bağlı olmayan serotip *S. Infantis*'tir. Günümüzde bu serotip Arjantin, Avustralya, Brezilya, Hollanda, Finlandiya, Kanada, Macaristan, Japonya, Yeni Zelanda ve Rusya'da giderek daha fazla rapor edilmektedir (Miller ve ark., 2010).

EFSA'nın 2021 yılında yayınladığı rapora göre etlik piliç çiftliklerinden en çok izole edilen serovarlar ise sırasıyla; *Salmonella Infantis* (%33,6), *Salmonella Enteritidis* (%15,8) ve *Salmonella Mbandaka* (%6,7) şeklindedir. Kanatlı ürünlerinden izole edilen *Salmonella* serotiplerinin prevalansı ile insanlarda görülen salmonelloz vakalarının arasındaki epidemiyolojik bağlantı göz önüne alındığında *Salmonella Infantis*'in önemi daha da artmaktadır (Drauch ve ark., 2021 ve EFSA, 2021). Başta tavuklar olmak üzere kanatlı hayvanlar insanlardaki Salmonelloz vakalarından en çok izole edilen serotip olan *S. Infantis*'in en önemli rezervuarlarıdır (Şekil 1.2) (Antunes ve ark., 2016).



Şekil 1.2. Avrupa Birliği verilerine göre insanlardan izole edilen *Salmonella* serotiplerinin gıda kaynaklarına göre dağılımı (EFSA, 2021).

1.4. Virülans Faktörleri

Salmonella enfeksiyonu iki faktör ile doğrudan ilgilidir. Bunlardan birincisi konağın özellikleri (yaş, genetik ve çevresel faktörler), ikincisi ise bakterinin özellikleri (virülans faktörleri) olarak tanımlanabilir. Klasik *Salmonella* virülans faktörleri; virülans-plazmitler, toksinler, fimbria ve flagella olarak tanımlanmıştır (van Asten ve van Dijk, 2005). *Salmonella* serotiplerinin hayvan ve insanlarda enfeksiyon oluşturma yeteneği; konak savunmasını nötralize eden ve konak savunmasından kaçabilmeyi sağlayan virülans genlerinin kodlama ve eksprese edilmesine bağlıdır. Bakterinin virülans düzeyini ise konağa adaptasyon, hücre içinde çoğalma, ekstraintestinal yayılım ve canlı kalma gibi özellikleri belirlemektedir. Bu virülans özellikler bakterinin kromozomu üzerinde bulunan farklı genler tarafından kodlanmaktadır (Rychlik ve ark., 2006).

Salmonella'nın virülans genlerinin çoğunluğu, “*Salmonella* patojenite adaları” (*Salmonella* pathogenicity islands - SPI) olarak adlandırılan kromozom üzerinde

dağılmış bölgelerde kümelenmiştir. Bu gen kümelerinin, *Salmonella* tarafından diğer türlerden yatay gen transferi yoluyla elde edildiği düşünülmektedir (van Asten ve van Dijk, 2005).

1.4.1. *Salmonella* Patojenite Adaları

SPI; çoğunlukla kromozomlar üzerinde kodlanmıştır. SPI horizontal gen transferi yoluyla elde edilen ve genellikle spesifik virulans fenotipler için gerekli olan virulans genleri taşıyan gen kümeleridir (Ohl ve Miller, 2001). Şu ana kadar tanımlanmış 21 adet SPI (SPA-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21) bulunmaktadır (Çizelge 1.1) (Wisner ve ark., 2012).

Çizelge 1.2. *Salmonella* patojenite adaları (Wisner ve ark., 2012).

SPI	Büyüklik (kb)	Fonksiyonu
SPI-1	40,2	T3SS – Bağırsak epiteline invazyon
SPI-2	39,8	T3SS – Bağırsak epitel hücrelerinin ve makrofajların içinde canlı kalabilme yeteneği, farelerde sistemik enfeksiyon,
SPI-3	16,6	T5SS – Makrofajlar içerisinde canlı kalabilme, <i>S. Typhimurium</i> 'un farelerde, buzağılarda ve civcivlerde enfeksiyon oluşturmalarını sağlama. SPI-1 ile çalışır.
SPI-4	25,0	SPI-1 T3SS ile bağlantılı olarak epitel hücrelerine giriş.
SPI-5	6,6	Sığırlarda <i>S. Dublin</i> kaynaklı enteritis Civcivlerde <i>S. Typhimurium</i> sistemik enfeksiyonu
SPI-6	17,6	<i>S. Enteritidis</i> 'te bulunmayan bir T6SS ve <i>tcp</i> fimbrial operonudur. <i>S. Enteritidis</i> dışındaki serotiplerde 44 kb'a kadar çıkabilir.
SPI-7	Bilinmiyor	Sadece <i>S. Typhi</i> , <i>S. Paratyphi</i> ve bazı <i>S. Dublin</i> suşlarında bulunur. Bilinen en büyük patojenite adasıdır. 134 kb'a kadar bulunabilir. Bakterisinelere karşı direnç sağlar.
SPI-8	Bilinmiyor	<i>S. Enteritidis</i> and <i>S. Typhimurium</i> 'da bulunmaz.
SPI-9	16,3	T1SS
SPI-10	10	<i>S. Enteritidis</i> 'de <i>Sef</i> fimbrial operonudur.
SPI-11	6,7	<i>S. Typhimurium</i> 'un makrofajlar içerisinde canlı kalabilme yeteneği ile ilişkilidir.
SPI-12	5,8	Farelerde <i>S. Typhimurium</i> virülansı için önemlidir.
SPI-13	25,3	Farelerde <i>S. Typhimurium</i> sistemik enfeksiyon oluşturmaları ile ilgilidir.
SPI-14	6,8	Elektron transferi ve düzenleyici genlerden sorumludur.
SPI-15	Bilinmiyor	<i>S. Enteritidis</i> veya <i>S. Typhimurium</i> 'da bulunmaz.
SPI-16	3,3	LPS modifikasyonundan sorumludur.
SPI-17	3,6	LPS modifikasyonundan sorumludur. <i>S. Enteritidis</i> veya <i>S. Typhi</i> 'de bulunur ancak <i>S. Typhimurium</i> 'da bulunmaz.
SPI-18	Bilinmiyor	<i>S. Typhi</i> 'de sitolizin için gerekli <i>HlyE</i> ve invazyon için gerekli olan <i>TaiE</i> genlerini kodlar.
SPI-19	14,1	T6SS'ni kodlar ancak <i>S. Enteritidis</i> 'te işlevsizdir.
SPI-20	Bilinmiyor	T6SS ile ilişkilidir. Sadece <i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> içerisinde identifiye edilmiştir (34 kb).
SPI-21	Bilinmiyor	T6SS ile ilişkilidir. Sadece <i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> içerisinde identifiye edilmiştir (55 kb).

SPA-1 üzerinde kodlanan genler genellikle intestinal çevreye benzeyen bir ortam oluştuğunda eksprese olmaktadır. *Salmonella* serotipleri hücre içersine girdiğinde ise baskılanmaktadır. Bu genler; SPA-1'den kodlanan *HilA*, *HilC*, *HilD*, *InvF* ve *SprB* olarak tanımlanan 5 regülatör tarafından kontrol edilmektedir. SPA-1 regülatörleri aynı zamanda SPA-2 genlerini de düzenlemektedir. SPA-1 ve SPA-2, tip III sekresyon sistemini (T3SS) kodlamakta ve 40-kb'lık bir DNA bölgesinden oluşmaktadır. T3SS, direkt olarak konak hücre ya da çevresine, hücresel fonksiyonları değiştirecek virulans faktörleri transfer etmektedir (Valdez ve ark., 2009).

SPA-1 içerisinde T3SS-1 aracılığıyla transfer edilen *invA*, *invB*, *invC*, *invF*, *invG*, *hila*, *sipA*, *sipC*, *sipD*, *spar*, *orgA*, *sopB* ve *sopE* genleri kodlanır (Siriken, 2013). Bu genler fagositik ya da non-fagositik hücrelere invazyondan sorumludur (Giacomodonato ve ark., 2007). Bunun yanı sıra T3SS-2 sayesinde aktarılan *SseF*, *SseG*, *SifA*, *PipB2*, *SopD2*, *SseJ*, *SseL* gibi yaklaşık 30 farklı efektör protein ise bakterinin internalizasyonundan, vakuollerin oluşmasından ve konak hücrede çoğalmadan sorumludur (Figueira ve Holden, 2012).

InvG T3SS'nin protein sekresyonunu düzenleyen ve bakterinin hücre içine alınmasında kritik rol oynayan ve dış membran proteinlerini kodlayan gendir. SPA-1 içerisinde kodlanan *invH* ise aksesuar proteindir. *InvH* bakterinin adhezyonunda rol almasının yanı sıra *invG* geni ile birlikte çalışır (Daefler ve Russel, 1998 ve Siriken, 2013).

1.4.1.1. *invH* Geni

invH geni, T3SS'de bulunan invazyon kompleksinin önemli bir parçasıdır. Bakterinin hücreye etkili bir şekilde tutunması ve epitel hücrelerine giriş için *invH* geninin rolü çok önemlidir. *invH* geni non-fimbriyal adhezinleri kodlayarak, intestinal yüzeyin tanınmasını sağlar. Bu şekilde *Salmonella* bakterilerinin konağa adaptasyonunu kolaylaştırır. *invH* geni *Salmonella* sbsp. *arizonae* dışında, tüm *Salmonella* suşlarında bulunur. *Yersinia*, *Shigella*, *Proteus* ile enteroinvaziv ve

enteropatojenik *Escherichia coli* suşlarında ise bu tip hiçbir homolog dizi tespit edilmemiştir (Dehghani ve ark., 2013 ve Sever, 2017).

invH geni hücrede dış membran lipoproteini olarak bulunur ve *invG* geninin sitoplazmadan dış membran üzerine geçebilmesini sağlar. Buzağılar üzerinde yapılan çalışmalarda *invH* geninde oluşturulan mutasyonların enteriti azalttığı gösterilmiştir. Ancak yine de *invH* geninin T3SS-1 ile ilişkili hücre manüplasyonlarında oynadığı rol tam olarak anlaşılamamıştır (Pati ve ark., 2013). Ancak *invH* geninin T3SS çalışmasında esansiyel bir role sahip olmasının yanı sıra *invH* ve *invG* arasındaki etkileşimin pilotin-sekretin gözeneklerini bir araya gelmesini sağlayan mekanizmalardan sorumlu olduğu bilinmektedir (Majewski ve ark., 2021).

Ayrıca *invH* geninin yokluğunda konak hücre membranının dışa doğru genişlemesini sağlamakla görevli olan *sipC* efektör proteinin *Salmonella* tarafından üretilmediği gösterilmiştir (Daefler ve Russel, 1998 ve Sever, 2017).

1.5. *Salmonella* Aşıları

Aşılar, ilaçlara dirençli patojenlerin neden olduğu hastalıkların insidansının arttığı günümüzde, antibiyotikler, antiviral veya antiparazit ilaçlar ile karşılaştırıldığında bulaşıcı hastalıklarla mücadelede daha verimli ve daha ekonomik bir yaklaşım sağlar (Clark-Curtiss ve Curtiss, 2018). İdeal bir aşı güvenli, çapraz koruyuculuk sağlayan, iyi tanımlanmış ve *Salmonella* enfeksiyonunun kontrolü için hücresel bağışıklığı indükleyeci olmalıdır (Barrow, 2007).

Tavukların aşılınması, kanatlı sürülerindeki *Salmonella* yükünün azaltılması için *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı tavukların bağışıklık sistemini aktif hale getirmeyi amaçlar. Günümüzde *Salmonella* aşıları canlı atenüe aşılar, inaktive aşılar ve subünit aşılar olmak üzere üç kategoriye ayrılır (Desin ve ark., 2013).

Canlı atenüe aşı suşları yumurtacı sürülerde yaygın olarak kullanılırken, inaktive aşının damızlık sürülerde kullanımı daha yaygındır. Etlik piliç sürüleri

genellikle *Salmonella*'ya karşı aşılınmaz. Piyasada bulunan kanatlı hayvan aşıları çoğunlukla *Salmonella* Enteritidis ve Typhimurium suşlarına dayanmaktadır. Serogrup C suşlarına karşı aşılarda kullanımı sınırlıdır. Cıvıçlar yumurtadan çıktıktan hemen sonra canlı aşı uygulaması yapıldığında, aynı serotiplere karşı 24 saat içerisinde barsak kolonizasyonundan korunurlar. Buna kolonizasyon-inhibisyon adı verilir. Bu erken koruma, etlik piliçler de dahil olmak üzere tüm kanatlı üretim türlerinde faydalıdır (Eeckhaut ve ark., 2018).

Canlı atenüe *Salmonella* aşıları bakterinin virölans, metabolizma veya hücre içerisinde canlı kalabilme özelliklerini kodlayan esansiyel genlerin mutasyona uğratılmaları veya silinmeleri yoluyla elde edilir. Oral yolla uygulanabilme bu aşıların önemli avantajlarından. Bu aşılar organizmada antikor yanıtı oluşturdukları gibi hücresel immün yanıt da oluşturur (Nandre ve ark., 2015). Canlı attenüe aşıların en büyük dezavantajı, canlı suşun tavuklarda ve çevrelerinde uzun süre kalabilmesi yoluyla insan sağlığına potansiyel bir tehdit oluşturmalarıdır. Ancak bu durum aynı zamanda bir avantaj sağlayabilir. Bireysel aşılanmanın bir seçenek olmadığı durumlarda horizontal bulaşma yoluyla sürünün bağışıklık kazanması sağlanabilir. Canlı atenüe aşıların diğer dezavantajları, tekrar virölans özellik kazanabilme ihtimalleri ve *Salmonella* test prosedürlerinde hatalı sonuçlara neden olabilmeleri olarak sıralanabilir. Günümüzde birçok canlı *Salmonella* aşı suşu, farklı derecelerde başarı ile test edilmiştir (Desin ve ark., 2013).

İnaktif aşılar formalin, ısı veya aseton kullanımı gibi farklı yöntemlerle bakteri suşlarının inaktive edilmesi ile oluşturulur. İnaktif *Salmonella* aşıları kas içinden veya deri altından uygulanır. Bu aşıların iyi bir bağışıklık sağlaması için en az iki doz uygulama gerekmektedir. İnaktif aşıların en büyük avantajı insan sağlığı için risk oluşturmamalarıdır. Aynı zamanda bu aşıların güçlü antikor tepkileri verdiği gösterilmiştir. Ancak inaktive aşılar, bakterinin tüm antijen repertuarına sahip olan canlı atenüe aşıların aksine, kısa bir süre içinde konakçı tarafından elimine edilebilir. Bununla birlikte inaktif aşıların verimli olabilmesi için adjuvant kullanımı şarttır. Bu durum aşının kullanım yollarını sınırlayıcıdır (Barrow, 2007 ve Gast, 2007).

Subünit aşılar genellikle bakteri hücre yüzeyinde bulunan antijenik yapıların bir veya birçoğundan oluşur. Bu yapılar proteinlerden oluşmaktadır. Aşı için seçilen antijenik yapılar bakterinin önemli virülans özelliklerine sahiptir. Subünit aşılar kas içi veya deri altı yolla uygulanır. Ancak uygun şekilde formüle edilen subünit aşılar mukozal bağışıklık sağlamak için ağızdan verilebilir. İnaktif aşılar gibi, bu tip aşılar da diğer canlı organizmalarla ilişkili biyolojik komplikasyon riski taşımaz. Bu avantajlarına karşın subünit aşılar çoğunlukla zayıf immünojenik özelliktedir. Uygun adjuvanlar ile formüle edilmeleri gereklidir (Mutwiri ve ark., 2011 ve Desin ve ark., 2013).

Günümüzde artmaya devam eden *Salmonella* infeksiyonlarına karşı korunmada aşılama en etkili ve ekonomik araçtır (Varmuzova ve ark., 2016). Mevcut olan *Salmonella* aşılardan daha etkili ve daha güvenli *Salmonella* aşılarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. *Salmonella* virulensinin genetiği hakkında elde edilen bilgiler ve modern rekombinant DNA teknolojisi mutant aşı suşlarının geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır (Günaydın, 2008). Başta civcivlerde olmak üzere canlı attenüe *Salmonella* aşılarının *Salmonella*'nın kolonizasyon ve inhibisyonunu azaltmakta oldukça başarılı olduğu bildirilmektedir (Kaya, 2017).

Yukarıda verilen bilgiler ışığında bu tez çalışmasında etlik piliç sürülerinde en çok karşılaşılan *Salmonella* serotipi olan *Salmonella* Infantis suşunun konak hücreye invazyonunu düzenleyen genlerden *invH* geni Lambda Red rekombinasyon yöntemi ile susturularak aşı adayı canlı mutant *Salmonella* Infantis suşu elde edilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Bakteri Suşları

Çalışmada Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonunda bulunan ve daha önce farklı yetiştirme tipine sahip kanatlı kümeslerinden altlık, toz, çevresel kaynaklardan ve kesimhane karkas örneklerinden izole edilen 50 adet *Salmonella* Infantis suşu kullanıldı.

2.1.2. Besiyerleri

- **Luria Bertani Agar/Broth (LB):** HiMedia® M1245
- **S.O.C Medium:** Condalab® CN: 2019
- **Nutrient Agar (NA):** Oxoid™
- **Mueller-Hinton Agar (MH):** Oxoid™
- **Mac Conkey Agar (MC):** Oxoid™
- **Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD agar):** Oxoid™
- **Tryptic Soy Broth (TSB):** Sigma-Aldrich®

2.1.3. Antiserumlar

- **Salmonella Antisera:** Statens Serum Institut Diagnostica
- **Salmonella Antisera:** Denka Seiken™
- **Salmonella Antisera:** BioRad

2.1.4. Antibiyotik Diskleri ve Suplementleri

- **Ampisilin Suplement:** Liofilchem® - MTS™ A
- **Kanamisin Suplement:** Liofilchem® - MTS™ A
- **Ampisilin Disk:** AML25 Oxoid™
- **Gentamisin Disk:** GN10 Oxoid™
- **Streptomisin Disk:** S10 Oxoid™
- **Siprofloksasin Disk:** CIP10 Oxoid™
- **Kloramfenikol Disk:** C30 Oxoid™
- **Sülfametoksazol Disk:** RL100 Oxoid™
- **Trimetoprim Disk:** W5 Oxoid™
- **Tetrasiklin Disk:** TE30 Oxoid™

2.1.5. Biyokimyasal ve Moleküler Kitler

- **Biyokimyasal İdentifikasyon Kiti:** Microgen® GnA-ID (MID-64CE)
- **Lambda Red Rekombinasyon Kiti:** Gene Bridges Quick and Easy E. coli Gene Deletion Kit K006
- **DNA Ekstraksiyon Kiti:** GeneJET Genomic DNA Purification Kit K0721 Thermo Fisher Scientific™
- **DNA Saflaştırma Kiti:** GeneJET PCR Purification Kit K0701 Thermo Fisher Scientific™

2.1.6. Kimyasal Maddeler

- **Gliserol:** Isolab %99 Glycerol Isolab 56-81-5
- **Loading Dye:** 6X TriTrack, Thermo Fisher Scientific™
- **DNA Ladder:** GeneRuler 100bp Plus, SM0321
- **Agaroz:** Prona, Biomax

- **TBE:** 10X TBE HiMedia®
- **PCR Master Mix:** Thermo Fisher Scientific™
- **SafeView:** SafeView™ Classic ABM G108
- **L-Arabinose:** Sigma-Aldrich®

2.1.7. Laboratuvar Ekipmanları

- **Biyolojik güvenlik kabini:** Class II, Safety Cabinet Thermo Scientific™, USA ve Safe 2020 Laminar Flow
- **DNA thermal cycler:** Thermo Scientific™ ARKTIK Thermocycler, USA
- **Elektroporator:** Bio-Rad Micropulser Elektroporator
- **İnkübatör:** Nüve N500 İnkübatör
- **Çalkalamalı inkübatör:** Enviromental Shaker ES-20, HVD Life Sciences
- **Dansitometre:** Grant Bio DEN-1 McFarland Densitometer
- **Spektrofotometre:** ND-1000 (NanoDrop) Thermo Scientific™, USA
- **Hassas terazi:** Scaltec, SBC41, Germany
- **Santrifüj:** Micro CL21, Thermo Scientific™, USA
- **Soğutmalı Santrifüj:** Hermle Z446K
- **Vorteks:** Thermo Scientific, USA
- **Jel elektroforez ünitesi:** Thermo Scientific™ Thermo Owl A2 Large Gel System
- **Bilgisayarlı görüntüleme sistemi:** Gene Genius, Syngene, Bio Imaging System, USA
- **Pipetler:** Thermo Scientific (Finnpipette F1) (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
- **Küvetler:** Bio-Rad Gene Pulser (Mikropulser Elektroporasyon Küveti, 0,1 cm)

2.1.8. Primerler ve Plazmidler

Bu çalışmada kullanılan primerler Primer 3 programı kullanılarak tasarlanmıştır.

Kasetin oluşturulması için tasarlanan primerler:

- F 5'
ATATGAAAAATTTTATAGCTGTATTCCTGTCTTTTACTGATCGGCTG
AATTAACCCTCACTAAAGGGCG '3
- R 5'
CGGTCATGAGTTGCTCTTCATCTTCTTTTGAACGCATGTATTGTGGAT
GTAATACGACTCACTATAGGGCTC '3

Mutasyonun doğrulanması için tasarlanan primerler:

- F 5' GTGTAAAAACATTGCGCCTC '3
- R 5' GTTCAGCCAACGGTGATATG '3

Bu çalışmada kullanılan plazmidler;

- *pKD46- λRed*
- *pKD4-Kanamisin*

2.2. Yöntem

2.2.1. Kullanılacak Suşun Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında kullanılacak olan *Salmonella* Infantis suşlarının belirlenmesi için; *Salmonella* izolasyon ve identifikasyonunda standart bir yöntem olan ISO 6579 prosedürü kullanıldı (ISO-6579, 2002). Bakterilerin yüzey (LPS, O-antijenleri) ve flagella antijenlerinin (protein, H-antijenleri) tespiti için

serotiplendirme yapıldı. Elde edilen antijenik kombinasyonlar Kauffmann-White Şemasına göre değerlendirildi.

Serotiplendirilmesi tamamlanan *Salmonella* Infantis suşlarının çalışmaya uygunluğunu belirlemek için EUCAST Disk Difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyotik duyarlılıkları belirlendi (EUCAST, 2020). Ampisilin ve kanamisine karşı duyarlı olan suşlar arasından ribotiplendirme kütüphanesinde en çok ribopatemi olan suş tez çalışmasında kullanılmak için seçildi.

2.2.2. Hedeflenen Gen Bölgesine Uygun Oligonükleotidlerin Tasarlanması

PCR amplifikasyonuna uygun olarak oluşturulan oligonükleotidler iki kısımdan oluşacak şekilde tasarlandı. Bunlardan birincisi hedef molekül ve lineer molekül tarafından paylaşılan homoloji bölgesini kapsayan, ikincisi ise seçici marker bölgesinin PCR amplifikasyonuna hazır hale gelmesini sağlayan bölgelerdi.

Hedeflenen bölgenin ters okuma yönünün 5' ucundan itibaren 50 nükleotid seçildi. Bu oligonun 3' ucuna ise *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinin amplifikasyonu için gerekli olan “-AATTAACCCTCACTAAAGGGCG -3' ” dizisi eklendi. Reverse komplementi oluşturmak için 3' ucundan itibaren 50 nükleotid seçildi. Bu oligonun 3' ucuna ise *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinin amplifikasyonu için gerekli olan “-TAATACGACTCACTATAGGGCTC -3' ” dizisi eklendi.

2.2.3. Uygun Besiyeri ve Solüsyonların Hazırlanması

2.2.3.1. Selektif LB Hazırlanması

Selektif LB besiyeri hazırlamak için 1 L LB solüsyonuna 15 g agar eklendi. Karışım otoklavlandı. Otoklavlama işlemi sona erdikten sonra çözelti sıcaklığı yaklaşık 50°C iken antibiyotik çözeltileri eklendi ve petri kaplarına döküldü.

Selektif LB besiyerinin hazırlanması için antibiyotik çözeltileri aşağıda belirtildiği oranda hazırlandı.

- Ampisilin stok solüsyonu 100 mg/ml oranında %50'lik etanol içerisinde çözündürüldü. Çalışma konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde hesaplandı.
- Kanamisin stok solüsyonu c = 30 mg/ml oranında ddH₂O içerisinde çözündürüldü. Çalışma konsantrasyonu 15 µg/ml olacak şekilde hesaplandı.

2.2.3.2. L-arabinoz Stok Solüsyonun Hazırlanması

25 ml'lik tüpler içerisinde ddH₂O ile %10'luk L-arabinoz solüsyonları hazırlandı. L-arabinoz solüsyonları hazırlandıktan hemen sonra -20°C'de dondurulmuş olarak saklandı.

pRedET rekombinasyon protein ekspresyonunun uyarılması için 1.4 ml LB başına 50 µg L-arabinoz stok solüsyonu kullanıldı. Üç defadan fazla dondurulup çözödürülen L-arabinoz solüsyonları tekrar kullanılmadı.

2.2.4. Homoloji Kollarına Uygun Kaset Hazırlanması

Oligonükleotidler 10 µM konsantrasyonda olacak şekilde ddH₂O içerisinde çözödürüldü.

50 µl PCR reaksiyonu için aşağıda verilen şekilde PCR karışımı hazırlandı.

- 34,5 µl - dH₂O
- 10 µl - 5X PCR buffer
- 2 µl - 5 mM dNTP
- 1 µl - upper oligonükleotid
- 1 µl - lower oligonükleotid
- 0,5 µl - fusion polimerase

PCR işlemi sırasında primerlerin hedeflenen bölgeye bağlanması için optimal sıcaklık 57°C – 62°C olarak belirlendi. PCR profili;

- 98°C – 30 sn
- 98°C – 30 sn
- 57°C – 30 sn
- 72°C – 90 sn
- 72°C – 10 dk

ve 30 döngü olacak şekilde ayarlandı.

PCR'nin başarılı olduğundan emin olmak için elektroforez jel üzerinde 5 µl PCR ürünü kontrol edildi. Elde edilen PCR ürünü DNA konsantrasyonu 100-400 ng/µl olacak şekilde ayarlandı.

2.2.5. *Salmonella* Infantis'in *pRedET* Plazmidi ile Transformasyonu

Seçilen *Salmonella* Infantis suşundan tek koloniler elde etmek için selektif LB agara ekim yapıldı. Yapılan ekim sonunda 1-2 koloni seçilerek 1 ml LB içeren tüplere inoküle edildi. Çalkalamalı etüv içerisinde 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

Bir sonraki aşamaya geçebilmek için %10'luk gliserol çözeltisi ve elektroporasyon kuvvetleri buz üzerinde yaklaşık 2 saat soğutuldu. Santrifüj sıcaklığı 2°C'ye ayarlandı.

Gece boyu inkübasyona bırakılan taze kültürden 30 µl alınarak 1,4 ml LB besiyeri içeren mikrosantrifüj tüpü içerisine inoküle edildi. Mikrosantrifüj tüpü 1000 rpm hızda ve 37°C'de yaklaşık 2 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkube edilen bakteri hücrelerini elektroporasyona hazırlamak için inkübasyona bırakılan mikrosantrifüj tüpü daha önceden soğutulmuş santrifüj

içerisinde 11,000 rpm hızda santrifüj edildi. Elde edilen üründen süpernatant hızlıca uzaklaştırıldı ve pelet kısım buz üzerine konuldu. Soğutulmuş 1 ml ddH₂O eklenerek pipetleme işlemi yapıldı. Hazırlanan süspansiyon çözelti ile santrifüj işlemi tekrarlandı. Tüpte 20 µl ila 30 µl kalacak şekilde süpernatant bir kez daha atıldı ve tüp buz üzerinde bekletildi.

Hazırlanan hücre peletine Red/ET rekombinasyon protein ekspresyon plazmidini olan pRedET'ten 1 µl eklendi ve karıştırıldı. Buz üzerinde tutulan tüpte bulunan süspansiyon soğutulmuş elektroporasyon kuvvetine aktarıldı. Elektroporator 1350 V ve 5 ms pulse olacak şekilde ayarlandı ve elektroporasyon işlemi gerçekleştirildi.

Elektropore edilmiş hücreler antibiyotiksiz 1 ml LB besiyerine ekildi. 1000 rpm'e ayarlanan çalkalamalı etüvde 70 dakika 30°C'de (*pRedET* plazmidini 37°C'de inaktiveolacağı için) inkübe edildi.

İnkübasyon süresinin sonunda öze ile *pRedET* plazmidine bağlı olarak hazırlanan ampicilin (50 µg/ml) içeren LB agar üzerine 100 µl ekim yapılarak 30°C'de inkübe edilerek gece boyu üremeye bırakıldı.

2.2.6. Hedeflenen Kromozomal DNA Bölgesinin Kesilmesi

Kromozom üzerindeki DNA parçasının kesilmesi için kullanılacak homoloji *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kaseti hazırlandı.

Bir önceki basamakta hazırlanan ve antibiyotikli LB agar üzerinde üremeye bırakılan bakterilerden 1 koloni alınarak mikrosantrifüj tüpü içerisinde 1 ml LB antibiyotikli besiyerine ekim yapıldı ve 30°C'de 24 saat inkübe edildi.

Bir sonraki aşamaya geçebilmek için %10'luk gliserol çözeltisi ve elektroporasyon kuvvetleri buz üzerinde yaklaşık 2 saat soğutuldu. Santrifüj sıcaklığı 2°C'ye ayarlandı. Bir önceki adımda olduğu gibi 1,4 ml antibiyotikli LB besiyeri içeren kapaklı mikrosantrifüj tüpleri hazırlandı. Bir gece önce inkübasyona bırakılan

kültürden 30 µl alınarak inoküle edildi ve 30°C'de 1100 rpm hızda çalkalamalı olacak şekilde yaklaşık 2 saat inkübe edildi.

İki saat inkübasyon sonucunda tüpe 50 µl %10 L-arabinoz eklendi ve %0,3-%0,4'lük bir son konsantrasyon elde edildi. L-arabinoz, Red/ET rekombinasyon proteinlerinin eksprese olmasının indüklenmesini sağladı. Elde edilen ürün 37°C'de 45 dakika çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı.

Bakteri hücrelerinin elektroporasyona hazırlanması için 2°C'ye soğutulmuş bir santrifüjünde 11.000 rpm'de 30 saniye santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Oluşan süpernatant hızla uzaklaştırıldı ve tüp buz içerisine koyuldu. 1 ml soğutulmuş ddH₂O eklenerek pipetleme ile karıştırıldı. Pipetleme işleminden sonra santrifüj tekrarlanarak bakteri hücreleri yeniden süspanse edildi. Santrifüj sonucunda tüpte yaklaşık 20 µl ila 30 µl arasında ürün kalacak şekilde oluşan süpernatant bir kez daha atıldı. Mikrosantrifüj tüpü buz üzerinde tutuldu.

Hazırlanan lineer *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* parçasından 2 µl eklendi ve pipetleme ile karıştırıldı. Karışım önceden soğutulmuş elektroporasyon küvetlerine aktarıldı. Elektroporator 1350 V, 10 µF, 600 Ohms şeklinde ayarlandı ve elektroporasyon işlemi gerçekleştirildi. Elektroporasyon işlemi gerçekleştirilen küvete antibiyotik içermeyen 1 ml LB besiyeri eklendi ve pipetleyerek karıştırıldı. Küvet içerisinde elde edilen karışım mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 37°C'de çalkalamalı etüvde 3 saat inkübe edildi. Rekombinasyonun bu aşamada gerçekleşmesi hedeflendi.

İnkübasyon aşamasından sonra 30 sn boyunca santrifüj edilen üründen 900 µl süpernatant atıldı. Elde edilen bakteri hücreleri kanamisin (15 µg/ml) içeren LB agar üzerine ekildi. Agar gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

2.2.7. Gen Delesyonunun Doğrulanması

Gen delesyonunun doğrulanması için elde edilen koloniler PCR ile analiz edildi. Besi yeri üzerinden tek bir koloni seçildi. DNA ekstraksiyonu için Thermo Scientific™ GeneJET Genomic DNA Purification Kiti kullanıldı. Yöntem olarak kit prosedürü içerisinde bulunan Gram negatif bakteriler için DNA saflaştırma protokolü kullanıldı.

DNA ekstraksiyonundan sonra amplifikasyon, elektroforez ve görüntüleme olmak üzere üç aşamada gen delesyonu doğrulaması yapıldı. PCR karışımı aşağıda belirtilen oranlar ile son hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı.

- 14,8 µl nuclease free water
- 2,5 µl 10 x PCR buffer solution
- 3 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,5 µl dNTP (10 mM)
- 1 µl forward primer (10 pmol)
- 1 µl reverse primer (10 pmol)
- 0,2 µl Taq DNA polymerase

Elde edilen PCR karışımından her bir tüpe 23 µl dağıtıldı ve her birine 2 µl örnek DNA eklendi. PCR profili;

- 95°C – 3 dk
- 94°C – 30 sn
- 64°C – 1 dk
- 72°C – 90 sn
- 72°C – 10 dk

ve 35 döngü olacak şekilde ayarlandı.

PCR uygulaması sonucunda oluşan amplifikasyon ürünlerinin her birinden 5 µl alındı. 6X Loading Dye solüsyonundan 2 µl eklenerek karıştırıldı ve %1,5 agaroz içeren jele yüklendi. Jeldeki birinci göze 5 µl DNA marker konularak 180 voltta 60 dk elektroforez işlemi uygulandı. Syngene Biyo-Görüntüleme sistemi kullanılarak jeldeki örnekler görüntülendi.

2.2.8. *pRedET* Plazmidinin Mutant *Salmonella* *Infantis* Suşundan Çıkarılması

pRedET plazmidi *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinin transformasyonundan sonra 37°C’de gerçekleştirilen inkübasyon işlemlerinde kopyalanamayacak şekilde tasarlanmıştır. Bu nedenle *pRedET* plazmidinin *S. Infantis* suşu içerisinde çıkarılması için elde edilen bakteri kolonileri 50 µg/mL ampisilin içeren LB agar üzerinde 37°C’de 24 saat inkübe edildi. Antibiyotik dirençliliğinin ortadan kalkması nedeniyle mutant bakterilerin bu inkübasyon sonucunda üreme göstermemesi hedeflendi.

2.2.9. Mutant Bakterinin Değerlendirilmesi

Elde edilen mutant *Salmonella* *Infantis* suşunun fenotipik özelliklerinin değerlendirilmesi ve saha suşu ile karşılaştırılması için koloni morfolojisi, biyokimyasal test analizleri, hareket muayenesi ve antibiyotik direnç profilleri incelendi.

Koloni morfolojisinin incelenmesi için genel besiyerleri olan kanlı agar ve NA kullanıldı.

Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için Microgen® GnA-ID Biyokimyasal İdentifikasyon kiti kullanıldı. Microgen® GnA-ID Biyokimyasal İdentifikasyon kiti içerisinde bulunan GN-A paneli protokolü kullanılarak biyokimyasal testler gerçekleştirildi.

Oluşturulan mutant bakterinin hareket özelliklerinde herhangi bir değişiklik gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi amacıyla TSB yarı katı besi yeri hazırlandı ve iğne uçlu öze yardımıyla hazırlanan besiyerinin orta hattından olacak şekilde ekim yapıldı. Hareket muayenesinin yapılması için 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

Antibiyotik direnç profillinde meydana gelmesi muhtemel değişikliklerin belirlenmesi için parantez içinde belirtilen konsantrasyonlarda Oxoid marka Ampisilin (25 µg), Streptomisin (10 µg), Siprofloksasin (10 µg), Gentamisin (10 µg), Kloramfenikol (30 µg), Sülfametoksazol (100 µg), Trimetoprim (5 µg), ve Tetrasiklin (30 µg) antibiyotik diskleri kullanılarak Mueller-Hinton agara ekim yapılarak EUCAST 2020 kriterlerine uygun olacak şekilde disk difüzyon yöntemi kullanıldı (EUCAST, 2020).

LB medium besiyerinde 1 gece boyunca inkübasyona bırakılan bakterilerin, serum fizyolojik içinde, McFarland tüp №: 0,5 bulanıklık standardında olacak şekilde inokulumu hazırlandı. Hazırlanan inokulum McFarland 0,5 dansitometre (Grant Bio DEN-1 McFarland Densitometer) ile ölçüldü. Hazırlanan inokulumdan MH agar plaklarına üç yönde olacak şekilde yayma ekim yapıldı. Antibiyotik diskleri agarlara yerleştirilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı.

Çizelge 2.1. Kullanılan antibiyotik ajanlar.

Antibiyotik	Disk	Zon Çapı		
		R	I	S
Ampisilin	AML25 µg	≤13	14-16	≥17
Gentamisin	GN10 µg	≤12	13-14	≥15
Streptomisin	S10 µg	≤11	12-14	≥15
Siprofloksasin	CIP10 µg	≤15	16-20	≥21
Kloramfenikol	C30 µg	≤12	13-17	≥18
Sülfametoksazol	RL100 µg	≤12	13-16	≥17
Trimetoprim	W5 µg	≤10	11-15	≥16
Tetrasiklin	TE30 µg	≤11	12-14	≥15

3. BULGULAR

3.1. Kullanılacak *Salmonella* Infantis Suşunun Belirlenmesine Ait Bulgular

3.1.1. Biyokimyasal ve Serolojik Analizlere Ait Bulguları

Bu tez çalışmasında kullanılacak olan suşun belirlenmesi için; Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonunda bulunan 50 adet *Salmonella* Infantis suşu canlandırıldı. ISO 6579 prosedürü kullanılarak bakterilerin yüzey (LPS, O-antijenleri) ve flagella antijenlerinin (protein, H-antijenleri) tespiti için serotiplendirme yapıldı. Serotiplendirme sonucunda suşların White-Kauffmann-Le Minor şemasında Grup O:7 (C₁) içerisinde olduğu tespit edildi. *Salmonella* suşlarının antijenik formülasyonu “6,7:r:1,5” olarak doğrulandı.

Serotiplendirilmesi tamamlanan *Salmonella* Infantis suşlarının çalışmaya uygunluğunu belirlemek için EUCAST Disk Difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenen antibiyotik duyarlılıklarına göre Ampisilin ve Kanamisine en duyarlı suş mutasyon için seçildi.

Seçilen *Salmonella* Infantis suşunun biyokimyasal özellikleri Microgen® GnA-ID System kiti ile belirlendi.

Çizelge 3.1. Seçilen *S. Infantis* suşunun biyokimyasal özellikleri.

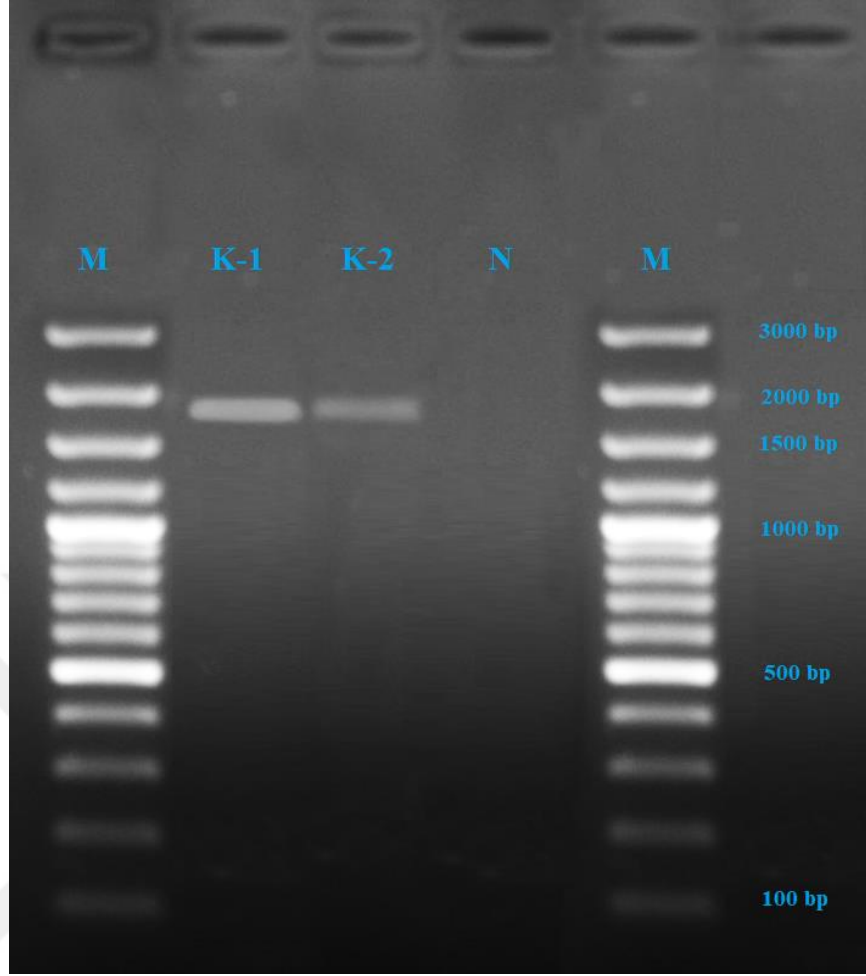
Biyokimyasal Özellik	Sonuç
Lizin	Pozitif (+)
Ornithine	Pozitif (+)
H ₂ S	Pozitif (+)
Glikoz	Pozitif (+)
Mannitol	Pozitif (+)
Ksiloz	Pozitif (+)
O.N.P.G.	Negatif (-)
Indol	Negatif (-)
Üre	Negatif (-)
V.P.	Negatif (-)
Sitrat	Pozitif (+)
T.D.A.	Negatif (-)

3.1.2. DNA İzolasyonuna Ait Bulgular

Çalışma için seçilen *Salmonella Infantis* suşunun DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra spektrofotometre (Nano Drop 2000) ile elde edilen DNA izolatının miktarı belirlendi. Buna göre DNA oranı 260/280 olacak şekilde seçildi.

3.2. Homoloji Kollarına Uygun Kaset Hazırlanmasına Ait Bulgular

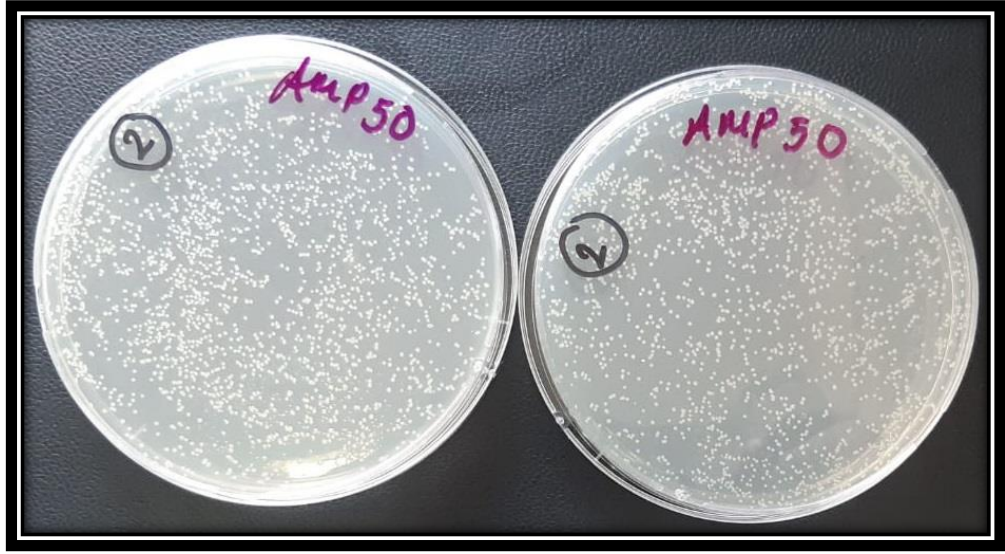
Delesyonu hedeflenen gen bölgesine her iki uçtan *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kaseti bağlanacak şekilde homoloji kollarını kapsayan ve tasarlanan primerler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda agaroz jel üzerinde 1736 bp olarak hedeflenen bölgede tespit edilen bant ile tasarlanan kaset oluşumu doğrulandı.



Şekil 3.1. Tasarlanan kasetin PCR görüntüsü ile confirmasyonu.

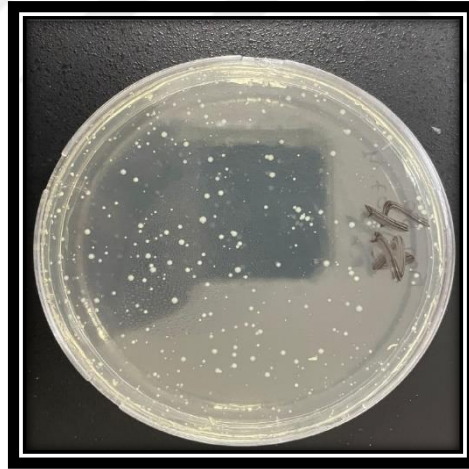
3.3. *pRedET* plazmidinin Transformasyonuna Ait Bulgular

pRedET plazmidinin seçilen *Salmonella* Infantis suşuna başarılı bir şekilde transformasyonunun gerçekleştirildiğinin gösterilmesi için 50 µg/mL Ampisilin içeren LB agara ekim yapıldı. 30 °C’de 24 saat süren inkübasyon sonucunda agar üzerinde üreyen kolonilerin serolojik olarak *Salmonella* Infantis olduğunun doğrulanması ile *pRedET* plazmidinin transformasyonu doğrulandı.



Şekil 3.2. *pRedET* plazmidinin transformasyonu sonucunda Ampisilin içeren besi yerinde üreyen *S. Infantis* kolonileri.

3.4. Hedeflenen Kromozomal DNA Bölgesinin Kesilmesine Ait Bulgular

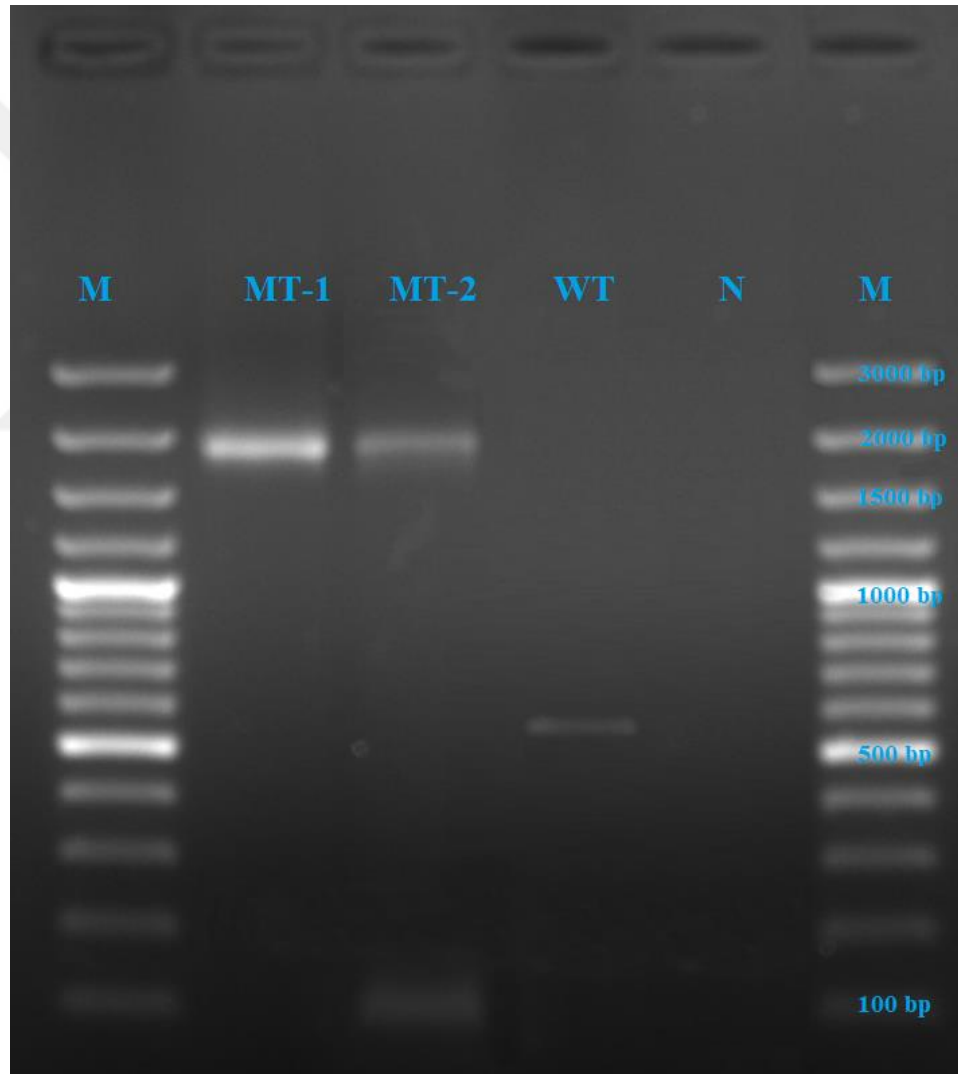


Şekil 3.3. Transformasyon işlemi sonucunda Kanamisin'e karşı direnç kazanan *S. Infantis* kolonileri.

invH geninin kesilmesi için *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinin *Salmonella* *Infantis* suşuna transformasyonu yapılmıştır. Transformasyon işleminin doğrulanması için elde edilen bakteri hücreleri kanamisin (15 µg/ml) içeren LB agar üzerine ekildi. Ürünler gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Transformasyon işlemi öncesinde kanamisine duyarlı olan *S. Infantis* suşunun 15 µg/ml kanamisin

içeren LB agar üzerinde üremesi ile transformasyon işlemi fenotipik olarak doğrulandı.

invH geninin delesyonunun doğrulanması için elde edilen koloniler PCR ile analiz edildi. 15 µg/ml kanamisin içeren LB agar üzerinde üremiş olan *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kaseti ile transforme edilmiş tek bir koloni seçilerek PCR analizi gerçekleştirildi. PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde görüntülendi. Görüntüleme sonuçlarına göre 1923 bp'lik bantların oluşması ile mutasyon işlemi moleküler olarak doğrulandı. Mutasyon işlemi gerçekleştirilmeyen saha suşunun ise aynı primerler ile 542 bp'lik bant oluşturduğu gösterildi.



Şekil 3.4. Plazmid eliminasyonu yapılan suşa spesifik olarak dizayn edilen primerler ile yapılan PCR sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü (M: DNA Ladder MT-1: Mutant S. Infantis MT-2: Mutant S. Infantis WT: Saha suşu N: Negatif kontrol).

3.5. *pRedET* Plazmidinin Mutant *Salmonella* *Infantis* Suşundan Çıkarılmasına Ait Bulgular

pRedET plazmidi *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinin transformasyonundan sonra 37°C’de gerçekleştirilen inkübasyon işlemlerinde kopyalanamayacak şekilde tasarlanmıştır. Bu nedenle *pRed/ET* plazmidinin *S. Infantis* suşu içerisinde çıkarılması için elde edilen bakteri kolonileri 50 µg/mL ampicilin içeren LB agar üzerine pasajlanarak 37°C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda üreme gözlenmemesi ile *pRedET* plazmidinin başarılı bir şekilde mutant *Salmonella* *Infantis* suşundan çıkarıldığı kanıtlandı.

3.6. Mutant Bakterinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Elde edilen mutant *Salmonella* *Infantis* suşunun fenotipik özelliklerinin değerlendirilmesi ve saha suşu ile karşılaştırılması için koloni morfolojisi, biyokimyasal test analizleri, hareket muayenesi ve antibiyotik direnç profilleri incelendi.

Mutant *Salmonella* *Infantis* suşu ile saha suşu olan *Salmonella* *Infantis*’in *in vitro* analizlerine göre; mutant bakterinin fenotipik özelliklerinde herhangi bir değişiklik bulunmadığı belirlendi. Tüm şuşlarda besi yerinde üreme özellikleri ile biyokimyasal test analiz sonuçlarının aynı olduğu belirlendi.

Mutant *Salmonella* *Infantis* suşu ile saha suşu olan *Salmonella* *Infantis* suşunun hareket yeteneklerinin karşılaştırıldığında ise yarı katı besiyerinde yapılan analizlerde herhangi bir farklılık tespit edilmedi.

İki bakterinin antibiyotik direnç profillinde meydana gelmesi muhtemel değişikliklerin belirlenmesi için gerçekleştirilen antibiyogram test sonuçlarına göre *invH* geni çıkarılmış olan *Salmonella* *Infantis* suşunun antibiyotik direnç profilinde herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edildi.

4. TARTIŞMA

Salmonella infeksiyonlarına karşı geliştirilen ilk aşının üzerinden yüz yıldan fazla zaman geçmiş olmasına rağmen *Salmonella* infeksiyonları mortalite ve morbidite oranları ile önemini korumaya devam etmektedir. *S. Typhi*'e karşı dünya genelinde yapılan etkili sürveyans çalışmaları ile bakterinin etkinliği oldukça kısıtlanmış olması, *S. Infantis*, *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* gibi diğer invaziv *Salmonella* etkenlerine karşı farkındalığı artırmıştır (Tennant ve Levine, 2015). *Salmonella* etkenlerine karşı kullanılan canlı aşilar mukozal bağışıklığı uyarma ve hayvanlarda *Salmonella* kolonizasyonunu azaltma özelliklerine sahiptir. Bu nedenle, yumurtadan çıkımdan hemen sonra kullanılabilirler. Hofacre ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada koruma düzeyini artırmak ve daha iyi bağışıklık elde etmek için canlı aşilar ile yapılan ilk aşılamadan birkaç hafta sonra ek dozların gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Kanatlı hayvanların canlı *Salmonella* aşiları ile aşılınması, kanatlı şirketlerinin giderek artan müşteri talebini karşılamaya çalışırken gıda güvenliğini sağlamak için geliştirilen koruma ve kontrol programlarında önemli bir yer teşkil etmeye başlamıştır. Bu nedenle canlı mutant *Salmonella* aşiları kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde kritik bir rol oynamaktadır (Hofacre ve ark., 2021).

Günümüzde uygulanan koruma ve kontrol programlarına rağmen *Salmonella* serotiplerinin neden olduğu *Salmonella* infeksiyonları hem insan hem de hayvan sağlığı için büyük bir tehdit yaratmaya devam etmektedir. Kanatlı hayvanlarda *Salmonella* infeksiyonlarını kontrol altına almak için günümüzde birçok farklı uygulama bulunmaktadır. Aşılama bu uygulamalar içerisinde en etkin role sahip yöntemlerden birisidir. Kanatlı hayvan sürülerindeki *Salmonella* prevalansını aşılama yoluyla azaltmak yaşanacak verim kaybına bağlı maddi zararları azaltmanın yanı sıra insan ve toplum sağlığını korumak için uygulanabilecek en rasyonel yöntemlerden birisidir. Bu nedenle *Salmonella* aşı çalışmaları araştırmacıların üzerine yoğunlaştığı oldukça önemli bir konudur. Tüm aşı çalışmalarında olduğu gibi *Salmonella* aşı çalışmalarında da ortak hedef etkin bir koruyucu bağışıklık sağlamaktır.

Bu tez çalışmasında EFSA ve WHO (WHO, 2018 ve EFSA, 2021) raporlarına göre günümüzde etlik piliç sürülerinden en çok izole edilen ve insanlarda görülme sıklığı her geçen gün artmakta olan *Salmonella* Infantis serovarına karşı aşı adayı olabilecek *invH* mutant canlı *Salmonella* Infantis suşu geliştirilmesi hedeflenmiştir. Aynı zamanda ülkemizde uygulanmakta olan Ulusal *Salmonella* Kontrol Programı verilerine göre *S. Infantis* etlik piliç sürülerinden en çok izole edilen suş konumundadır (Ulusal *Salmonella* Kontrol Programı, 2018).

Bu çalışma sonucunda elde edilen bakteri suşunda gerçekleştirilen mutasyon moleküler yöntemler ile doğrulanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen mutant suşun fenotipik özellikleri *in vitro* koşullarda incelenmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında *invH* mutant *S. Infantis* suşları hakkında çok az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Aynı zamanda bu çalışma ülkemizde *invH* geni mutant *S. Infantis* ile yapılan ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Lambda-Red rekombinasyon yöntemi kromozomal düzeyde ekleme, silme ve nokta mutasyonları oluşturmak için basit ve çok yönlü bir yöntem olmakla beraber *Escherichia coli*, *Salmonella* ve *Shigella* başta olmak üzere Gram negatif bakterilerde genetik değişiklikler yapmak için güçlü bir araçtır (Mosberg ve ark., 2010 ve Ahani Azari ve ark., 2015). Günümüzde Lambda-Red rekombinasyon yöntemini farklı plazmidler kullanılarak gerçekleştirmek mümkündür. Datsenko ve Wanner (2000) yaptıkları çalışma sonucunda Lambda-Red rekombinasyonu ekspresyon plazmidlerinden *pKD46*'nın rekombinasyona en elverişli plazmid olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca diğer rekombinasyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında Lambda-Red rekombinasyon yönteminden daha hızlı sonuç almak mümkündür. Bu tez çalışmasında ise Red/ET ekspresyon plazmidini (*pRedET*) ve *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* template DNA kullanılmıştır. Red/ET ekspresyon plazmidini (*pRedET*) ve *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* template DNA ticari olarak satılan Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion kitinden temin edilmiştir.

Salmonella serotiplerinde *invH* geninde oluşturulacak mutasyonlar için farklı yöntemler kullanılmıştır. Watson ve ark. (1995) yaptıkları çalışmada *TnphoA* isimli transpozonu kullanarak *S. Typhimurium* ve *S. Dublin*'de *invH* mutasyonunu

gerçekleştirmişlerdir. Bir başka çalışmada Pati ve ark. (2013), *pInvH* plazmidi ile *S. Typhimurium*'dan *invH* geninin delesyonunu gerçekleştirmiştir. Bu çalışmalar incelendiğinde oluşabilecek istenmeyen rekombinasyonlar ve ilgili plazmidlerin temin edilmesinin zorluğu nedeniyle gerçekleştirilecek mutasyonun Lambda-Red yöntemiyle yapılmasının daha uygun olduğu düşünülmüştür.

Çalışmanın rekombinasyon aşamasının başarılı bir şekilde tamamlanması için Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion kitinin protokolüne göre lamda red genlerinin ekspresyonu ilk olarak 30°C'de, ilerleyen aşamada ise 37°C'de yaklaşık 1 saat hücrelerin inkübasyonunu önermiştir. Yapılan diğer bir çalışmada Murphy ve Campellone (2003), elektroporasyon aşamasından önce hücreleri ilk olarak 30°C'de ardından 42°C'de 15 dakika inkübe etmişlerdir. Buna paralel olarak Sharan ve ark. (2009), rekombinasyon genlerinin 30°C-34°C gibi düşük sıcaklıklarda eksprese edilemeyeceğini belirtmiş, elde edilen bakteri kültürünün 15 dakika süresince 42°C'de inkübe edilmesi sonucunda rekombinasyon genlerinin eksprese edileceğini göstermişlerdir. Bu tez çalışması ticari kitten uyarlandı ve başarıyla mutasyon işlemi gerçekleştirildi. Ancak benzer çalışmalar diğer yöntemler ile başarılı sonuçlar alınabileceğini göstermektedir.

Bağırsak epitel hücrelerine adhezyon enterik patojen *Salmonella*'nın patojenik yaşam döngüsündeki en önemli basamaklardan birisidir. Bakteri, zara bağlı veziküllerde bağırsak epitelinden geçerek, lamina propria ve retiküloendotelyal sistem hücrelerine ulaşır (Kim, 2003). Watson ve ark. (1995), *invH* genini mutasyona uğrattıkları çalışmalarında *S. Typhimurium* ve *S. Dublin* ile çalışmış, mutant bakterilerin Gentamisin dirençliliğinde bir değişim olmadığını ortaya koymuşlardır. Bu sonuçlar bu tez çalışmasındaki sonuçlar ile örtüşmektedir. Aynı zamanda yapılan hayvan deneylerinde *invH* geni mutasyona uğratılan *Salmonella* serotiplerinin bağırsak mukozal hücrelerine invazyon yeteneğinin ve *Salmonella*'ya bağlı enterit vakalarının önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Ancak bazı hassas hayvanların mutant bakteri ile infekte edildikten 48 saat sonra bağırsak epitellerinde yangıya rastlanmıştır. Bu sonuçlar *invH* mutant *S. Infantis* serotipinin önemli bir mutant canlı aşı adayı olduğunu desteklemektedir.

Pati ve ark. (2013), *invH* geni mutasyona uğratılmış *S. Typhimurium* ile fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarda *invH* geni mutasyona uğratılmış *Salmonella* bakterilerinin mezenterik lenf düğümlerini infekte etme kabiliyetlerinin vahşi serotip ile aynı olduğunu göstermişlerdir. Ancak bağırsak epitelinde yaptıkları çalışmalar mutant bakterinin bağırsak epitelinde infeksiyon oluşturma yeteneğinin önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Bu sonuç *invH* geninin bakterinin bağırsak epiteline invazyon yeteneğinde önemli bir rol oynadığını kanıtlamaktadır.

Salmonella hücrelerinde elektroporasyon işlemi için O'Callaghan ve Charbit (1990) *S. Typhimurium*'da Bio-Rad markalı elektroporatör ile 0,2 cm açıklığa sahip elektroporasyon kuvvetlerini kullanmış ve 2,5 kV'lık akım uygulamışlardır. Bu tez çalışmasında ise aynı marka elektroporasyon cihazı kullanıldı ancak 0,1 cm açıklığa sahip kuvvetler kullanılmasının yanı sıra ticari kitte kullanılması önerilen 1,35 kV akım uygulandı. Elektroporasyon işleminin başarılı bir şekilde tamamlanması uygulanan farklı akım şiddetlerinin ve kuvvet açıklıklarının uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

Elektroporasyon işlemi bakteri hücreleri için yıpratıcı olmaktadır. Bu nedenle elektroporasyon işlemini takiben hızlı bir şekilde hücrelerin LB broth içerisinde inkübe edilmesi gerekir (Sharan ve ark., 2009). Ancak LB broth'un içerdiği tuz nedeniyle elektroporasyon sonrası bakterilerin yaşaması için çok elverişli olamayabileceği gösterilmiştir (Murphy, 2016). LB broth yerine SOC besiyerinin daha iyi bir alternatif olarak kullanılabileceğini Sun ve ark. (2009) yaptıkları bir çalışmada göstermişlerdir. Bu tez çalışmasında elektroporasyon işleminin ardından *S. Infantis* hücreleri SOC besi yeri içerisinde 4 saat süreyle inkübe edilmiştir. Sonuçların başarılı olması LB broth yerine SOC besiyerinin kullanımının da uygun olabileceğini kanıtlar niteliktedir.

Lambda-Red yöntemi ile gerçekleştirilen mutasyonlar sırasında en kritik noktalardan birisi de kullanılan suşların antibiyotik dirençlilik profilleridir. Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion kitinin protokolüne göre çalışma sırasında kullanılacak antibiyotiklerin yoğunluğunun ampicilinin 50 µg/ml, kanamisinine ise 15 µg/ml olması gerektiğini belirtmişlerdir. Ancak bakteri suşlarının antibiyotik dirençlilik

profilleri suşların izole edildiği ülkelerde kullanılan antibiyotik çeşitlerine ve antibiyotik kullanım prosedürlerine göre farklılık gösterebilmektedir. Bu durum göz önüne alındığında bu tez çalışmasında kullanılan kanamisin konsantrasyonu 50 µg/ml olarak belirlendi. Tavsiye edilenden farklı olarak düzenlenen antibiyotik konsantrasyonunda çalışmanın başarılı bir şekilde tamamlanması için, çalışmadan önce suşların antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesinin önemini göstermektedir.

Altmeyer ve ark. (1993), *invH* geninde meydana getirilen mutasyonun farklı *Salmonella* serotiplerini nasıl etkilediğini ortaya koymuştur. Bu çalışmaya göre elde edilen mutant suşların invazyon yetenekleri hücre kültüründe test edilmiş ve *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* ve *S. Typhi* *invH* mutantlarının invazyon yetenekleri incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre tüm serotiplerin invazyon yetenekleri belirli oranda azalma gösterse de konakçı spesifik *Salmonella* serotipleri mutasyondan en çok etkilenmiş ve invazyon yeteneklerini en çok kaybeden suşlar olmuşlardır. Bunun yanı sıra geniş konakçı aralığına sahip diğer *Salmonella* suşlarının kolonizasyon yetenekleri, mutasyondan daha az etkilenmiştir. Bu sonuç geniş konakçı aralığına sahip *S. Infantis* suşlarında *invH* gen mutasyonu ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerektiğini göstermesinin yanı sıra konak spesifik suşlar için umut vadetmektedir.

Daefler ve Russel (1998), *S. Typhimurium* ile yaptıkları bir çalışmada *invH* geninin *invG* lipoproteininin hücre duvarına yerleşimi için gerekli olduğunu kanıtlamışlardır. *Salmonella* bakterileri SP-1 tarafından kodlanan T3SS ile hedef hücrenin sitoplazmasına girebilir. T3SS ise *invG* geni ile kodlanmaktadır (Crago ve Koronakis 1998). Bu çalışmalar *invH* geni mutasyona uğratılmış *S. Infantis* mutantının hücreye adhezyon yeteneğinin kısıtlandığını gösteren çalışmalar ile örtüşmektedir ve *invH* mutantı *S. Infantis*'in iyi bir canlı aşı adayı olabileceğini desteklemektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Günümüzde dünyada ve ülkemizde görülme sıklığı hızla artan *S. Infantis* suşlarına karşı geliştirilmiş bir aşı bulunmamaktadır. Bu amaçla aşı adayı olacak mutant *S. Infantis* mutant suşu oluşturulmuş, oluşturulan suş moleküler yöntemler ile doğrulandıktan sonra karakteristik özellikleri saha suşu ile karşılaştırılmıştır.

Çalışma sonucunda elde edilen mutant *S. Infantis* suşunun antibiyotik dirençlilik özelliklerinde ve biyokimyasal özelliklerinde herhangi bir değişime rastlanmamıştır.

Bu çalışma sonucunda gelecekte prevalansının artması öngörülen serotiplere karşı aşı adayı suşların geliştirilebileceği öngörülmektedir. *Salmonella* Koruma ve Kontrol Programı kapsamında aşı adayı suşların geliştirilmesi için güncel rekombinant DNA teknolojilerinin kullanımı önerilmiştir. Elde edilecek suşların genotipik ve fenotipik özellikleri belirlenerek aşı çalışmalarına uygunluğu belirlenebilir.

Bu tez çalışmasının sonucunda elde edilen *invH* mutant *S. Infantis* suşu aşı adayı olarak belirlenmiştir. İlerleyen süreçte yapılacak *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalar için uygun koşullarda saklanmıştır.

ÖZET

Kanatlı Hayvanlarda Aşı Adayı *Salmonella* Infantis Mutant Suşlarının Geliştirilmesi

Salmonella, hayvanlarda ve insanlarda gastrointestinal sistem infeksiyonlarına neden olan ve oldukça sık karşılaşılan önemli bir zoonozdur. Dünya genelinde kanatlı hayvanlarda *Salmonella* sıklığını azaltmada ve patojenin kontrolünün sağlanmasında aşılama oldukça önemli bir yere sahiptir. Ancak günümüzde kullanılan mevcut aşılar özellikle *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* suşlarına karşı kullanılmaktadır. Bu aşılarda diğer *Salmonella* serovarlarına karşı koruyuculuğu tartışmalıdır. Bu tez çalışmasında etlik piliçlerden en sık izole edilen ve prevalansı her geçen gün artmakta olan *S. Infantis* serovarına karşı *invH* mutanlığı canlı aşı adayları suş geliştirilmesi ve mutant suşun karakterizasyonunun yapılması hedeflenmiştir.

Bu tez çalışmasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Ulusal *Salmonella* Referans Laboratuvarı kültür kütüphanesinde bulunan *Salmonella* Infantis suşları kullanıldı. Moleküler ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak çalışmaya uygun bulunan serovar mutasyon için seçildi. Seçilen *S. Infantis* suşunda, *invH* geninin Lambda-Red rekombinasyon metodu kullanılarak mutasyonu sağlandı. Mutasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği moleküler yöntemler ile kanıtlandı. *invH* mutant bakteri ile saha suşunun fenotipik ve biyokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması sonucunda her iki suş arasında bir farklılığa rastlanmadı.

Bu tez çalışmasında kanatlı hayvanlarda canlı aşı olma potansiyeli taşıyan *invH* mutanlığı *S. Infantis* suşu elde edildi. Gelecekte yürütülecek *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalar sonrasında mutant suşun kanatlı hayvanlarda aşılama işlemi için yüksek bir potansiyele sahip olabileceği belirlendi. *invH* mutant canlı *Salmonella* Infantis suşunun mukozal bağışıklık oluşturma, kolonizasyon potansiyeli ve çevreye saçılım özelliklerinin belirlenmesi aşı olarak kullanılma potansiyeli hakkında bilgi sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: *invH*, Kanatlı, Lambda-Red, Mutant Aşı, *Salmonella* Infantis

SUMMARY

Development of Vaccine Potential *Salmonella* Infantis Mutant Strains in Poultry

Salmonella is an important zoonosis that causes gastrointestinal tract infections in animals and humans. Vaccination has a significant place in reducing the frequency of *Salmonella* in poultry worldwide and in controlling the pathogen. However, current vaccines are mainly used against *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* strains. The protection of these vaccines against other *Salmonella* serovars is controversial. This thesis aimed to develop an *invH* mutant live vaccine candidate strain and characterize the mutant strain against *S. Infantis* serovar, the most frequently isolated from broiler chickens and whose prevalence is increasing day by day.

In this thesis study, *Salmonella* Infantis strains found in the culture library of the National Salmonella Reference Laboratory, which is within the scope of the Ankara University Veterinary Faculty Microbiology Department, were used. After the necessary molecular and biochemical methods were performed, the serovar found suitable for the study was selected for the mutation. Mutation of the *invH* gene was achieved in the selected *S. Infantis* strain using the Lambda-Red recombination method. It has been proven by molecular methods that the mutation process is successfully carried out. As a result of comparing the phenotypic and biochemical properties of *invH* mutant bacteria and the field strain, no difference was found between the two strains.

In this thesis study, an *invH* mutant *S. Infantis* strain, which has the potential to be a live vaccine in poultry, was obtained. After future *in-vitro* and *in-vivo* studies, it was determined that the mutant strain has a high potential for vaccination in poultry. Determination of mucosal immunity, colonization potential and dispersal characteristics of *invH* mutant live *Salmonella* Infantis strain will provide information about its potential to be used as a vaccine.

Keywords: *invH*, Lambda-Red, Mutant vaccine, Poultry. *Salmonella* Infantis,

KAYNAKLAR

- AHANI AZARI A, ZAHRAEI SALEHI T, NAYERI FASAEI B and ALEBOUYEH M (2015). "Gene disruption in Salmonella typhimurim by modified lambda Red disruption system." *Iran J Vet Res* **16**(3): 301-305.
- AKAN M (2008). "Kanatlılarda Salmonella infeksiyonları ve kontrolünde temel prensipler." *Mektup Ankara* **6**(2): 3-5.
- ALBA P, LEEKITCHAROENPHON P, CARFORA V, AMORUSO R, CORDARO G, DI MATTEO P, IANZANO A, IURESCIA M, DIACONU E L, STUDY GROUP E N, PEDERSEN S K, GUERRA B, HENDRIKSEN R S, FRANCO A and BATTISTI A (2020). "Molecular epidemiology of Salmonella Infantis in Europe: insights into the success of the bacterial host and its parasitic pESI-like megaplasmid." *Microb Genom* **6**(5).
- ALJARALLAH K M and ADAMS M R (2007). "Mechanisms of heat inactivation in Salmonella serotype Typhimurium as affected by low water activity at different temperatures." *J Appl Microbiol* **102**(1): 153-160.
- ALTMAYER R M, MCNERN J K, BOSSIO J C, ROSENSHINE I, FINLAY B B and GALAN J E (1993). "Cloning and molecular characterization of a gene involved in Salmonella adherence and invasion of cultured epithelial cells." *Mol Microbiol* **7**(1): 89-98.
- ANTUNES P, MOURAO J, CAMPOS J and PEIXE L (2016). "Salmonellosis: the role of poultry meat." *Clin Microbiol Infect* **22**(2): 110-121.
- ASGHARPOUR F, RAJABNIA R, FERDOSI SHAHANDASHTI E, MARASHI M A, KHALILIAN M and MOULANA Z (2014). "Investigation of Class I Integron in Salmonella infantis and Its Association With Drug Resistance." *Jundishapur J Microbiol* **7**(5): e10019.
- BARROW P, JONES M A and THOMSON N (June 2010). Salmonella. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. G. C. L., P. J. F., S. G. and T. C. O. Iowa, USA, Wiley-Blackwell: 231-265.
- BARROW P A (2007). "Salmonella infections: immune and non-immune protection with vaccines." *Avian Pathol* **36**(1): 1-13.
- CLARK-CURTISS J E and CURTISS R, 3RD (2018). "Salmonella Vaccines: Conduits for Protective Antigens." *J Immunol* **200**(1): 39-48.
- DAEFLER S and RUSSEL M (1998). "The Salmonella typhimurium InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG." *Mol Microbiol* **28**(6): 1367-1380.
- DATSENKO K A and WANNER B L (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6640-6645.

- DEHGHANI B, RASOOLI I, GARGARI S L, NADOOSHAN M R, OWLIA P and NAZARIAN S (2013). "Immunogenicity of Salmonella enterica serovar Enteritidis virulence protein, InvH, and cross-reactivity of its antisera with Salmonella strains." *Microbiol Res* **168**(2): 84-90.
- DESIN T S, KOSTER W and POTTER A A (2013). "Salmonella vaccines in poultry: past, present and future." *Expert Rev Vaccines* **12**(1): 87-96.
- DRAUCH V, KORNSCHÖBER C, PALMIERI N, HESS M and HESS C (2021). "Infection dynamics of Salmonella Infantis strains displaying different genetic backgrounds - with or without pESI-like plasmid - vary considerably." *Emerg Microbes Infect* **10**(1): 1471-1480.
- EECKHAUT V, HAESBROUCK F, DUCATELLE R and VAN IMMERSEEL F (2018). "Oral vaccination with a live Salmonella Enteritidis/Typhimurium bivalent vaccine in layers induces cross-protection against caecal and internal organ colonization by a Salmonella Infantis strain." *Vet Microbiol* **218**: 7-12.
- EFSA (2021). "The European Union One Health 2019 Zoonoses Report." *EFSA Journal* **19**(2): e06406.
- EUCAST (2020). Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method Version 8.0. Place Published.
- FIGUEIRA R and HOLDEN D W (2012). "Functions of the Salmonella pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors." *Microbiology (Reading)* **158**(Pt 5): 1147-1161.
- GAST R K (2007). "Serotype-specific and serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne Salmonella in poultry." *Avian Dis* **51**(4): 817-828.
- GIACOMODONATO M N, UZZAU S, BACCIU D, CACCURI R, SARNACKI S H, RUBINO S and CERQUETTI M C (2007). "SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 effector proteins of Salmonella enterica serovar Typhimurium are synthesized at late stages of infection in mice." *Microbiology (Reading)* **153**(Pt 4): 1221-1228.
- GUIBOURDENCHE M, ROGENTIN P, MIKOLEIT M, FIELDS P I, BOCKEMUHL J, GRIMONT P A and WEILL F X (2010). "Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme." *Res Microbiol* **161**(1): 26-29.
- GÜNAYDIN E (2008). "Kanatlı Salmonella Aşılarına Farklı Perspektiften Bakış." *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* **19**(1): 63-68.
- HEW C M, HAJMEER M N, FARVER T B, GLOVER J M and CLIVER D O (2005). "Survival of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 in chorizos." *J Food Prot* **68**(10): 2039-2046.
- HOFACRE C L, ROSALES A G, COSTA M D, COOKSON K, SCHAEFFER J and JONES M K (2021). "Immunity and Protection Provided by Live Modified Vaccines Against Paratyphoid Salmonella in Poultry-An Applied Perspective." *Avian Dis* **65**(2): 295-302.

- ISO-6579 I O F S (2002). General guidance on methods for the detection of Salmonella. International organisation for standardization. 4th Ed. Microbiology. ISO-6579. Place Published.
- ISSENHUTH-JEANJEAN S, ROGENTIN P, MIKOLEIT M, GUIBOURDENCHE M, DE PINNA E, NAIR S, FIELDS P I and WEILL F X (2014). "Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme." *Res Microbiol* **165**(7): 526-530.
- KARASOVA D, HAVLICKOVA H, SISAK F and RYCHLIK I (2009). "Deletion of *sodCI* and *spvBC* in Salmonella enterica serovar Enteritidis reduced its virulence to the natural virulence of serovars Agona, Hadar and Infantis for mice but not for chickens early after infection." *Vet Microbiol* **139**(3-4): 304-309.
- KAYA İ B (2017). AROA Defektif Mutant Salmonella Infantis Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu. PhD, Ankara Üniversitesi.
- KIM C H (2003). "A Salmonella typhimurium *rfaE* mutant recovers invasiveness for human epithelial cells when complemented by wild type *rfaE* (controlling biosynthesis of ADP-L-glycero-D-mannoheptose-containing lipopolysaccharide)." *Mol Cells* **15**(2): 226-232.
- LOPES P D, FREITAS NETO O C, BATISTA D F, DENADAI J, ALARCON M F, ALMEIDA A M, VASCONCELOS R O, SETTA A, BARROW P A and BERCHIERI A J (2016). "Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of Salmonella enterica serovar Gallinarum biovar Gallinarum." *Vet J* **214**: 40-46.
- MAJEWSKI D D, OKON M, HEINKEL F, ROBB C S, VUCKOVIC M, MCINTOSH L P and STRYNADKA N C J (2021). "Characterization of the Pilotin-Secretin Complex from the Salmonella enterica Type III Secretion System Using Hybrid Structural Methods." *Structure* **29**(2): 125-138 e125.
- MILLER T, PRAGER R, RABSCH W, FEHLHABER K and VOSS M (2010). "Epidemiological relationship between Salmonella Infantis isolates of human and broiler origin." *Lohmann Information* **45**(2): 27.
- MOSBERG J A, LAJOIE M J and CHURCH G M (2010). "Lambda red recombineering in Escherichia coli occurs through a fully single-stranded intermediate." *Genetics* **186**(3): 791-799.
- MUGHINI-GRAS L, VAN HOEK A, CUPERUS T, DAM-DEISZ C, VAN OVERBEEK W, VAN DEN BELD M, WIT B, RAPALLINI M, WULLINGS B, FRANZ E, VAN DER GIESSEN J, DIERIKX C and OPSTEEGH M (2021). "Prevalence, risk factors and genetic traits of Salmonella Infantis in Dutch broiler flocks." *Vet Microbiol* **258**: 109120.
- MURPHY K C (2016). "Lambda Recombination and Recombineering." *EcoSal Plus* **7**(1).
- MURPHY K C and CAMPBELLONE K G (2003). "Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic E. coli." *BMC Mol Biol* **4**: 11.

- MUSTAK I B and YARDIMCI H (2019). "Construction and in vitro characterisation of aroA defective (aroADelta) mutant Salmonella Infantis." *Arch Microbiol* **201**(9): 1277-1284.
- MUTWIRI G, GERDTS V, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, AURAY G, ENG N, GARLAPATI S, BABIUK L A and POTTER A (2011). "Combination adjuvants: the next generation of adjuvants?" *Expert Rev Vaccines* **10**(1): 95-107.
- NANDRE R M, EO S K, PARK S Y and LEE J H (2015). "Comparison of a live attenuated Salmonella Enteritidis vaccine candidate secreting Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit with a commercial vaccine for efficacy of protection against internal egg contamination by Salmonella in hens." *Can J Vet Res* **79**(3): 235-240.
- NOGRADY N, TOTTH A, KOSTYAK A, PASZTI J and NAGY B (2007). "Emergence of multidrug-resistant clones of Salmonella Infantis in broiler chickens and humans in Hungary." *J Antimicrob Chemother* **60**(3): 645-648.
- O'CALLAGHAN D and CHARBIT A (1990). "High efficiency transformation of Salmonella typhimurium and Salmonella typhi by electroporation." *Mol Gen Genet* **223**(1): 156-158.
- OHL M E and MILLER S I (2001). "Salmonella: a model for bacterial pathogenesis." *Annu Rev Med* **52**: 259-274.
- PARDO-ESTE C, LORCA D, CASTRO-SEVERYN J, KRUGER G, ALVAREZ-THON L, ZEPEDA P, SULBARAN-BRACHO Y, HIDALGO A, TELLO M, MOLINA F, MOLINA L, REMONSELLEZ F, CASTRO-NALLAR E and SAAVEDRA C (2021). "Genetic Characterization of Salmonella Infantis with Multiple Drug Resistance Profiles Isolated from a Poultry-Farm in Chile." *Microorganisms* **9**(11).
- PATI N B, VISHWAKARMA V, JAISWAL S, PERIASWAMY B, HARDT W D and 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.
- RECCHIA G D and SHERRATT D J (2002). "Gene acquisition in bacteria by integron-mediated site-specific recombination." *Mobile DNA II*: 162-176.
- RYAN M P, DILLON C and ADLEY C C (2011). "Nalidixic acid-resistant strains of Salmonella showing decreased susceptibility to fluoroquinolones in the midwestern region of the Republic of Ireland due to mutations in the gyrA gene." *J Clin Microbiol* **49**(5): 2077-2079.
- RYAN M P, O'DWYER J and ADLEY C C (2017). "Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen Salmonella." *Biomed Res Int* **2017**: 3782182.
- RYCHLIK I, GREGOROVA D and HRADECKA H (2006). "Distribution and function of plasmids in Salmonella enterica." *Vet Microbiol* **112**(1): 1-10.
- SARIÇAM S (2017). Kanatlı Kökenli Salmonella Infantis Suşlarının MLTS ile Filogenetik Analizi. MSC, Ankara Üniversitesi.

- SEVER N K (2017). Kanatlı Orjinli Salmonella Infantis Suşlarında Virülens Genlerinin Moleküler Analizi. PhD, Ankara Üniversitesi.
- SHARAN S K, THOMASON L C, KUZNETSOV S G and COURT D L (2009). "Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering." *Nat Protoc* **4**(2): 206-223.
- SIRIKEN B (2013). "[Salmonella pathogenicity islands]." *Mikrobiyol Bul* **47**(1): 181-188.
- SUN Q Y, DING L W, HE L L, SUN Y B, SHAO J L, LUO M and XU Z F (2009). "Culture of Escherichia coli in SOC medium improves the cloning efficiency of toxic protein genes." *Anal Biochem* **394**(1): 144-146.
- SWITT A I, SOYER Y, WARNICK L D and WIEDMANN M (2009). "Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of Salmonella enterica serotype 4,5,12:i." *Foodborne Pathog Dis* **6**(4): 407-415.
- TENNANT S M and LEVINE M M (2015). "Live attenuated vaccines for invasive Salmonella infections." *Vaccine* **33 Suppl 3**: C36-41.
- ULUSAL SALMONELLA KONTROL PROGRAMI (2018). Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı
- VALDEZ Y, FERREIRA R B and FINLAY B B (2009). "Molecular mechanisms of Salmonella virulence and host resistance." *Curr Top Microbiol Immunol* **337**: 93-127.
- VAN ASTEN A J and VAN DIJK J E (2005). "Distribution of "classic" virulence factors among Salmonella spp." *FEMS Immunol Med Microbiol* **44**(3): 251-259.
- VARMUZOVA K, FALDYNOVA M, ELSHEIMER-MATULOVA M, SEBKOVA A, POLANSKY O, HAVLICKOVA H, SISAK F and RYCHLIK I (2016). "Immune protection of chickens conferred by a vaccine consisting of attenuated strains of Salmonella Enteritidis, Typhimurium and Infantis." *Vet Res* **47**(1): 94.
- WATSON P R, PAULIN S M, BLAND A P, JONES P W and WALLIS T S (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.
- WHO. (2018). "Salmonella (non-typhoidal)." Retrieved 04.02.2022, 2022, from [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)).
- WISNER A, DESIN T, WHITE A, POTTER A and KÖSTER W (2012). The Salmonella Pathogenicity Island-1 and -2 Encoded Type III Secretion Systems. Salmonella A Diversified Superbug. Y. Kumar.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı	Mustafa
Soyadı	Önol
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu	Evli

II-Eğitimi

09/2009 – 01/2015 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

09/2005 – 06/2009 Aydın Adnan Menderes Anadolu Lisesi

III-Ünvanları

Veteriner Hekim

IV-Mesleki Deneyimi

Davetli Araştırmacı – The University of Nottingham School of Biosciences
– Nottingham, Birleşik Krallık (15/03/2021 – 15/03/2022)

Stajyer Araştırmacı – Cornell Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan
Sağlığı ve Hastalıkları Merkezi Araştırma ve Tanı Laboratuvarı – New York,
ABD (01/07/2016 –31/08/2016)

V-Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti

VI-Bilimsel İlgi Alanları

Bildiriler

Önol M, Erdem AE, Adam TIB, Yıldırım T, Günççekleri B. Farklı hayvan türlerinden izole edilen dermatofitlerin retrospektif incelenmesi (Retrospective evaluation of dermatophytes isolated from different animal species) 2. Uluslararası Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, 16-19 Ekim 2018, Antalya, s. 264. (Poster sunumu)

Erdem AE, **Önol M**. Otitis eksterna tanısı koyulan köpeklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi (Determination of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dogs with otitis externa) 2. Uluslararası Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, 16-19 Ekim 2018, Antalya, s. 265. (Poster sunumu)

Karacan Sever N, Yıldırım T, Omerović **M**, **Önol M**, Zahiri A, Doğan B, İzgür M. Retrospective evaluation of dermatophytes isolated from different animal species (Farklı hayvan türlerinden izole edilen dermatofitlerin retrospektif incelenmesi) 10th Balkan Congress of Microbiology / Microbiologia Balkanica, November 16-18th, 2017, Sofia, s. 294. (Poster Sunumu)

Yayınları

Önol M, Yardımcı, H. Avcı bakteriler (Predator bacteria) Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 2018, 29 (1): 57-61. (<https://dergipark.org.tr/evmd/issue/42560>)

Önol M, Önol I.D, The unique activity of *Lactobacillus buchneri* in silage, Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 2021, 32 (1): 69-76 (<https://dergipark.org.tr/pub/evmd/issue/63454/801925>)

Nurdan Karacan Sever, Tuğçe Üstün, Mehmed Omerovic, **Mustafa Önol** , Amir Khazar Zahiri, Barışhan Doğan, Prevalence of dermatophytes isolated from domestic animals in Ankara within a three-year period (2014-2017) MAE Vet Fak Derg, 6 (1): 8-13, 2021 DOI: 10.24880/maevfd.844656

Yer Aldığı Projeler

Kanatlı Hayvanlarda Aşı Adayı *Salmonella* Infantis Mutant Suşlarının Geliştirilmesi

Seminer

Avcı Bakteriler