



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KANATLI ORİJİNLİ *SALMONELLA* KENTUCKY SUŞLARINDAN
CANLI MUTANT AŞI ADAYI SUŞUNUN GELİŞTİRİLMESİ**

Barışhan DOĞAN

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet AKAN**

**ANKARA
2021**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANATLI ORİJİNLİ *SALMONELLA* KENTUCKY SUŞLARINDAN
CANLI MUTANT AŞI ADAYI SUŞUNUN GELİŞTİRİLMESİ**

Barışhan DOĞAN

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet AKAN**

**Bu tez çalışması, T.C. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
21L0239006 numaralı projesi ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2021**

T.C.
Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Etik Beyan

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum, “Kanatlı Orijinli *Salmonella* Kentucky Suşlarından Canlı Mutant Aşı Adayı Suşunun Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımca yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanıma ve tarafıma aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımca yapılmış olup, tüm cümleler, tüm yorumlar tarafıma aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu kabul ve beyan ederim.

Öğrencinin;

Adı Soyadı : Barışhan DOĞAN

Tarih : 06 / 12 / 2021

İmza :

KABUL VE ONAY

T.C.

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji (Veteriner) Anabilim Dalı'nda

Barışhan DOĞAN tarafından hazırlanan

“Kanatlı Orijinli *Salmonella* Kentucky Suşlarından Canlı Mutant Aşı Adayı Suşunun Geliştirilmesi” başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06 / 12 / 2021

Prof. Dr. Hakan YARDIMCI

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Ankara Üniversitesi

Danışman - Üye

Prof. Dr. H. Oğuz SARİMEHMETOĞLU

Ankara Üniversitesi

Raportör - Üye

Prof. Dr. Murat YILDIRIM

Kırıkkale Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Esra ŞEKER

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Üye

Doktora Tezi hakkında alınan jüri kararı, T.C. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

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	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Etimoloji ve Nomenklatür	2
1.2. Taksonomi ve Etiyoloji	4
1.3. Epizootiyoloji	5
1.4. Patogenez	7
1.5. Laboratuvar Tanısı	9
1.6. Koruma ve Kontrol Stratejileri	10
1.7. Kanatlı Hayvanlarda <i>Salmonella</i> Aşılı	12
1.8. <i>aroA</i> Mutant Canlı <i>Salmonella</i> Aşı Aday Suşunun Geliştirilmesi	19
2. GEREÇ ve YÖNTEM	24
2.1. Gereç	24
2.1.1. <i>Salmonella</i> Kentucky Suşu	24
2.1.2. Besiyerleri	24
2.1.3. Supplementler	28
2.1.4. Antiserumlar	28
2.1.5. Antibiyotik Diskleri	29
2.1.6. Biyokimyasal Test Kiti ve Kimyasallar	29
2.1.7. Moleküler Kitler, Primerler, Kimyasallar	29
2.1.8. Hücre Kültürü ve Sarf Malzemeleri	30
2.1.9. Cihazlar ve Ekipmanlar	30
2.2. Yöntem	31
2.2.1. Mutasyonda Kullanılacak <i>Salmonella</i> Kentucky Suşunun Seçimi	31
2.2.2. Serolojik ve Biyokimyasal Analizler	31
2.2.3. Moleküler Analiz	33
2.2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu	33
2.2.3.2. <i>aroA</i> Geninin Moleküler Analizi	35
2.2.4. Mutasyon Çalışmaları	36
2.2.4.1. <i>pRedET</i> 'nin <i>Salmonella</i> Kentucky'e Transformasyonu	36
2.2.4.2. <i>FRT-PGK-gb2-neo-FRT</i> Kasetinin Oluşturulması ve Purifikasyonu	38

2.2.4.3. <i>FRT-PGK-gb2-neo-FRT</i> Kasetinin <i>pRedET(+)</i> <i>Salmonella</i> Kentucky'e Transformasyonu	41
2.2.4.4. <i>FRT-PGK-gb2-neo-FRT</i> Kaset Transformasyonunun Moleküler Konfirmasyonu	43
2.2.4.5. Mutant <i>Salmonella</i> Kentucky'de <i>aroA(-)</i> Konfirmasyonu	45
2.2.4.6. <i>pRedET</i> 'in Mutant <i>Salmonella</i> Kentucky'den Eliminasyonu	45
2.2.4.7. <i>FRT-PGK-gb2-neo-FRT</i> Kasetinin Eliminasyonu	45
2.2.5. Mutant <i>Salmonella</i> Kentucky ile Saha Suşunun Karşılaştırılması	48
2.2.5.1. Hareket Yeteneklerinin Belirlenmesi	48
2.2.5.2. Antibakteriyel Duyarlılık Testi	49
2.2.5.3. EDTA Duyarlılık Testi	50
2.2.5.4. İn-Vitro Yaşama Gücü Analizi	51
2.2.5.5. Adhezyon ve İnvazyon Analizi	52
3. BULGULAR	55
3.1. Mutasyonda Kullanılacak <i>Salmonella</i> Kentucky Suşunun Seçimi Bulguları	55
3.2. Serolojik ve Biyokimyasal Analiz Bulguları	55
3.3. Moleküler Çalışma Bulguları	56
3.3.1. Genomik DNA İzolasyonu Bulguları	56
3.3.2. <i>aroA</i> Geninin Moleküler Analizi Bulguları	56
3.4. Mutasyon Çalışmaları Bulguları	57
3.4.1. <i>pRedET</i> 'nin <i>Salmonella</i> Kentucky'e Transformasyonu Bulguları	57
3.4.2. <i>FRT-PGK-gb2-neo-FRT</i> Kasetinin Oluşturulması ve Purifikasyonu Bulguları	58
3.4.3. <i>FRT-PGK-gb2-neo-FRT</i> Kasetinin <i>pRedET(+)</i> <i>Salmonella</i> Kentucky'e Transformasyonu Bulguları	58
3.4.4. <i>FRT-PGK-gb2-neo-FRT</i> Kaset Transformasyonunun Moleküler Konfirmasyonu Bulguları	59
3.4.5. Mutant <i>Salmonella</i> Kentucky'de <i>aroA(-)</i> Konfirmasyonu Bulguları	60
3.4.6. <i>pRed/ET</i> 'nin Mutant <i>Salmonella</i> Kentucky'den Eliminasyonu Bulguları	60
3.4.7. <i>FRT-PGK-gb2-neo-FRT</i> Kasetinin Eliminasyonu Bulguları	61
3.5. Mutant <i>Salmonella</i> Kentucky ile Saha Suşunun Karşılaştırılması Bulguları	61
3.5.1. Hareket Yetenekleri Bulguları	61
3.5.2. İn-Vitro Yaşama Gücü Analizi Bulguları	62
3.5.3. Adhezyon ve İnvazyon Analizi Bulguları	62
3.5.4. EDTA Duyarlılık Testi Bulguları	63
3.5.5. Antibakteriyel Duyarlılık Testi Bulguları	63
4. TARTIŞMA	64
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	69
ÖZET	70
SUMMARY	71
KAYNAKLAR	72

ÖNSÖZ

Salmonella, insanlarda ve hayvanlarda genellikle gastrointestinal sistem enfeksiyonuna neden olan önemli zoonoz bir patojendir. *Salmonella* serovarlarının çoğu konakçı spesifik değildir ve birçok canlıda paratifoidal salmonellozise neden olduğu bilinmektedir. Paratifoidal *Salmonella* serovarları ile enfekte olan kanatlı hayvanlar, genellikle asemptomatik seyirli hastalık tablosu oluşturmaktadır. Aynı zamanda gastrointestinal sisteme kolonize olan etkenin uzun süre boyunca fekal olarak çevreye saçıldığı ve kanatlı orijinli gıdaların işlendiği tesislerde kontaminasyona neden olduğu bilinmektedir.

Günümüzde insan salmonellozis vakaları en çok kanatlı orijinli gıdalar ile ilişkilendirilmektedir. Kanatlılarda ve kanatlı ürünlerinde *Salmonella* prevalansının azaltılması için ülkemizde dahil olmak üzere birçok gelişmiş ülkede, çiftlikten sofraya gıda güvenliği yaklaşımı ile *Salmonella* kontrol programları uygulanmaktadır. Bu programlarda yoğun bir analiz, biyogüvenlik, koruma ve kontrol süreçleri yürütülmektedir. Dünya genelinde yürütülen bu süreçler ile iyi bir aşama kaydedilmiş olsa da hala önemini koruduğu bilinmektedir. Günümüzde geline son noktaya bakıldığında, *Salmonella* probleminin kaynağında elimine edilmesi gerektiği ve Veteriner Hekimliği alanında koruyucu hekimlik rolünün önemi anlaşılmaktadır. Günümüzde, *Salmonella enterica subs. enterica* serovar Kentucky'nin kanatlı hayvanlarda baskın *Salmonella* serovarları arasına dahil olması ile birlikte insanlarda oluşan yüksek insidansı ve antimikrobiyal direnç profiline bakıldığında halk sağlığı için potansiyel bir tehdit olduğu bildirilmiştir (Foley ve ark., 2011).

Bu tez çalışması kapsamında, kanatlı hayvanlarda ve kontamine kanatlı orijinli gıda ürünlerindeki baskın *Salmonella* serovarlarından biri olan *Salmonella* Kentucky'e karşı *aroA* mutant canlı aşı adayı suşunun geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Doktora eğitimimin her aşamasında değerli bilgilerini ve deneyimlerini daima benimle paylaşan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Mehmet AKAN başta olmak üzere, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hakan YARDIMCI'ya, emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Müjgan İZGÜR'e, Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU'na, Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK'a ve Anabilim Dalı ile Tez İzleme Komitesi'nin değerli tüm öğretim üyelerine, doktora eğitimim boyunca manevi desteklerini daima hissettiren Prof. Dr. K. Serdar DİKER'e sonsuz teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmamı, "YÖK 100/2000 Doktora Projesi" kapsamında destekleyen başta T.C. Yükseköğretim Kurulu'na; "Öncelikli Alan Doktora Tez Projesi" kapsamında destekleyen T.C. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne; deneysel süreçlerin yürütülmesinde alt yapısını kullandığım T.C. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Ulusal Salmonella Referans Laboratuvarı (USRL) ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarına; T.C. Ankara Üniversitesi Teknokent yerleşkesinde faaliyet gösteren Avitek Ar-Ge Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarı'na teşekkür ederim.

"YÖK 100/2000 Öncelikli Alanlar"da yer alan "Aşı Çalışmaları" kapsamında tamamlamış olduğum doktora tezimde yer alan deneysel süreçlerin planlanmasında ve yürütülmesinde, bilgi ve deneyimlerini her daim benimle paylaşan Dr. Ahmet CEYLAN'a ve değerli çalışma arkadaşım Uzm. Vet. Hekim Tajelser Idris Badri Adam ile "Aşı Çalışmaları" alt alanında tez çalışmalarımızı saygı, sabır ve kararlılıkla yürüttüğümüz doktora dönem arkadaşlarıma destekleri için teşekkürü borç bilirim.

Hayatımın her alanında olduğu gibi eğitim hayatım boyunca da maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olduklarını hissettiren babam Vet. Hekim İsa DOĞAN'a, annem Demet DOĞAN'a, kardeşim Ecz. Ece DOĞAN'a ve değerli eşim Vet. Hekim Saniye DOĞAN'a sabrı, desteği ve yardımları için sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

+	Artı
-	Eksi
±	Artı/Eksi
λ	Lamda
%	Yüzde
°C	Santigrad Derece
dk.	Dakika
sn.	Saniye
bp.	Base Pair
pH	Power of Hydrogen
dH ₂ O	Distile Su
kDa	Kilodalton
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
APC	Antigen Presenting Cell
ASM	American Society for Microbiology
Caco – 2	Human Epithelial Colorectal Adenocarcinoma
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFU	Colony Forming Unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute

DAHP	7-Phospho-2-Dehydro-3-Deoxy-D-Arabino-Heptonate
DHF	Dihidrofolik
DHQ	3-Dehydroquinic Acid
DHS	3-Dehydroshikimate
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
E4P	D-Erythrose 4-Phosphate
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EPSP	5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate
EUCAST	European Comittee on Antimicrobial Susceptibility Test
FBS	Fetal Bovine Serum
GALE	Uridine Diphosphate Galactose 4-Epimerase
H₂S	Hydrogen Sulfide
HI	Hemagglutination Inhibition
IL	Interlöykin
ISO	International Organization for Standardization
LB	Luria Bertani
MC	MacConkey
MHA	Mueller-Hinton Agar
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid

NADP	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
O.D.	Optik Dansite
OMP	Outer Membrane Protein
OMV	Outer Membrane Vesicles
PABA	Para-Aminobenzoikası
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEP	Phosphoenolpyruvate
PvuII	Type-2 Restriksiyon Enzimi
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RPM	Rotation Per Minute
RNA	Ribonucleic Acid
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
S.O.C.	Super Optimal Broth with Catabolites Repression
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenicity Island
SSI	Statens Serum Institute
SSNA	Semi-Solid Nutrient Agar
T3SS	Type Three Secretion System
TBE	Tris Borate EDTA
THF	Tetrahidrofolik
TLR	Toll-Like Receptor
USRL	Ulusal Salmonella Referans Laboratuvarı
WHO	World Health Organization
XLD	Xylose Lysine Deoxycolate

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. <i>aroA</i> Mutant <i>Salmonella</i> Kentucky’de H ₂ S (-) Bulgusunun Gösterilmesi	56
Şekil 3.2. Saha Suşu <i>Salmonella</i> Kentucky’de <i>aroA</i> (+) Geninin Gösterilmesi	57
Şekil 3.3. <i>pRED/ET</i> Transformasyonunun Fenotipik Konfirmasyonu	57
Şekil 3.4. Kaset Kromozomunun Agaroz Jelde Görüntülenmesi	58
Şekil 3.5. <i>FRT-PGK-gb2-neo-FRT</i> Transformasyonunun Fenotipik Konfirmasyonu	59
Şekil 3.6. <i>FRT-PGK-gb2-neo-FRT</i> Transformasyonunun Moleküler Konfirmasyonu	59
Şekil 3.7. Mutant <i>Salmonella</i> Kentucky’de <i>aroA</i> (-) Geninin Gösterilmesi	60
Şekil 3.8. <i>aroA</i> Mutant <i>Salmonella</i> Kentucky (Sol) ile Saha Suşunun (Sağ) Hareket Yeteneğinin Yarı-Katı Agarda Karşılaştırılması	62
Şekil 3.9. <i>aroA</i> Mutant <i>Salmonella</i> Kentucky ile Saha Suşunun Antibakteriyel Duyarlılıklarının Karşılaştırılması	63

1. GİRİŞ

Salmonella, insanlarda ve hayvanlarda genellikle gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına neden olan önemli zoonoz bir patojendir. İnsanlarda, enfeksiyona neden olan etkenin kaynağı genellikle kontamine hayvansal orijinli gıdalar ile ilişkilendirilmektedir (Dunkley ve ark., 2009; Galanis ve ark., 2006). *Salmonella*, biyogüvenlik ve sanitasyon uygulamalarına rağmen hala yüksek prevalansı ile kanatlı üretim birimlerinde ve kontamine kanatlı orijinli gıda ürünlerinde önemli bir problem olmaya devam etmektedir. Problemin çözümü için öncelikle kanatlı sürülerinde *Salmonella*'ya karşı bağışıklık sağlanması gerektiğini savunan araştırmacılar, kanatlı sürülerinde, kanatlı orijinli gıda ürünlerinin kontaminasyonunun önlenmesinde ve halk sağlığının korunmasında aşılamanın en etkili yaklaşım olduğu bildirmişlerdir (Alderton ve ark., 1991; Cerquetti ve Gherardi, 2000; Cooper ve ark., 1990).

Birçok gelişmiş ülkede, *Salmonella* serovarlarının çiftlik hayvanlarından büyük oranda azaltıldığı bilinmektedir ancak günümüzde gelişmekte olan ülkelerde, başta kanatlı endüstrisi olmak üzere çiftlik hayvanlarında *Salmonella* pozitifliği devam etmektedir (Chappell ve ark., 2009). Kanatlı sürülerinin aşılması ile birlikte yürütülen biyogüvenlik ve sanitasyon uygulamaları, *Salmonella* prevalansını azaltmak için halihazırda kullanılan önemli bir stratejidir. *Salmonella* aşıları, gastrointestinal sistem kolonizasyonunu azaltarak ve dolayısıyla etkenin dışkı ile saçılmasını engelleyerek çevresel kontaminasyonu azaltmakta ve halk sağlığı riskini en aza indirmektedir (Chappell ve ark., 2009). Kanatlı sürülerinde azalan *Salmonella* prevalansı sayesinde insan tüketimine sunulan kanatlı orijinli gıdalardaki kontaminasyonun da azalacağı ve dolayısıyla insan salmonellozis vakalarında da düşüş meydana geleceği düşünülmektedir (Desin ve ark., 2013; Foley ve ark., 2011).

Salmonella serovarlarında bir dizi gen sekansının değiştirilmesi ile etkenin immunojenitesini değiştirmeden zayıflatarak canlı ve oldukça etkili aşılama imkanı sunmaktadır. Bunlar arasında *aro*, *htrA*, *cya*, *crp* ve *phoP* gibi önemli bazı genler yer almaktadır. Dünyanın birçok yerinde araştırmacılar *Salmonella*'nın baskın serovarlarında en çok *aro* geninin mutasyonu üzerine çalışmışlardır. *Salmonella* serovarlarında aromatik aminoasit biyosentez yolağında rol oynayan *aroA*, *aroC* ve *aroD* gibi genlerin delesyonu ile oksotrofik bakteriler oluşmaktadır. *aro* geninin mutasyonu ile oluşturulan zayıflatılmış canlı *Salmonella* mutantlarının, hayvanları enfeksiyon etkenine karşı koruyabilen sağlam bağışıklık tepkileri ortaya koyduğu çok sayıda klinik öncesi çalışma ile bildirilmiştir (Eisenstein ve ark., 1984; Harrison ve ark., 1997; Killar ve Eisenstein, 1985).

Günümüze kadar yapılan çok sayıda araştırmaya rağmen daha güvenli, daha iyi tanımlanmış *Salmonella* aşılara ihtiyaç olduğu bilinmektedir (Desin ve ark., 2013). *Salmonella* aşılarının başarılı bir şekilde geliştirilmesi ve kullanılması, *Salmonella*'nın kontrolünde insanların yolunu açacaktır (Chatfield ve ark., 1994).

1.1. Etimoloji ve Nomenklatür

Salmonella, ilk olarak 1880 yılında Dr. Karl Joseph Eberth tarafından tifolu hastaların örneklerinden izole edilmiştir. Dr. Georg Theodor August Gaffky, 1884 yılında tifolu hastalardan aldığı numuneler ile hastalık etkenini izole ederek doğrulamıştır. Hemen ardından, 1885 yılında Dr. Daniel Elmer Salmon ve asistanı Dr. Theobald Smith tarafından, aynı hastalık etkeni domuzlardan izole ve tanımlanmıştır. Dr. Salmon'un çabalarını takdir etmek adına, Fransız bakteriyolog Dr. Joseph Lignières, bakterinin cins adının atfedilerek *Salmonella* olarak adlandırılmasını önermiştir ve bu şekilde tanımlanmıştır (Monte ve Sellera, 2020).

Salmonella Kentucky, ilk olarak 1937 yılında Amerika Birleşik Devletleri Kentucky Üniversitesi'nden Dr. Philip Rarick Edwards tarafından tanımlanmıştır. Koksidiyozisten etkilenen bir civciv sürüsünde, mortalite ile seyreden ve koksidiyoziste normal olarak bulunan lezyonlara ek olarak, ince bağırsakta ve sekumda yaklaşık 5 cm çaplı, birkaç ülserli bölgeye rastlanmıştır. Ülserli bölgelerde seröz membranda perforasyon gözlemlenmiş ve bölgelerden alınan materyalden *Salmonella* izole ve identifiye edilmiştir. Biyokimyasal testleri tam olarak *Salmonella* cinsinin özelliklerini göstermiştir. Serolojik analizlerine göre, 1934 yılında ilk olarak yayınlanan The Kauffmann-White şemasında yer almadığı ve antijenik olarak bağımsız bir serovar olduğu görülmüştür. Serovar 8,20:i:z6 antijenik formülü ile *Salmonella enterica subspecies enterica* serovar Kentucky olarak tanımlanmış ve The Kauffmann-White şemasında yerini almıştır (Edwards, 1938).

Salmonella'nın isimlendirilmesi, serovarlara antijenik yapılarına göre farklı gruplara ayıran bir prosedürdür ve somatik-O, flagellar-H ve Vi kapsüler antijenlerinin, spesifik antikor reaksiyonu ile identifiye edilmesi üzerine kurulmuştur. *Salmonella*'nın O-antijeni, hangi gruba ait olduğunu belirlerken, H-antijeni serovarı belirlemektedir (Brenner ve ark., 2000; Nataro ve ark., 2011).

Günümüzde bilinen tüm *Salmonella* serovarlara antijenik formülleri ve isimlendirilmesi, The WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* (WHOCC-Salm) isimli resmi kuruluş tarafından “Antigenic Formulae Of The *Salmonella* Serovars” isimli resmi referans şema üzerinden yürütülmektedir (Grimont ve Weill, 2007). Serovar ve serotip terimleri genellikle eş anlamlı olarak kullanılmaktadır. World Health Organization (WHO), serovar terimini kullanmayı tercih ederken, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ile American Society for Microbiology (ASM), serotip terimini kullanmayı tercih etmiştir. Günümüzde, uluslararası tutarlılığı korumak adına, serovar teriminin ortak olarak kullanılması kararlaştırılmıştır (Ryan ve ark., 2017).

1.2. Taksonomi ve Etiyoloji

Salmonella cinsi, *Proteobacteria* şubesinin *Gammaproteobacteria* sınıfındaki *Enterobacterales* takımında yer alan *Enterobacteriaceae* familyasının zoonoz karakterli bir üyesidir. *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere 2 türe ayrılmıştır. *Salmonella enterica* ise *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* ve *indica* olmak üzere altı alt türe ayrıldığı bilinmektedir (Monte ve Sellera, 2020; Tindall ve ark., 2005). *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, 2600'den fazla farklı serovardan oluşmaktadır (Issenhuth-Jeanjean ve ark., 2014), ve bu serovarların bir kısmının kümes hayvanlarında non-typhoidal *Salmonella* enfeksiyonları ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Gast, 2007). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*) ve biovar Pullorum (*S. Pullorum*), kümes hayvanlarında sırasıyla kanatlı tifosunun ve pullorum hastalığının nedenidir. *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum*, nadiren insan enfeksiyonlarıyla bağlantılı olan konakçı spesifik serovarlardır (Barrow, 2007).

Enterobacteriaceae familyasının genel özelliklerini taşıyan *Salmonella* cinsi, boyalı preparatlarında Gram-negatif, çomak, kapsülsüz ve sporsuz görünmektedir. Fakültatif anaerob ve fakültatif intraselüler olup, yaklaşık 0,7 - 1,5 x 2,0 - 5,0 µm boyutlarında ve peritrik flagellaya sahip, *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* hariç hareketli bir bakteridir. Genellikle mezofilik sıcaklıklarda yaşamakla birlikte, laboratuvar koşulları altında, 24 saatte, küçük, yuvarlak, smooth (S) tipli koloniler oluştururken, buyyonda homojen bulanıklık meydana getirmektedir. Optimum üreme pH'sı 6,5 - 7,5 arasında olmakla birlikte, pH 4,0 – 9,5 arasındaki geniş bir pH spektrumunda da üreyebilmektedir (İzgür, 2010). Aynı zamanda, birçok yüzeyde biyofilm oluşturarak uzun süre boyunca canlılığını koruyabildiği bilinmektedir (Bailey ve ark., 2001).

Salmonella Paratyphi hariç diğer tüm *Salmonella* serovarları XLD agar üzerinde H₂S oluşturmaları ve laktozu fermente edememeleri yönünden MC agar üzerinde renksiz koloniler oluşturmaları ile başta *Escherichia coli* (*E.coli*) olmak üzere diğer *Enterobacteriaceae* cinslerinden ayrılmaalarında önemli bir ayırım testi olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, *Salmonella* serovarları H₂S (+) ve laktoz (-) olan *Proteus* türleri ile karıştırılmamalıdır. *Salmonella*, katalaz (+), oksidaz (-), üreaz (-), indol (-) ve VP (-), TSI (±), sitrat (+), jelatinaz (+), lysine dekarboksilaz (+) ve metil red (+) olarak biyokimyasal reaksiyon vermektedir (İzgür, 2010).

1.3. Epizootiyoloji

Salmonella, insanlarda ve hayvanlarda, gastrointestinal sistem enfeksiyonuna neden olan önemli zoonotik bir patojendir. İnsanlarda, *Salmonella* enfeksiyonunun ana kaynaklarından birini hayvansal kökenli gıdalar oluşturmaktadır. Bunlar arasında ise en önemlisinin kontamine kanatlı orijinli gıdalar olduğu bilinmektedir (Desin ve ark., 2013). Mevcut durum, beşeri sağlık sistemi üzerine büyük bir yük oluştururken, aynı zamanda başta kanatlı endüstrisi olmak üzere diğer tüm duyarlı hayvan gruplarında ciddi risk oluşturmaktadır (Callaway ve ark., 2008).

Paratifoidal *Salmonella* serovarlarının büyük çoğunluğunun konakçı spesifik olmadığı ve çiftlik hayvanlarının gastrointestinal sistemine kolonize olarak, çoğunlukla klinik belirti göstermeden enfeksiyonun seyrettiği ve kolaylıkla dışkı ile çevreye saçılabilirdiği bilinmektedir (İzgür, 2010). Çevreden çiftlik hayvanlarına *Salmonella* serovarlarının bulaşma kaynaklarının genellikle kontamine su, yem, toprak, altlık, dışkı ve barınak olduğu bilinmektedir (Rodriguez ve ark., 2006; Sanchez ve ark., 2002).

Salmonella'nın yemlerdeki varlığı Maciorowski ve ark. (2004), tarafından yürütülen araştırma ile doğrulanmıştır ve paratifoidal *Salmonella* serovarlarının ticari kümes hayvanlarına bulaşmasındaki temel faktörler arasında kanatlı yemlerinin de önemli bir rolü olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle yem hammaddelerinin açık havada kurutulması esnasında paratifoidal *Salmonella* serovarlarını taşıyan yabancı kanatlı hayvanların dışkıları ile kontamine olması sonucunda, ticari kümes hayvanlarının etkene maruz kaldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, yem silolarında başta insan hareketleri olmak üzere, yem taşımada kullanılan araç, alet ve ekipmanlarının, kemirici, sürüngen ve haşere hareketlerinin, *Salmonella* serovarlarının taşınmasında ve bulaşmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir (İzgür, 2010).

Ticari kanatlı sürülerde paratifoidal *Salmonella* serovarları taşıyan hayvanların, kısa süre içerisinde tüy, deri ve yumurtalarının etken ile kontamine olması kaçınılmazdır. Etlik piliç olarak yetiştirilen sürülerin kesime sevk edilmesi ile mevcut etken, kesimhane süreçlerinin tüm aşamalarını kontamine edebilmektedir. Benzer şekilde, paratifoidal *Salmonella* serovarlarının yumurta kabuğuna bulaştığı ve çok iyi adapte olduğu (Braden, 2006) ve yumurta kabuğunun, insanlara *Salmonella* bulaştırmada majör kaynak olduğu bildirilmiştir (Anon, 2013).

İnsanlarda, paratifoidal *Salmonella* enfeksiyonları genellikle gastrointestinal sistem bulguları ile sınırlıdır ancak bazı durumlarda, enfeksiyon şiddetli bir klinik tablo şeklinde seyrederken, hastaneye yatış ve uzun süreli antibiyotik tedavisi gerektirebildiği, morbidite ve mortalite prevalansının arttığı, çoğu serovara karşı koruma sağlayan aşılama stratejilerinin yetersiz kaldığı, güncel bir küresel sağlık sorunu olarak devam ettiği bilinmektedir (Feasey ve ark., 2012; Hall, 2010). Bu durumun, geçmişten günümüze kadar çiftlik hayvanlarında enfeksiyonların tedavisi için antibiyotiklerin akılcı olmayan şekilde ve büyütme faktörü olarak kullanılması sonucu olduğu düşünülmektedir (Davis ve ark., 2002; Su ve ark., 2004).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'nın 2017 yılı verilerine göre, ABD'de her yıl yaklaşık 1,5 milyon kişinin kontamine gıda orijinli *Salmonella* enfeksiyonuna yakalandığı, 26.500 kişinin hastaneye yatışına ve 420 kişinin ölümüne neden olduğu, tedavi maliyetlerinin ise 3 milyar dolara yakın olduğu bilinmektedir. ABD'deki insan salmonellozisinin asıl nedeninin kontamine tavuk, hindi veya yumurta tüketimine bağlı olduğu bildirilmiştir (Callaway ve ark., 2008). European Food Safety Authority (EFSA)'nın 2019 yılı verilerine göre ise *Salmonella*, gıda kaynaklı patojenler arasında Avrupa'da her yıl yaklaşık 88.000 kişiyi etkileyen ve en çok rapor edilen ikinci zoonotik hastalık olduğu bilinmektedir. Yumurtaların saklama süresinin uzatılmasının, *Salmonella* orijinli enfeksiyon risklerini arttırdığı ve Avrupa'da yumurta kaynaklı salgına neden olduğu bilinmektedir (Anon, 2019).

1.4. Patogenez

Salmonella, bağırsak epitel hücrelerini koruyan fizikokimyasal engellerin üstesinden geldikten sonra, Payer's plakları üzerindeki M-hücreleri ve enterositlerin invazyonuyla veya enterositler arasındaki tight junction boşluklarından bağırsak epitel bariyerini geçmektedir. M-hücreleri, seçici olarak mikroorganizmaları örnekleyen özel hücrelerdir. Bağırsaklar boyunca M-hücreleri tarafından salgılanan bir jel olan müsin ile bakterilerin enterositlere adhezyonu fiziksel olarak azaltılmaktadır. Bu müsin jeli, enterositleri korumaya yarayan çözünmez bir mukoza bariyeri sağlamaktadır. Bunların yanı sıra, Paneth hücreleri tarafından bakterileri kimyasal olarak inaktive etmek üzere antimikrobiyal defensinler salgılanmaktadır. Bunlar arasında başlıca en önemli görevi lizozim enzimi üstlenmektedir. Lizozim, bakteri hücre duvarı yapısında bulunan peptidoglikan tabakayı enzimatik reaksiyonla lize etmesi yönüyle antimikrobiyal özellik göstermektedir. Ancak, Gram-negatif bakteriler, periplazmik boşluğunda yapısal olarak barındırdığı lizozimaz enzimi sayesinde, lizozim enzimini katalizleyerek, peptidoglikan tabakaya zarar gelmesini engellemektedir (Johansson ve Hansson, 2016; Pelaseyed ve ark., 2014).

Salmonella'nın M-hücrelerine girişini takiben, çok hızlı bir şekilde hücrenin apoptozu indüklenmektedir. Bununla birlikte M-hücrelerinin bazolateral yüzeyinde bulunan Toll-Like Reseptör-5 (TLR5) yoluyla, makrofajlar tarafından fagosite edilmesinin indüklendiği ve bağırsakların subepitelyal bölgesinde yer alan antijen sunan hücrelerin (APC) de aktive olduğu bilinmektedir. Makrofajlar, fagosite edilmiş bakterilerin elimine edilmesinde ve lokal sitokin salgılanmasında önemli rol üstlenmektedir. Dendritik hücrelerin de mezenterik lenf düğümlerine göçün ardından koruyucu adaptif immun yanıtın temel aktivatörü olarak önemli roller üstlendiği bilinmektedir (Galan, 1996).

Salmonella, non-fagositik hücrelere adhezyon ve invazyon yeteneği geliştirmiştir. Özellikle enterositleri kullanarak, karaciğere ve dalağa kolonize olmak üzere sistematik bir virulans faktörü repertuarı geliştirdiği bilinmektedir (Biedzka-Sarek ve El Skurnik, 2006). Başta konak hücreye adheze ve invaze olabilmek için konakçı hücre membranı üzerinde bulunan spesifik reseptörlere bağlanan dış membran proteinlerini eksprese etmektedir (Cossart ve Sansonetti, 2004). *Salmonella*'nın non-fagositik hücreye adhezyonu ile birlikte tip-III sekresyon sistemi olarak adlandırılan, bir dizi bakteriyel efektör proteini özel bir organel aracılığı ile konak hücre sitoplazmasına aktarılmaktadır. Tip-III sekresyon sistemi tarafından konak hücreye aktarılan *SipA* ve *SptP* proteinleri aracılığı ile hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi sağlanmaktadır. *Salmonella* tarafından uyarılan hücresel yanıtlar kısa sürelidir ve bakterinin konak hücreye girişinden hemen sonra konak hücrenin normal yapısına kavuşması sağlanmaktadır. Bu süreçler, bakteri ve konak hücre arasındaki hassas bir etkileşimin sonucu olarak yorumlanmaktadır (Galan ve Zhou, 2000).

Salmonella genomunda, virulans faktörlerini kodlayan, *Salmonella* Patojenite Adaları (SPI) olarak adlandırılan gen sekansları bulunmaktadır. SPI-I, *Salmonella*'nın adhezyonu ve invazyonu için gerekli genleri barındırırken (Galan, 1996), SPI-II'nin ise *Salmonella*'nın hücre içerisinde hayatta kalmasında rol oynayan gerekli genleri barındırdığı bilinmektedir (Shea ve ark., 1996).

Hem SPI-I hem de SPI-II, bakteriyel proteinleri ökaryotik hücrelere aktarabilmek için özel olarak tip-III sekresyon sistemi (T3SS) gelişmiştir. Konakçı hücreye bakteriyel temas anında, translokunun konak hücre plazma membranına girmesi indüklenir ve T3SS tetiklenerek efektör proteinlerin konak hücre sitoplazmasına hızlı ve doğrudan aktarılması sağlanmaktadır (Galan, 1996). *Salmonella* tarafından evrimsel olarak korunan bu sekresyon sisteminin, bakteriyel virulans faktörlerinin konak hücreye translokasyonuna aracılık ettiği bilinmektedir (Galan ve Wolf-Watz, 2006). Her bir bakterinin, 10 ile 100 arasında birleştirilmiş T3SS'yi ve serbest bırakılmaya hazır efektör bir molekül havuzunu eksprese ettiği bilinmektedir (Schlumberger ve ark., 2005). Bunun yanısıra, T3SS'ye aracılık eden *AvrA*, *SipA*, *SipB*, *SipC*, *SipD*, *SlrP*, *SopA*, *SopB/SigD*, *SopD*, *SopE*, *SopE2*, *SptP* ve *SspH-1* olmak üzere en az 13 protein tanımlanmıştır (Galan, 1996).

1.5. Laboratuvar Tanısı

Salmonella'nın doğru ve hızlı tanısı, bütün canlılarda olduğu gibi kanatlı sürülerinde de önem arz etmektedir. Kanatlı hayvanlarda *Salmonella*'nın teşhisinde ISO 6579-1 standart izolasyon metodu kullanılmaktadır ve prensip olarak ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme, selektif besiyerlerinde kültüre etme ve şüpheli kolonilerin konfirmasyonu amacıyla biyokimyasal ve serolojik analizler olmak üzere 4 temel aşamadan oluşmaktadır (Anon, 2017; Sareyyüpoğlu, 2010).

Somatik-O antijeni, *Salmonella*'nın hücre duvarında bulunan lipopolisakkarit yapının ısıya dayanıklı bir polisakkaritidir. Yapısındaki şeker birimlerindeki varyasyonları ile şeker birimleri arasındaki kovalent bağların varyasyonları sonucunda farklı somatik-O antijenleri ortaya çıkmaktadır (D'Aoust ve Maurer, 2007). Somatik-O antijeninin tanımlaması ile serovar düzeyinde gruplandırılır (Nataro ve ark., 2007).

Flagellar-H antijeni, hareketli bakterilerin flagella yapısında yer alan, protein yapılı bir moleküldür. *Salmonella* serovarları, flagellin proteinlerini monofazik ya da difazik olarak ifade edebilmektedir. Difazik izolatlar, her kültürde yalnızca bir fazın flagellar-H antijenini ifade etmektedir. *Salmonella* serovarları, ilk olarak flagellar-H antijenini çoklu olarak tanıyan Poly-H antiserumu ile analiz edilmektedir. Daha sonra flagellar-H antijenini spesifik olarak tanımlayan tekli H faktörü antiserumu lam aglütinasyon testi ile uygulanarak flagellar-H serogruplandırması yapılmaktadır (Nataro ve ark., 2007).

Günümüzde, *Salmonella*'nın teşhisinde standart metot olarak ISO 6579-1 konvansiyonel tanı metodu kullanılabildiği gibi yeni nesil moleküler tanı ve tiplendirme metotlarının da yenilikçi yaklaşımlar sunduğu bilinmektedir. Moleküler tanı ve tiplendirme metotlarının geldiği son aşama göz önünde bulundurulduğunda, konvansiyonel tanı ve tiplendirme metotlarına göre yüksek sensitivite ve spesifite gösterdiği, daha hızlı olduğu, dolayısıyla *Salmonella* serovarlarının teşhisinde laboratuvar ve saha çalışmalarında önemli avantajlar sağlayacağı düşünülmektedir (Anon, 2017; Sareyyüpoğlu, 2010).

1.6. Koruma ve Kontrol Stratejileri

Günümüzde birçok gelişmiş ülkede, insanlarda gözlemlenen yüksek salmonellozis insidansının, kontamine kanatlı orijinli gıda kaynakları nedeniyle meydana geldiği bilinmektedir. Kanatlı endüstrisinde üretimin tüm aşamalarında kullanılan ileri teknoloji, gelişmiş biyogüvenlik ve sanitasyon uygulamalarına rağmen *Salmonella* enfeksiyonları insan ve hayvan sağlığı için önemli bir tehdit olmaya devam etmektedir (Hafez, 2010). Kontrol programları dahilinde alınan önlemler sayesinde *Salmonella*'nın insanlar için oluşturmuş olduğu enfeksiyon risk faktörleri azaltılabilmektedir (Howard ve ark., 2012).

Ülkemiz de dahil olmak üzere gelişmiş ülkelerde *Salmonella* kontrol programlarının uygulandığı bilinmektedir. Bu ve benzeri uygulamaların, yalnızca işletme düzeyinde kalmayıp, aynı zamanda ülkelerde hükümetler düzeyinde sistematik olarak yürütülmesi gerekmektedir. Buradaki temel amaç ortak olup, *Salmonella*'nın kanatlı hayvanlarda ve kanatlı orijinli hayvansal ürünlerde, üretimden tüketime kadar olan süreçlerin tamamında bulaşma kaynaklarının analizi ve kontrol önlemleri ile kontamine gıdaların engellenmesidir (Akan, 2010; Hafez, 2010).

Salmonella kontrol programlarının başarısı, birincil yetiştirici düzeyinde başladığı ve korunduğu sürece tüm üretim zinciri boyunca sağlıklı bir şekilde ilerlediği bilinmektedir. Damızlık tesislerine giren enfeksiyonları önlemek ve dolayısıyla kuluçkahanede negatifliğin kusursuz sürdürülmesini sağlamak hayati önem arz etmektedir (Hafez, 2010). Modern üretim tesislerine sahip kanatlı işletmelerinde, gıda kaynaklı enfeksiyonların önlenmesinde koruma ve kontrol programlarının sürdürülebilir ve izlenebilir olmasının, insanlarda *Salmonella* enfeksiyonlarının kontrolünde önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir (Akan, 2010).

Kanatlı hayvanlarda, *Salmonella* serovarlarının prevalansını azaltmaya yönelik *Salmonella* kontrol ve müdahale stratejileri planlanırken mutlak etkili önlemlere ihtiyaç vardır (Callaway ve ark., 2008). Kapsamlı bir *Salmonella* kontrol stratejisinin parçası olarak diğer kontrol önlemleriyle birlikte kanatlı hayvanların aşılansısı, sürülerde *Salmonella* prevalansını düşürmede önemli bir stratejidir ve insanlarda kanatlı orijinli *Salmonella* enfeksiyonlarında azalmayı sağlayacağı düşünülmektedir (Desin ve ark., 2013; Gast, 2007). Aşılama uygulamaları ve temel biyogüvenlik uygulamaları başta olmak üzere, probiyotik mikroorganizmalar ve bakteriyofaj kullanılması, canlı hayvanlarda *Salmonella spp.*'yi azaltabilecek stratejilerin temelini oluşturmaktadır. Bu süreçlerin tamamında hayvanların ekolojisinin de dikkate alınması gereken kritik bir faktör olduğunu unutulmamalıdır (Callaway ve ark., 2008).

Salmonella spp.'nin kontrolü üzerine yürütülen aşılama stratejilerinde, temel olarak kanatlı hayvanların bağışıklık sisteminden yararlanılmaktadır. Genel olarak yaşam süresi 5-6 hafta kadar olan broiler sürülerinde aşılama stratejileri, *Salmonella*'ya karşı korumada benzersiz bir zorluk teşkil etmektedir. Cıvcıvlerin ilk hafta aşılınması, bağışıklık sistemleri tam olarak gelişmediği için yeterince etkili değildir. Damızlık sürülerde uygulanacak *Salmonella* aşılarının ise sürülerde koruyucu bağışıklığı oluşturacağı ve sonraki nesile aktarılabilen koruyucu bağışıklığı sağlayacağı düşünülmektedir (Beal ve Smith, 2007; Van Immerseel ve ark., 2005).

1.7. Kanatlı Hayvanlarda *Salmonella* Aşıları

Kanatlı hayvanlarda kullanılacak ideal *Salmonella* aşılardan, güvenilirlik, antijenik çapraz koruyuculuk ve tüm türlerde *Salmonella* enfeksiyonunun kontrolü için önemli olduğu düşünülen hücresel bağışıklığı indüklemesi beklenmektedir. Bunların yanı sıra, hem lokal hem de sistemik enfeksiyona karşı etkili koruma sağlamalı, hayvanlar ve insanlar için virulansı zayıflatılmış olmalı, bağırsakta kolonizasyon inhibisyonunda etkili olmalı, çevresel kontaminasyon ile yumurta enfeksiyonunu azaltmada etkinlik göstermeli, teşhis ve analiz yöntemleriyle uyumlu olmalı, uygun maliyetli ve kolay ulaşılabilir olmalıdır. *Salmonella* aşıları subünit, inaktif ve canlı attenüe aşılar olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Barrow, 2007; Barrow ve ark., 1999; Pritchard ve ark., 1978; Van Immerseel ve ark., 2005).

Subünit *Salmonella* aşılarının, geçmişten günümüze kadar geçen süreçte kanatlı hayvanlarda *Salmonella* prevalansını azaltmada başarılı bir rol üstlendiği bilinmektedir (Khan ve ark., 2003; Li ve ark., 2020; Meenakshi ve ark., 1999). Subünit *Salmonella* aşılarının yalnızca spesifik antikor oluşumunu değil, aynı zamanda güçlü bir hücresel immun yanıtı da indüklediği bilinmektedir. Kanatlı hayvanlarda

kullanılmak üzere geliştirilen adjuvanlı subünit *Salmonella* aşıları çoğunlukla dış zar proteinlerini (OMP) ve dış zar veziküllerini (OMV) kapsamaktadır (Li ve ark., 2020).

Li ve ark. (2020), tarafından yakın zamanda yürütülen bir araştırmada, *S. Enteritidis* OMP+QuilA adjuvanlı formunda hazırlanan bir subünit aşısı ile birlikte *S. Enteritidis* OMV subünit aşılarının ayrı ayrı uygulandığı sürülerde, *S. Enteritidis* kolonizasyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Khan ve ark. (2003), tarafından yapılan başka bir araştırma çalışmasında, *S. Enteritidis* OMP'leri ile hazırlanan bir subünit aşısının deri altı aşılama yolu ile uygulandığı kanatlı sürülerinde, bağırsak mukozasındaki *S. Enteritidis* kolonizasyonunu 10^3 CFU/g azalttığı bildirilmiştir.

Fadl ve ark. (2002), tarafından yürütülmüş bir araştırma çalışmasına göre ise *Salmonella* OMP subünit aşılarının, bağırsak epitelyal hücrelerine *Salmonella* serovarlarının bağlanmasını engellemede etkin bir rol oynadığı gösterilmiştir. Araştırma çalışmasının sonuçlarına göre, kanatlı endüstrisinde OMP ve OMV subünit aşılarının potansiyel bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir (Li ve ark., 2020).

İnaktif *Salmonella* aşılarının, kanatlı hayvanlarda serovara özgü olmayan *Salmonella* enfeksiyonlarını kontrol etmek için başarı ile kullanıldığı bilinmektedir. Bunlar otolog aşılar olarak, yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Liu ve ark., 2001). Otolog aşılar, *Salmonella* aşılamaalarında çok az pratik öneme sahip olmasına rağmen, Liu ve ark. (2001), tarafından yakın zamanda yapılan çalışmalarda, mortalite oranlarını azaltmak için kullanılabileceği konusunda önemli gözlemler elde edilmiştir. Benzer şekilde McCapes ve ark. (1967), tarafından yürütülen bir araştırma çalışmasında, inaktif *Salmonella* aşıları ile aşılanan damızlık sürülerde mortalite oranının azaldığı konusunda olumlu sonuçlar bildirilmiştir. Damızlık sürülerde gözlemlenen mortalitedeki bu düşüşün, *Salmonella*'nın organ kolonizasyonundaki azalma ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Liu ve ark., 2001).

İnaktif *Salmonella* aşıları, zayıf immünojeniktir, polimorfnükleer hücreleri, sitotoksik-T lenfositleri indükleyemez ve konakçı immun sistemi tarafından hızla elimine edilebilir (Nagaraja ve Rajashekara, 1999; Van Immerseel ve ark., 2005). İnaktif *Salmonella* aşıları ile ilgili yapılan araştırmalarda, kanatlı hayvanların bağırsaklarında *Salmonella*'nın kolonizasyon inhibisyonunda ve dışkıda etkenin saçılması üzerine değişken veriler elde edilmiştir (McCapes ve ark., 1967).

Belirli bir *Salmonella* serovarına karşı geliştirilen canlı aşılardan, serovara özgü koruyucu bağışıklığı güçlü bir şekilde indüklediği bilinmektedir (Barrow ve Wallis, 2000; Smith, 1956). Bununla birlikte, serovar spesifik geliştirilen *Salmonella* aşılarının, hedeflenen serovar dışındaki *Salmonella* serovarlarına karşı değişken oranlarda başarı sağladığı tespit edilmiştir. Serovarlar arasında ortaya çıkan bu farklılıkların açıklanmasında başta immun sistemin yanıtı ile birlikte bu farklılıkları açıklayabilen farklı immunolojik ve epidemiyolojik patojenite kalıplarının olduğu düşünülmektedir (Barrow, 2007).

Başlangıçta bir *Salmonella* serovarına karşı profilaktik kullanım için tescil edilmiş canlı bir *Salmonella* aşısının (Smith, 1956), aynı serogrubun başka bir serovarına karşı çapraz koruma sağladığı gösterildiğinden bu yana, serovarlar arasında çapraz koruma olduğuna dair genel fikir birliği bulunmaktadır ve son yıllarda aynı veya çapraz serovarlara karşı koruma daha kapsamlı bir şekilde test edilmektedir (Barrow ve ark., 1991; Parker ve ark., 2001). Feberwee ve ark. (2001), tarafından yürütülen geniş çaplı bir saha araştırma çalışmasında, *S. Gallinarum* 9R aşısı suşu ile aşılanan kanatlı sürülerinde, *S. Enteritidis* prevalansının %11,5'ten %2,5'e gerilediği bildirilmiştir. Yine *S. Gallinarum* 9R aşısı suşu ile aşılanmış sürüden elde edilen 4500 yumurtada ise hiçbir aşısı suşu tespit edilmemiş ve aynı zamanda aşısı suşunun fekal saçılımında bakteri izole edilememiştir (Feberwee ve ark., 2001).

Canlı *Salmonella* aşılarının, immun sistemi aktif bir şekilde uyarak lenfosit proliferasyonunu arttırmada daha etkili olduğu gösterilmiştir (Babu ve ark., 2003). Ayrıca, oral olarak uygulanan canlı *Salmonella* aşılarının, kolonizasyon inhibisyonunu ve bağırsakta polimorfonükleer hücrelerinin uyarılması gibi ek koruyucu etkileri olduğu da bilinmektedir (Van Immerseel ve ark., 2005). Canlı *Salmonella* aşıları üzerine yürütölen çalışmalarda, oral aşılamadan saatler sonra koruyucu bağıışıklığın yüksek derecede indüklendiğı gösterilmiştir (Field ve ark., 1955; Smith, 1956). Bunun yanı sıra, kanatlı hayvanlara oral olarak uygulanan canlı *Salmonella* aşıları ile iç organlarda kolonizasyon inhibisyonunun, aktive olan polimorfnükleer hücreler tarafından kuvvetli bir şekilde elimine edilebilir olduğunu düşünölmektedir (Barrow, 2007).

Canlı *Salmonella* aşıları, diğ er aşı formlarına göre çeşitli avantajlar sunmaktadır. Bunların başında mukozal bağıışıklığı uyarmaya ek olarak, humoral ve hücrel bağıışıklığı da uyardığı bilinmektedir (Gayet ve ark., 2017). İdeal canlı *Salmonella* aşılarında olması gereken en önemli kriter belirli bir serovara karşı geliştirilen canlı *Salmonella* aşısının, serovara özgü koruyucu bağıışıklığı güçlü bir şekilde indüklemesidir (Barrow ve Wallis, 2000; Smith, 1956). Bunun yanı sıra, hem mukozal hem de sistemik enfeksiyona karşı etkili koruma sağlamalıdır, hedef canlı türü için patojenitesinde zayıflama sağlanmış olmalıdır, bağırsak kolonizasyonunu azaltmada, dolayısıyla çevre ve yumurta kontaminasyonu azaltmada etkili olmalıdır, *Salmonella* kontrol programlarıyla uyumlu olmalıdır ve uygulama maliyetleri uygun olmalıdır (Barrow, 1999; Pritchard ve ark., 1978).

Canlı *Salmonella* aşılarının etkinliğı, aşılama ve deneysel enfeksiyondan sonra, bağırsak ve sistemik kolonizasyon derecesi ile birlikte morbidite ve mortalite oranları ile değ erlendirilmektedir. Morbidite ve mortalite oranları serovara göre değ iş se de, çoğ u serovarda her zaman bağırsak mukozasında ve retikölo-endotelyal sisteme invaze olduğu bilinmektedir (Barrow, 2007).

Günümüzde canlı *Salmonella* aşılarının kullanımı için Avrupa'da yalnızca birkaçı ticari olarak kayıtlıdır. Temin edilebilen canlı *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* aşılarının, kimyasal mutagenез metodu ile geliştirilen (Meyer ve ark., 1993; Springer ve ark., 2000) ya da metabolik yolak mutasyon metodu ile geliştirilen oksotrofik mutantlar olduğu bilinmektedir (Hahn, 2000; Linde ve ark., 1997; Vielitz ve ark., 1992). Moleküler yöntemlerle karakterize edilerek geliştirilen mutant suşlar, temel bakteriyel enzimlerdeki veya metabolik regülasyon merkezlerindeki negatif mutasyonlardır (Schwarz ve Liebisch, 1994). Mutant aşı suşları, uzun metabolik süreçlere ve virülansta gerilemeye neden olarak elde edilmiştir (Linde ve ark., 1997) ve gerçekleştirilen genetik mutasyonun türüne bağlı olarak, kanatlı hayvanlarda indüklenen immun yanıt farklılık gösterebilmekte, patojenlere karşı kolonizasyon inhibisyon etkisinin de farklı olacağı bilinmektedir (Mastroeni ve ark., 2000).

Canlı *Salmonella* aşı aday suşlarının elde edilmesinin temelinde, virülans faktörlerini kodlayan gen bölgelerinin delesyon mutasyonları veya bakteriyel metabolik yolak mutasyonları ile zayıflatılması sağlanırken, immünojenitesi için gerekli olan temel belirleyicilerin ekspresyonunun etkilenmeden, bakteriyel canlılığın korunması temel hedefler arasındadır (Cooper ve ark., 1990; Cooper ve ark., 1994; Klose ve Mekalanos, 1997).

Bakterilerde zayıflatılmış canlı aşılar oluşturmak için kullanılan ilk yöntem kimyasal mutasyon yöntemidir. Bu yöntemde, bakteriler mutagenез bir kimyasala maruz bırakılarak, spontan gelişen mutasyona bağlı olarak elde edilen mutant suşlar belirlenir ve seri pasajlar yapılarak aşı aday suşu hatları elde edilmektedir (Tennant ve Levine, 2015). Germanier ve Fuer (1975), tarafından geliştirilen ve insanlarda kullanılan lisanslı bir *Salmonella* Typhi aşısı olan Ty21a, kimyasal mutasyon yöntemi ile spontan oluşan *gale* mutantları elde edilmiştir. Bu *gale* mutantlarının, Uridine Diphosphate Galactose 4-Epimerase (GALE) aktivitesinden yoksun olduğu tespit edilmiş, glikoprotein ve glikolipid sentezinde bir ilk adım olan galaktoz yokluğunda lipopolisakkarit üretiminin oluşmadığı tespit edilmiştir (Germanier ve Fuer, 1975).

Kimyasal mutasyon yönteminin oldukça basit bir prosedür olduğu bilinmektedir. Oluşan kimyasal mutasyon, mutant bakteri için ölümcül bir etki oluşturmuyor ise aşı adayı olarak kullanıldığında oldukça etkili sonuçlar alınması mümkün olabilmektedir. Ancak, kimyasal mutasyon yönteminin bazı dezavantajları olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında en sık karşılaşılanı, bakteriyel genomun, herhangi bir sekans bölgesinde, istenilen mutasyona ek mutasyonların meydana gelebilmesidir. Bu nedenle çoğu zaman oluşan mutasyonlar ile birden fazla kombinasyon meydana gelebilmektedir (Hone ve ark., 1988; Kopecko ve ark., 2009).

Moleküler biyoloji ve genetik biliminin gelişmesi ile birlikte hedeflenen gen sekansına mutasyonlar yapılarak zayıflatılmış canlı mutant aşı aday suşlarının elde edildiği ve aynı zamanda mutant bakterilerde oluşan mutasyonların genetik olarak doğrulanabildiği bilinmektedir (Tennant ve Levine, 2015). Bu da, zayıflatılmış canlı mutant aşı aday suşlarındaki mutasyonun konfirmasyonunda kesin veriler elde edilmesini sağlamaktadır (Tacket ve ark., 1992).

Hedeflenen mutasyon sekansına bağlı olarak, elde edilen mutant suşlar zayıflarken, virulans özelliklerini koruduğu bilinmektedir (Tacket ve ark., 1992). Başlıca hedeflenen mutasyon alanları ise lipopolisakarit biyosentezinde yer alanlar da dahil olmak üzere şeker metabolizmasının düzenlenmesi (*galE*), dış membran proteinlerinin regülasyonu (*ompR*), aminoasit ya da purin biyosentezinin regülasyonu (*aro*, *pur*, *guaB*), karbon kaynağı kullanımının regülasyonu (*cya*, *crp*) ve bakteriyel virulansa rol oynayan (*htrA*, *phoPQ*, *recA*, *waaN*) birtakım genlerin mutasyonu yer almaktadır (Mastroeni ve ark., 2000).

Salmonella suşlarının mutasyon çalışmalarında sıklıkla *aro*, *htrA*, *SsaV*, *phoP*, *cya*, *crp*, *clpPX*, *spoT*, *cdt*, *fur*, *gidA*, *wecA* genleri üzerinde mutasyon çalışmaları yürütülmektedir. *htrA* mutantlarının, makrofajlarda azalmış hayatta kalma ve

virulansta azalma etkileri görülürken, koruyuculuğunu sürdürdüğü bilinmektedir (Chatfield ve ark., 1992; Lowe ve ark., 1999). *SsaV* mutantları, *Salmonella*'da zayıflatıcı bir mutasyon olarak kullanılmıştır. *SsaV* geni, virulansta rol oynayan SPI-2'de T3SS üzerinde kodlanmıştır (Shea ve ark., 1996). *SsaV* mutantları, SPI-2 efektör proteinlerini salgılayamaz (Nikolaus ve ark., 2001) ve makrofajlarda azalmış hayatta kalma özelliği göstermektedir (Cirillo ve ark., 1998).

PhoP geni, sitoplazmik bir transkripsiyon düzenleyicidir. Bu genin, bakterilerin makrofajlarda hayatta kalmasına ve antimikrobiyal peptitlere direncine katkıda bulunduğu bilinmektedir (Groisman ve ark., 1989). *Salmonella*'nın *phoP* mutantlarının avirulenttir ve klinik öncesi çalışmalarda koruyucu bir immun yanıt oluşturduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra, *PhoP* mutantlarına, *aroA* geninin mutasyonu da eklendiğinde, oluşan metabolik yolak mutasyonları ile aşı suşlarının daha da zayıflatılmasının faydalı olacağını düşünülmektedir (Miller ve ark., 1993). *Cya* geni, adenilat siklaz sentezi için gereklidir ve *crp* geni, cyclic AMP (cAMP) reseptör proteinini kodlamaktadır. cAMP ve cAMP-reseptör proteini, metabolitlerin taşınması dahil olmak üzere temel hücresel süreçler için gerekli olduğu bilinmektedir (Alper ve Ames, 1978). *cya* ve *crp* mutantları ile oluşturulan aşı suşlarının, çeşitli hayvan denemelerinde avirulent olduğu ve immunojenik özelliklerini koruduğu tespit edilmiştir (Curtiss ve Kelly, 1987).

clpPX geni, flagella regülatörü olan FlhD/FlhC'yi inhibe eden bir proteazı kodlamaktadır. *clpPX* geni olmadığında, hücrede FlhD/FlhC birikir ve büyük miktarlarda flagellin üretilir. Üretilen bu flagellin, konjuge aşılarda taşıyıcı protein olarak kullanılmak üzere mutant *clpPX Salmonella* suşlarından oldukça fazla miktarda saflaştırılmaktadır (Tennat ve ark., 2011). *spoT* mutanı, SPI-I virulans geninin ekspresyonu için önemli bir sinyal olan “*ppGpp*” üretemeyen zayıflatılmış canlı aşı adayı olarak, farelerde yapılan denemelerde avirulent ve immunojen olarak bağışıklamada etkili olduğu bildirilmiştir (Song ve ark., 2004).

Zayıflatılmış canlı *Salmonella* suşlarını oluşturmak amacıyla mutasyon ile silinen diğer genler arasında *cdt* (colonization of deep tissue), *fur* (ferric uptake regulator), *gidA* (encodes a glucose-inhibited division gene), *wecA* (Production of Enterobacterial Common Antigen) ve *rpoS* (The Alternative Sigma Factor) genleri yer almaktadır (Coynault ve Norel, 1999). Bakterilerde mutasyon ile genlerin silinmesinin yanısıra, “Zayıflatılmış Gen İfadesi” (Attenuated Gene Expression - AGE) adı verilen bir yöntem kullanılarak, flagella ve pilus gibi bakteriyel yüzey ajanlarının aşırı ifade edilmesi yoluyla, bakterilerin zayıflaması sağlanmaktadır (Pascual ve ark., 2013).

Canlı *Salmonella* aşı suşlarında hangi tür mutasyon yapılırsa yapılsın, koruyucu bağışıklığı yeterince uyarabilmesi için aşı suşlarının adhezyon ve invazyon yeteneklerinin korunması oldukça önem arz etmektedir. Aynı zamanda, canlı *Salmonella* aşı suşları, etlik piliçlerde kesim yaşından önce, yumurtacı ve damızlık piliçlerde ise yumurtlama başlangıcından önce aşı suşlarının doku ve organlardan elimine olması gerekmektedir. Bu nedenle canlı *Salmonella* aşı suşları geliştirilirken, konakçı dokularda hayatta kalmasını kolaylaştıran genlerin mutasyonu ile geliştirilmesi ve genetik modifikasyonlar ile adaptif immun yanıtı indüklemek ve çevresel riskini azaltmak temel hedefler arasındadır (Mastroeni ve ark., 2000).

1.8. *aroA* Mutant Canlı *Salmonella* Aşı Aday Suşunun Geliştirilmesi

Salmonella suşlarında aromatik amino asit biyosentez yolağında rol oynayan *aroA*, *aroC* ve *aroD* gibi genlerin silinmesi ile oksotrofik bakteriler oluşturulabilmektedir. *aro* geninin mutasyonu ile oluşturulan oksotrofik *Salmonella* mutantlarının, hayvanları enfeksiyon etkenine karşı koruyabilen sağlam bağışıklık tepkileri ortaya koyduğu çok sayıda klinik öncesi çalışma ile bildirilmiştir (Eisenstein ve ark., 1984; Harrison ve ark., 1997; Killar ve Eisenstein, 1985). Kanatlı hayvanlarda

yürütülen klinik çalışmalarda ise *aroA* mutantlarının, saha suşu ile enfekte olmuş kanatlı hayvanlarda etkili bir şekilde koruyucu olduğu bildirilmiştir (Barrow ve ark., 1990; Cooper ve ark., 1990).

aroA geni, korismat biyosentez yolağı olarak da bilinen şikimat yolağının altıncı basamağını katalize eden, 48.000 kDa moleküler ağırlığına sahip, monomerik bir enzim olan *5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate-sentaz (EPSP-sentaz)* isimli enzimi kodlamaktadır. *aroA* geninin mutasyonu yoluyla, fenilalanin, trisin ve triptofan gibi temel aromatik amino asitlerin ve diğer aromatik metabolitlerin prekürsörü olarak rol oynadığı bilinen korismat öncesi yolak bozularak korismat sentezlenemez. Dolayısıyla mikroorganizmaların metabolizmaları için bir ön koşul olan aromatik amino asitlerin sentez yolağı bozulmuş olur. Bu sayede, oksotrofik mutantların yapımı, canlı aşı potansiyeli sergileyen, rasyonel olarak zayıflatılmış aşı aday suşlarının üretimi için popüler bir yöntem olmuştur (Dougan ve ark., 1989).

Şikimat, mikroorganizmalarda önemli bir biyokimyasal ara maddedir ve mikroorganizmaların metabolizması için önemli bir ön koşul olarak bilinmektedir (Mır ve ark., 2015). Fenilalanin, trosin ve triptofan gibi temel aromatik amino asitlerin ve diğer aromatik metabolitlerin prekürsörü olarak rol oynadığı bilinmektedir (Gibson, 1999). Aromatik amino asitlerin üretiminde ortak yol olan şikimat yolağı metabolizması, sadece mikroorganizmalarda ve bitkilerde bulunurken, memeli canlılarda bu yolağın bulunmadığı bilinmektedir (Kishore ve ark., 1988; O'callaghan ve ark., 1988). Bu nedenle memeli canlılar, diyetlerinde aromatik amino asitlerin varlığına bağımlıyken, mikroorganizmalar bağımlı değildir (Mır ve ark., 2015). Bunun yanı sıra, şikimat yolağının tüm enzimleri prokaryotik ve ökaryotik kaynaklardan saf bir biçimde elde edilmiştir ve bunların genetik çalışmaları yapılarak tümü karakterize edilmiştir (Herrmann ve Weaver, 1999). Bu değerli yolağın, mikroorganizmalara karşı geliştirilen antibiyotikler ve canlı aşılar için ulaşılması gereken önemli bir hedef olduğu bilinmektedir (Kishore ve ark., 1988; O'callaghan ve ark., 1988).

Şikimat yolağı ile Phosphoenolpyruvate (PEP) ve D-Erythrose 4-Phosphate (E4P), yedi metabolik aşamadan oluşan bir dizi reaksiyon sonunda, diğer metabolik yollar için alt tabakalar olarak hizmet edebilen dallanma noktalarının oluşumunun yanında, aromatik amino asitlerin ve birçok ikincil aromatik metabolitin öncüsü olan korismata dönüştürülür (Herrmann ve Weaver, 1999; Mır ve ark., 2015). Şikimat yolağının son ürünü olan korismat, aromatik amino asitler ve birincil metabolizmanın yanı sıra diğer birkaç aromatik bileşiğinin öncüsüdür (Dewick, 1998). Bu yolağın metabolik reaksiyon basamaklarından elde edilen ara ürünlerin veya son ürünlerin özellikleri kullanılarak, biyolojik ürünlerin, antimikrobiyal ajanların ve herbisitlerin üretilmesinde hedef bir nokta oluşmaktadır (Eykmann, 1881; Roberts ve ark., 1998).

Şikimat yolağının ilk basamağında, inorganik fosfat veren PEP ve E4P, 7-Phospho-2-Dehydro-3-Deoxy-D-Arabino-Heptonate (DAHP)'a kondensasyonu gelmektedir. İlk aşamada oluşan DAHP'in temel yapısı kimyasal sentezle doğrulanmıştır ve DAHP molekülü 1-Carboxy-2-Deoxy- α -D-glucose-6-phosphate olarak tanımlanmıştır (Garner ve Herrmann, 1984). DAHP'in enzimatik sentezi, ilk olarak *E.coli*'de keşfedilen bir enzim olan *DAHP-sentaz* tarafından katalize edilmektedir. *DAHP-sentaz*, elektroforetik homojenlikte mikroorganizmalardan saflaştırılan ilk enzim olarak bilinmektedir (Herrmann, 1983).

Şikimat yolağının ikinci basamağı, DAHP'den fosfatın elimine edilmesi reaksiyonundan 3-Dehidrokinat (3-Dehydroquinic Acid, DHQ) elde edilir. Bu reaksiyon, moleküler ağırlığı 39.000 kDa olan *DHQ-sentaz* tarafından katalize edilir. *DHQ-sentaz*, şikimat yolağının ilk basamağının reaksiyon ürünlerinden biri olan inorganik fosfat tarafından aktive edilir ve enzimle katalize edilen reaksiyon redoks nötr olmasına rağmen, aktivasyonu için katalitik miktarlarda Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NAD) gerektirmektedir (Bender ve ark., 1989; Frost ve ark., 1984).

Şikimat yolağının üçüncü basamağında, DHQ'nun dehidratasyonu, *DHQ-dehidrataz* tarafından katalize edilerek 3-Dehydroshikimate (DHS) elde edilir (Deka ve ark., 1992). Şikimat yolağının dördüncü basamağında DHS molekülü şikimata indirgenmektedir. İndirgenme reaksiyonu, moleküler ağırlığı 29.000 kDa olan Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADP)'a bağlı bir *Shikimate-Dehydrogenase* ile katalize edilmektedir (Elsemore ve Ornston, 1994). Şikimat yolunun beşinci adımında, bir önceki adımda DHS'nin indirgenmesi ile oluşan şikimatın, *Shikimate-kinase* tarafından katalize edilmesi ile Shikimate-3-Phosphate (S3P) elde edilir (Coracini ve Azevedo, 2014; Griffin ve Gasson, 1995).

Şikimat yolağının altıncı basamağında, reaksiyona ikinci bir PEP molekülü dahil olur. S3P yoğunlaştırılarak 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate (EPSP) ile inorganik fosfat elde edilir. Bu tersinir reaksiyon, 48.000 kDa moleküler ağırlığına sahip *EPSP-sentaz* tarafından katalize edilmektedir (Stallings ve ark., 1991). Şikimat yolağının ana gövdesindeki yedinci ve son basamak ise EPSP'de fosfatın trans-1,4 eliminasyonu yoluyla korismat'ın elde edilmesidir (Herrmann ve Weaver, 1999).

Aromatik aminoasitlerin sentezi ve ilişkili olduğu şikimat yolağının regülasyonu mikroorganizmalarda uzun yıllardır çalışılmakta olup yolağın basamakları oldukça iyi bilinmektedir. Aromatik amino asitlerin, mikroorganizmalarda canlılık faaliyetlerini sürdürmede hayati bir rol oynadığı gösterilmiştir ve oksotrofik mutantların elde edilmesinde, *aroA* geninin mutasyonu yaygın bir strateji olarak sıklıkla tercih edilmektedir (Mır ve ark., 2015).

Salmonella Enteritidis ve *S. Typhimurium*, dünya genelinde kanatlı hayvanlardan en sık izole edilen serovarlar olarak bilinmektedir. Ancak, *S. Kentucky*'nin de diğer serovarların yanında yaygın olarak izole edildiği bildirilmiştir (Foley ve ark., 2011).

Ülkemizde, 2014-2017 yılları arasında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ile Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi işbirliğinde yürütülmüş olan TÜBİTAK 113R036/113R037 nolu ‘Kanatlı Hayvanlardan ve Gıdalardan *Salmonella* İzlenmesi ve Kontrol Programlarının Geliştirilmesi Projesi’nin sonuç raporuna göre epidemiyolojik birim bazında broyler, hindi, damızlık, kesimhane ve altlık örneklerinde *S. Infantis*’ten sonra en sık görülen ikinci baskın serovarin *S. Kentucky* olduğu ve bunun yanısıra, yumurtacı sürülerde ise en baskın serovarin *S. Kentucky* olduğu saptanmıştır.

Dünyada *aroA* geninin mutasyonu yolu ile zayıflatılarak, canlı mutant *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* ve *S. Infantis* gibi baskın serovarlara karşı benzer araştırma çalışmalarının yürütüldüğü bilinmektedir (Felgner ve ark.,2016; Müştak ve Yardımcı, 2019; Van Immerseel ve ark., 2002).

Bu tez çalışmasında, kanatlı orijinli *S. Kentucky* suşlarından, Lambda Red rekombinasyon metodu kullanılarak *aroA* geninin mutasyonu ile canlı mutant *S. Kentucky* aşısı aday suşunun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Günümüze kadar geçen süreçte, *S. Kentucky* serovarına karşı geliştirilen inaktif aşılardan olmasına rağmen *aroA* mutant canlı *S. Kentucky* aşısı suşu geliştirilmesine yönelik bir çalışmaya yazılı literatürde rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında oluşturulan aşısı aday *aroA* mutant canlı *S. Kentucky* suşu, ülkemizde ve dünyada ilk çalışma olma niteliğindedir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. *Salmonella* Kentucky Suşu

Bu tez çalışmasında, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (AÜVF) Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bünyesinde yer alan Ulusal *Salmonella* Referans Laboratuvarı (USRL) Kültür Koleksiyonu'ndaki, 2018-2020 tarihleri arasında izole edilen ve ribotiplendirme kütüphanesinde en çok ribopaterni olan 20 adet *S. Kentucky* suşu mutasyon çalışmalarında kullanıldı.

2.1.2. Besiyerleri

Nutrient Agar (NA - Neogen®)

Formülasyon

Peptone	5,0 g/L
Meat Extract	3,0 g/L
Sodium Chloride	8,0 g/L
Agar	12,0 g/L
dH ₂ O	1000 mL

Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD - ISO 6579, Neogen®)

Formülasyon

Yeast Extract	3,0 g/L
Sodium Chloride	5,0 g/L
Xylose	3,75 g/L
Lactose	7,5 g/L
Sucrose	7,5 g/L
L-Lysine Hydrochloride	5,0 g/L
Sodium Thiosulfate	6,8 g/L
Ferric Ammonium Citrate	0,8 g/L
Phenol Red	0,08 g/L
Sodium Deoxycholate	1,0 g/L
Agar	13,0 g/L
dH ₂ O	1000 mL

MacConkey Agar (MC - Neogen®)

Formülasyon

E.D. of Casein	1,5 g/L
E.D. of Animal Tissue	1,5 g/L
Lactose	10,0 g/L
Bile Salts Mixture	1,5 g/L
Sodium Chloride	5,0 g/L
Neutral Red	0,03 g/L
Crystal Violet	0,001 g/L
Agar	13,5 g/L
dH ₂ O	1000 mL

Luria Bertani Agar (LB - Miller, Neogen®)

Formülasyon

Tryptone	10,0 g/L
Yeast Extract	5,0 g/L
Sodium Chloride	10,0 g/L
Agar	15,0 g/L
dH ₂ O	1000 mL

Luria Bertani Broth (LB - Lennox, Neogen®)

Formülasyon

Enzymatic Digest of Casein	10,0 g/L
Yeast Extract	5,0 g/L
Sodium Chloride	5,0 g/L
dH ₂ O	1000 mL

Mueller-Hinton Agar (MHA - Neogen®)

Formülasyon

Beef Extract	2,0 g/L
Acid Hydrolysed Casein	17,5 g/L
Starch	1,5 g/L
Agar	17,0 g/L
dH ₂ O	1000 mL

Semi-Solid Nutrient Agar (SSNA - ISO 6579-1, Sigma-Aldrich®)

Formülasyon

Peptic Digest of Animal Tissue	5,0 g/L
Beef Extract	3,0 g/L
Agar	4,0 g/L
dH ₂ O	1000 mL

S.O.C. Medium (Sigma-Aldrich®)

Formülasyon

Dextrose	3,603 g/L
KCl	0,186 g/L
MgSO ₄	4,8 g/L
Tryptone	20,0 g/L
Yeast extract	5,0 g/L
dH ₂ O	1000 mL

Nutrient Broth (Neogen®)

Formülasyon

Enzymatic Digest of Gelatin	5,0 g/L
Beef Extract	3,0 g/L
dH ₂ O	1000 mL

2.1.3. Supplementler

Ampisilin Supplement (Liofilchem®)

Formülasyon

Ampicillin – 2,5 mg / Vial.

Kanamisin Supplement (Liofilchem®)

Formülasyon

Kanamycin - 10 mg / Vial

Novobiyosin Supplement (Liofilchem®)

Formülasyon

Novobiocin - 10 mg / Vial

Kloramfenikol Supplement (Liofilchem®)

Formülasyon

Chloramphenicol - 50 mg / Vial

Gentamisin Supplement (Liofilchem®)

Formülasyon

Gentamycin - 50 mg/ Vial

2.1.4. Antiserumlar

Statens Serum Institute; Poly A-S+Vi Serological Confirmation Antisera, OMB Serological Confirmation Antisera, *Salmonella* O:8 Group Antisera, *Salmonella* O:20 Factor Antisera, Poly-H Serological Confirmation Antisera, HMA Multi Phase Antisera, H:i Phase Antisera, H:z6 Phase Antisera, H:i Phase Inversion kullanıldı.

2.1.5. Antibiyotik Diskleri

Amoksisilin (AML25, Oxoid™), Amoksisilin/Klavulanik Asit (AMC30, Oxoid™), Ampisilin (AMP10, Oxoid™), Ampisilin/Sulbaktam (SAM30, Oxoid™), Kloramfenikol (C30, Oxoid™), Siprofloksasin (CIP5, Oxoid™), Doksisiklin (DO30, Oxoid™), Enrofloksasin (ENR5, Oxoid™), Eritromisin (E15, Oxoid™), Florfenikol (FFC30, Oxoid™), Gentamisin (CN10, Oxoid™), Kanamisin (K30, Oxoid™), Linkomisin (MY15, Oxoid™), Metronidazol (MTZ50, Oxoid™), Neomisin (N30, Oxoid™), Oksitetrasiklin (OT30, Oxoid™), Sülfametoksazol (RL100, Oxoid™), Tetrasiklin (TE30, Oxoid™), Trimethoprim (W5, Oxoid™) kullanıldı.

2.1.6. Biyokimyasal Test Kiti ve Kimyasallar

Microgen® GnA-ID System (MID-64CE) (Lysine, Ornithine, H₂S, Glucose, Mannitol, Xylose, ONPG, Indole, Urease, V.P., Citrate, TDA). PBS-Oxoid™ #BR0014G, Glycerol %99 - Isolab #927.043, EDTA - Sigma-Aldrich #E6511.

2.1.7. Moleküler Kitler, Primerler, Kimyasallar

DNA ekstraksiyonunda Thermo Scientific™ GeneJET Genomic DNA Purification Kiti #K0721 kullanıldı. PCR amplifikasyon ürünlerinin hızlı ve verimli saflaştırılması için Thermo Scientific™ GeneJET PCR Purification Kiti #K0701 kullanıldı. Lambda-Red rekombinasyon metodunda Gene Bridges GmbH - Quick & Easy *E.coli* Gene Deletion Kit #K006 kullanıldı.

Primerler (SK-aroA-F, SK-aroA-R, SK-Neo-Csst-F, SK-Neo-Csst-R, SK-Conf-F, SK-Conf-R), Plazmidler (*pKD46-λRed*, *pKD4-Kanamisin*), SafeView™ Classic, 10xTBE Buffer (Thermo Scientific™), 2xPCR Master Mix (Thermo Scientific™), 6x DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific™), GeneRuler 100 bp Plus DNA (Thermo Scientific™), UltraPure Agarose (Invitrogen™), L-Arabinose (Sigma-Aldrich).

2.1.8. Hücre Kültürü ve Sarf Malzemeleri

Caco-2 (ATCC® HTB-37™), EMEM (ATCC® 30-2003™), FBS (ATCC® 30-2020™), Trypsin-EDTA 1X Solution (ATCC® 30-2101™), DMSO (ATCC® 4-X™), Triton™ X-100, Kloramfenikol Supplement (Liofilchem®), CytoOne T-25 Tissue Culture Flask, CytoOne 48-Well Plate, Sartorius Stedim Minisart® 0.2 µm - 0.45 µm Filtre.

2.1.9. Cihazlar ve Ekipmanlar

Thermo Scientific™ F1 Finn timer, S1 Pipet Filler, Thermo Scientific™ Micro-CL21 Mikrosantrifüj, Thermo Scientific™ Heratherm™ İnkübatör, Thermo Scientific™ Safe 2020 Class-II Biyogüvenlik Kabini, Thermo Scientific™ LP Vortex Mixer, Thermo Scientific™ Kuru Blok Isıtıcı, Thermo Scientific™ NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre, BD PhoenixSpec™ Nephelometer, Thermo Scientific™ TCA 4848 DNA Thermal Cycler, BIORAD MicroPulser Elektroporator ve GenePulser Cuvette, Invitrogen™ E-Gel™, Orion pH Metre, Nüve NC-90M sterilizatör, Hermle Z446K Soğutmalı Santrifüj, Oxoid™ AST Disc Dispenser kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Mutasyonda Kullanılacak *Salmonella* Kentucky Suşunun Seçimi

Mutasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, AÜVF Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bünyesinde yer alan USRL Kültür Koleksiyonu'ndaki 2018-2020 tarihleri arasında izole edilen *Salmonella* Kentucky suşları, DuPont™ RiboPrinter® ile 5S, 16S, 23S dizilerini kodlayan bölgelerin Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analizi ile bakteriyel genomun rRNA kodlama bölgesi PvuII restriksiyon enzimiyle kesilerek oluşturulan karakteristik bir "fingerprint" modeli ile tanımlanmış ve ribotiplendirme kütüphanesinde en çok ribopaterni olan 20 adet *S. Kentucky* suşu belirlendi. Mutasyon çalışmalarının temel gerekliliklerinin sağlanması amacıyla tüm suşlar öncelikle biyokimyasal ve serolojik analizler ile kontrol edildi. Daha sonra *aroA* gen varlığı ve ampisilin, kanamisin, neomisin, kloramfenikol duyarlılıkları tespit edilerek çalışmalarda kullanılacak en ideal suş belirlendi. Bu aşamadan sonra tüm analiz ve karşılaştırmalar mutant suş ile saha suşu arasında yapıldı.

2.2.2. Serolojik ve Biyokimyasal Analizler

Ribotiplendirme kütüphanesinde en çok ribopaterni olan 20 adet *S. Kentucky* suşunun serolojik konfirmasyon analizi White-Kauffmann-Le Minor şemasına göre, Statens Serum Institute; Poly A-S+Vi Serological Confirmation Antisera, OMB Serological Confirmation Antisera, *Salmonella* O:8 Group Antisera, *Salmonella* O:20 Factor Antisera, Poly-H Serological Confirmation Antisera, HMA Multi Phase Antisera, H:i Phase Antisera, H:z6 Phase Antisera, H:i Phase Inversion antiserumları kullanılarak lam aglütinasyon testi ile uygulandı.

S. Kentucky'nin biyokimyasal analizinde, Microgen® GnA-ID System (MID-64CE) (Lysine, Ornithine, H₂S, Glucose, Mannitol, Xylose, ONPG, Indole, Urease, V.P., Citrate, TDA) kiti kullanıldı. Biyokimyasal analizler, üretici firmanın uygulama protokolü doğrultusunda yapıldı.

Bu protokole göre;

- Serolojik confirmasyonu tamamlanan S. Kentucky suşları, NA'a pasajlanarak 37°C'de ve aerobik koşullarda 24 saat inkübe edildi.
- Microgen® GnA-ID test striplerinin inokulasyonu için 24 saat önceden pasajlanmış S. Kentucky kültüründen, 5 mL steril PBS içerisinde iyice karıştırılarak McFarland 0.5 standart değerinde süspansiyon hazırlandı.
- Test striplerinin üzerindeki koruyucu bantlar, yeniden kuyucukların üzerini kapatmak üzere, tek yönlü kaldırıldı.
- Steril pipet ile bütün kuyucuklara 100 µl bakteri süspansiyonu eklendi.
- İnokulasyondan sonra GnA-ID stribindeki siyah daire ile işaretlenmiş 1, 2, 3 ve 9 nolu kuyucuklar birer damla mineral yağ ile kapatıldı.
- Bakteri süspansiyonu, saflık kontrolü amacı ile NA ve XLD agara ekim yapılarak 37°C'de ve aerobik koşullarda 24 saat inkübe edilerek kontrol edildi.
- İnokulasyonu tamamlanan GnA-ID test stripleri, 37°C'de ve aerobik koşullarda 24 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda test striplerinin üzerindeki koruyucu bantlar kaldırılarak GnA-ID stribindeki 8 nolu kuyucuğa Kovac's ayracı, 10 nolu kuyucuğa VP-I ve VP-II, 12 nolu kuyucuğa TDA ayracı damlatılarak bir süre beklendi.
- Oluşan renk şemasına göre pozitif veya negatif olarak sonuçlar kaydedildi.
- Microgen® GnA-ID test striplerinin kalite kontrol ve performansının değerlendirilmesi amacı ile kalite kontrol suşu olan S. Enteritidis ATCC® 13076™ tercih edilerek, test suşundan bağımsız olarak sonuçları değerlendirildi.

2.2.3. Moleküler Analiz

Ribotiplendirme kütüphanesinde en çok ribopaterni olan 20 adet *S. Kentucky* suşunda mutasyon çalışmalarının temelini oluşturan *aroA* geni varlığının belirlenmesi amacı ile genomik DNA izolasyonu, *aroA* geninin moleküler analizi ve agaroz jel elektroforez ile görüntüleme basamakları uygulanarak tez çalışmasında kullanılacak ideal *S. Kentucky* suşu seçildi.

2.2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

S. Kentucky'nin genomik DNA izolasyonunda ticari olarak satın alınan "Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kiti" kullanıldı. İzolasyon protokolü olarak kit manuel kitapçığında yer alan "Gram-Negatif Bakteri Genomik DNA Saflaştırma Protokolü" uygulandı.

Bu protokole göre DNA izolasyon aşamaları sırasıyla;

- 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne 1 mL PCR Water konuldu.
- *S. Kentucky*'nin taze kültüründen 2×10^9 cfu/mL olacak şekilde mikrosantrifüj tüpüne süspanse edildi. Daha sonra mikrosantrifüj tüpü 5 dk. boyunca $5000 \times G$ 'yi geçmeyecek şekilde santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Mikrosantrifüj tüpünün dibindeki pelet 180 µL digestion solüsyonu ile yeniden süspanse edildi. 20 µL Proteinaz-K solüsyonu ilave edilerek homojen bir süspansiyon elde edinceye kadar vorteks ile iyice karıştırıldı.
- 30 dk. boyunca $56^\circ C$ 'de kuru ısı bloğu kullanılarak inkübe edildi ve aralıklarla vortekslenerek bakterilerin tamamen lize olması sağlandı.

- İnkübasyonun sonunda 20 µL Rnase-A solüsyonu eklendi ve vortekslenerek homojen bir süspansiyon elde edilinceye kadar karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda karışıma 200 µL Lizis solüsyonu ilave edildi. Homojen bir karışım elde edilinceye kadar yaklaşık 15 sn. vorteks ile karıştırıldı.
- Hemen ardından 400 µL % 50 etanol eklenip vorteks ile karıştırıldı.
- Hazırlanan lizat kit içindeki toplama tüpüne yerleştirilmiş purifikasyon kolonuna aktarıldı. Purifikasyon kolonu 6000xG'de 1 dk. süre ile santifüj edildi.
- Purifikasyon kolonu yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve 500 µL Wash Buffer-I eklendi. 1 dk. boyunca 8000xG'de santrifüj edildi.
- 500 µL Wash Buffer-II purifikasyon kolonuna eklendi. 3 dk. boyunca maksimum hızda (≥ 12000 xG) santrifüj edildi.
- Toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte atıldı ve purifikasyon kolonu steril 1,5 ml'lik mikrosantifüj tüpüne yerleştirildi.
- Genomik DNA'yı elde etmek için, 100 µL Elution Buffer, purifikasyon kolonunun zar merkezine eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edildi ve daha sonra 1dk. süre ile 8000xG'de santrifüj edildi.
- Maksimum miktarda genomik DNA elde etmek için, Elution Buffer adımı 100 µl tampon ile tekrarlandı.
- Spin kolon atılarak 1,5 ml'lik ependorf içerisinde saf bakteriyel genomik DNA elde edildi.
- Elde edilen genomik DNA'nın saflık ve konsantrasyon ölçümü NanoDrop spektrofotometre ile yapıldı.
- Moleküler analizlerde olması gereken ideal değerleri gösteren DNA numuneleri bir sonraki adımda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

2.2.3.2. *aroA* Geninin Moleküler Analizi

Robertson ve ark. (2018), tarafından yayınlanan çalışmada yer alan *S. Kentucky* serovarına ait tüm genom sekansı (NCBI GenBank Acc.No. CP022500) kullanılarak, *aroA* genine spesifik, SK-*aroA*-F 5'-ACCTTTGGCGTGGAGATAGC-3' ve SK-*aroA*-R 5'-CTCCAGCACATCGGCAAAAC-3' primerleri ile 216 bp'lik hedef PCR ürününü çoğaltacak şekilde tasarlandı. Tasarlanan primerler HPLC metodu ile saflaştırılmış, liyofilize ve 100 nmol olacak şekilde, ticari olarak temin edildi. Liyofilize primerler ile birlikte gönderilen kılavuzda belirtildiği gibi 100 µM'lık stok sulandırma hazırlandı ve 10 µM'lık ara stok oluşturularak kullanıldı.

PCR Reaksiyon Bileşimi

2x PCR Master Mix	12,5 µl
SK- <i>aroA</i> -F (10 pmol)	1 µl
SK- <i>aroA</i> -R (10 pmol)	1 µl
Template DNA	2 µl
PCR Water	8,5 µl
Total	25 µl

PCR Amplifikasyon Aşamaları

Denaturation	92 °C	10 dk.	} x 30
Denaturation	92 °C	20 sn.	
Annealing	55 °C	60 sn.	
Extension	72 °C	90 sn.	
Final Extension	72 °C	10 dk.	

PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve değerlendirilmesi amacıyla %1'lik agaroz jel (UltraPure-Invitrogen™) kullanıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında ve elektroforez tamponu olarak, 10xTBE Buffer (Thermo Scientific®) stok solüsyonundan, 1xTBE Buffer hazırlanarak kullanıldı. Agaroz jelde, nükleik asitlerin görselleştirilmesi için SafeView™ Classic kullanılması tercih edildi. PCR ürünlerinin jel kuyucuklarına yüklenmesinde 6xDNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific®) kullanıldı. PCR ürünlerinin boyutlarının belirlenmesinde ve birbirinden ayırt edilmesini sağlamak için marker olarak GeneRuler 100 bp Plus DNA (Thermo Scientific®) kullanıldı. Elektroforez tankına uygulanan voltaj, akım ve süre, agaroz jelin boyutuna ve PCR ürünlerinin büyüklüğüne göre belirlendi. Elektroforez aşaması tamamlanan agaroz jel BlueGel™ Electrophoresis Transilluminator ile görüntülenerek kaydedildi.

2.2.4. Mutasyon Çalışmaları

Mutasyon çalışmalarında kullanılacak ideal *S. Kentucky* suşunun belirlenmesinin ardından “Quick and Easy *E.coli* Gene Deletion Kiti”nde yer alan *Lambda-Red* rekombinasyon metodu esasına göre aşağıdaki analizler yürütüldü ve *aroA* mutant canlı *S. Kentucky* aşısı aday suşu elde edildi.

2.2.4.1. *pRedET*'nin *Salmonella Kentucky*'e Transformasyonu

Salmonella Kentucky saha suşu, tek koloni düşecek şekilde, LB agar çizgi ekim metodu ile pasajlanarak 37°C'de 24 saat süre ile aerobik koşullarda inkübe edildi. Ardından 1,5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpüne 1 mL LB broth ilave edilerek, LB agarda üreyen bakteri kültüründen tek bir koloni pasajlandı.

- Binotto ve ark. (1991), tarafından yayınlanan protokole göre elektrokompotent bakteriler hazırlandı. Bu protokole göre;
- Daha önceden +4°C'ye kadar soğutulmuş % 10 gliserollü ddH₂O, +4°C'ye kadar soğutulmuş 1 mm elektroporasyon küvetleri ve +4°C'ye kadar soğutulmuş santrifüj ve kristalize edilmiş buz havuzu hazırlandı.
- 1,5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpüne 1,4 mL LB broth ilave edildi. Bir gün önceden LB broth'a pasajlanan kültürden, taze kültür ortamına 30 µl alınarak pasaj yapıldı. 1000 rpm'de çalkalanarak 37°C'de aerobik koşullarda OD₆₀₀'de ~0.3 McFarland değeri yakalanana kadar 2-3 saat inkübe edildi.
- OD₆₀₀'de ~0.3 McFarland değeri yakalanan mikrosantrifüj tüpü +4°C'ye kadar soğutulmuş santrifüj ile 11000 rpm'de 30 sn. santrifüjlendi. Süpernatant hızlıca atılarak mikrosantrifüj tüpü buz havuzuna yerleştirildi. Pelet, 1 mL +4°C'ye kadar soğutulmuş % 10 gliserollü ddH₂O eklenerek yeniden süspanse edildi. Mikrosantrifüj tüpü +2°C'ye kadar soğutulmuş santrifüj ile 11000 rpm'de 30 sn. santrifüjlendi. İşlem 2 kere daha hassas bir şekilde tekrarlanarak tamamlandı.
- Son santrifüj aşamasından sonra bakteri peleti yeniden 1 mL +4°C'ye kadar soğutulmuş ddH₂O ile yeniden süspanse edilerek elektrokompotent bakteriler hazırlanmış oldu.
- Red/ET rekombinasyon protein ekspresyon plazmidi olan *pRedET*, elektrokompotent bakteri süspansiyonuna 1 µl eklenip, pipetasyon yaparak hafifçe karıştırıldı. Tüm aşamalar buz havuzunda gerçekleştirildi.
- *pRedET* plazmidi eklenen elektrokompotent bakteri süspansiyonu, mikrosantrifüj tüpünden +4°C'ye kadar soğutulmuş 1 mm'lik BIORAD GenePulser elektroporasyon küvetine aktarıldı.
- Elektroporasyon işleminde BIORAD MicroPulser elektroporator cihazı kullanıldı. Elektroporator cihazı 5 ms, 1350 V, 10 µF, 600 Ohms değerine ayarlanarak elektroporasyon işlemi uygulandı.

- Elektropore edilmiş bakteriler, antibiyotik içermeyen 1 mL LB broth ile yeniden süspanse edilerek steril mikrosantrifüj tüpüne konuldu. 1000 rpm'de çalkalayıcılı inkübatörde 30°C'de 70 dk. inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda 50 µg/mL ampisilin içeren LB agara, steril tek kullanımlık baget kullanılarak 100 µl yayma ekim yapıldı. Ampisilinli LB agar plakları, 30°C'de 24 saat süre ile aerobik koşullarda inkübe edildi.
- *pRedET* plazmidinin ısıya duyarlı olduğu ve 37°C'de plazmidin kaybolacağı kit protokolünde belirtilmektedir. Bu nedenle inkübatörün 30°C'de olmasına dikkat edilerek, 24 saat boyunca data-logger sıcaklık takip cihazları ile sürekli gözlemlendi.

2.2.4.2. *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* Kasetinin Oluşturulması ve Purifikasyonu

Robertson ve ark. (2018), tarafından yayınlanan “Completed Genome Sequences of Strains from 36 Serotypes of Salmonella” isimli çalışmada yer alan *S. Kentucky* serovarına ait tüm genom sekansı (NCBI GenBank Acc.No. CP022500), NCBI Primer-BLAST kullanılarak, Red/ET homolog rekombinasyon bölgesine her iki uçtan *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kaseti bağlanacak şekilde 50 bp'lik homoloji kolları belirlenerek oligonükleotid tasarımı yapıldı. Homoloji bölgesindeki birkaç yanlış nükleotid, rekombinasyonun gerçekleşmesine engel olabileceğinden, homolog rekombinasyonda ideal sekans özdeşliğine sahip bölge hedeflendi. Oligonükleotidler, homoloji bölgelerinde rekombinasyon için kullanıldıklarında, mükemmel kalitede olmaları gerekmektedir. Özellikle 50 bp'den uzun oligonükleotidlerin, HPLC saflaştırma aşamaları gerektirdiği bilinmektedir. Bu kapsamda, rekombinasyon için tasarlanan ve sipariş verilen oligonükleotidlerin tamamının, HPLC metoduna göre saflaştırılması tercih edildi. Oligonükleotidlerin homoloji kolları olarak görev yapan sekans bölgeleri düz metinde gösterilirken, kasetin amplifikasyonu için PCR primerleri olarak görev yapan kısımların altı çizilerek gösterildi.

Forward oligonükleotid olarak hedeflenen Red/ET rekombinasyon bölgesine doğrudan bitişik 50 nükleotid (N₅₀) dizisi belirlendi. Bu nükleotid dizisinin 3' ucuna, altı çizili şekilde verilen *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinin amplifikasyonu için, Quick and Easy *E.coli* Gene Deletion kitinde sunulmuş olan forward primer dizisi 5' ucundan bağlandı. Forward oligonükleotid dizisi: SK-Neo-Csst-F: 5'-TTAGGCAGGCGTACTCATTCGCGCCAGTTGTTTCGAAATAATCAGGGAACG AATTAACCCTCACTAAAGGGCG-3' olarak tasarlandı.

Reverse oligonükleotid olarak hedeflenen Red/ET rekombinasyon bölgesine doğrudan bitişik 50 nükleotid (N₅₀) dizisi belirlendi. Bu nükleotid dizisinin 3' ucuna, altı çizili şekilde verilen *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinin amplifikasyonu için, Quick and Easy *E.coli* Gene Deletion kitinde sunulmuş olan reverse primer dizisi 5' ucundan bağlandı. Reverse oligonükleotid dizisi: SK-Neo-Csst-R: 5'-ATGGAATCCCTGACGTTACAACCCATCGCGCGGGTCGATGGCGCCATTAA TAATACGACTCACTATAGGGCTC-3' olarak tasarlandı.

Kaset oluşturmak için Quick and Easy *E.coli* Gene Deletion kitinde sunulmuş olan PCR reaksiyonuna ait protokol kullanıldı. Bu protokole göre;

PCR Reaksiyon Bileşimi

2x PCR Master Mix	25 µl
SK-Neo-Csst-F (10 pmol)	2 µl
SK-Neo-Csst-R (10 pmol)	2 µl
<i>FRT-PGK-gb2-neo-FRT</i> Temp. DNA	2 µl
PCR Water	19 µl
Total	50 µl

PCR Amplifikasyon Aşamaları

Initial Denaturation	98 °C	30 sn.	
Denaturation	98 °C	10 sn.	x 30
Annealing	58 °C	30 sn.	
Extension	72 °C	90 sn.	
Final Extension	72 °C	10 dk.	

PCR'nin başarılı olduğundan emin olmak için agaroz jel üzerinde PCR ürününün 5 µl'lik bir kısmı kontrol edildi. *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinin PCR ürününün boyutu 1738 bp. olması hedeflenmektedir.

Oluşturulan linear *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinin, rekombinasyonda kullanılmadan önce purifikasyon işlemine tabi tutulması Quick and Easy *E.coli* Gene Deletion Kit protokolünde önerilmektedir. Oluşturulan kasetin purifikasyonunda, Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kiti kullanıldı. GeneJET DNA saflaştırma kolonunun toplam 25 µg DNA bağlama kapasitesi olduğu ve 100 bp ile 10 kb boyutlu DNA fragmentlerinin geri kazanım oranının % 90 ile 100 olduğu kit protokolünde belirtilmektedir. Bu kapsamda GeneJET PCR Purification Kitinin manuelinde yer alan “Santrifüj Kullanarak DNA Saflaştırma Protokolü” uygulandı.

Protokole göre;

- *Binding Buffer* çözeltisi 37°C'ye kadar ısıtılarak şişenin dibindeki çökmüş olan tortuların yeniden çözülmesi sağlandı ve oda sıcaklığına kadar soğutularak kullanıldı.
- PCR ürünü olarak elde edilen *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinin yer aldığı PCR tüpüne, 1:1 hacimde *Binding Buffer* eklendi.

- Homojenizasyon sağlanana kadar iyice karıştırıldı ve karışımın renginin sarı olmasına dikkat edildi. Sarı renk, DNA bağlanması için optimal bir pH'ı göstermektedir. Elde edilen karışım, turuncu veya menekşe renkli olursa, pH 5,2 ve 3M'lık 10 µL Sodyum Asetat (C₂H₃NaO₂) ilave edilir.
- Elde edilen sarı renkli karışımın tamamı (maksimum 800 µL), GeneJET DNA saflaştırma kolonuna aktarıldı. 1 dk süre ile ≥12000×G'de santrifüjlendi ve kolonun altındaki sıvı atıldı. Karışım bitene kadar aynı kolon ile işlem tekrarlandı.
- GeneJET DNA saflaştırma kolonuna, % 96 etanol ile seyreltilmiş 700 µL Wash Buffer eklendi. 1 dk. süre ile ≥12000×G'de santrifüjlendi. Kolonun altındaki sıvı atıldı.
- Kolonda kalmış olabilecek Wash Buffer solüsyonunu tamamen çıkarmak için GeneJET pürifikasyon kolonu 1 dakika süre ile tekrar ≥12000×G'de santrifüjlendi. GeneJET DNA saflaştırma kolonunu temiz bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve saflaştırma kolonunun membran merkezine 25 µL *Elüsyon Buffer* eklendi ve santrifüjlemeden önce kolon oda sıcaklığında 1-2 dakika bekletildi. Daha sonra 1 dk. süre ile ≥12000×G'de santrifüjlendi. DNA miktarını arttırmak için 25 µL *Elüsyon Buffer* ile işlem tekrarlandı.
- GeneJET DNA saflaştırma kolonunu atıldı. 1,5 mL mikrosantrifüj tüpündeki saflaştırılmış DNA -20°C'de saklandı.

2.2.4.3. *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* Kasetinin *pRedET(+)* *Salmonella* Kentucky'e Transformasyonu

pRedET(+) *Salmonella* Kentucky, 50 µg/ml ampicilinli LB agara çizgi ekim metodu ile pasajlanarak, 30°C'de 24 saat süre ile aerobik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, Binotto ve ark. (1991), tarafından yayınlanan protokole göre elektrokompotent bakteriler hazırlandı. Bu protokole göre;

- Daha önceden +4°C'ye kadar soğutulmuş % 10 gliserollü ddH₂O, +4°C'ye kadar soğutulmuş 1 mm GenePulser elektroporasyon küvetleri ve +4°C'ye kadar soğutulmuş santrifüj ve kristalize edilmiş buz havuzu hazırlandı.
- 1,5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpüne 1 mL ampisilinli (50 µg/mL) LB broth ilave edildi. LB agarda üreyen bakteri kültüründen tek koloni alınarak 50 µg/mL ampisilinli LB broth içeren mikrosantrifüj tüpüne inoküle edildi. 30°C'de 24 saat süre ile aerobik koşullarda ve 100 rpm çalkalamalı ortamda inkübe edildi.
- Ertesi gün, bir önceki adımda olduğu gibi 1,5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpüne 1,4 mL 50 µg/mL ampisilinli LB broth ilave edildi. Gece boyunca inkübe edilen kültürden 30 µl taze alınarak başka bir mikrosantrifüj tüpüne taze pasaj yapıldı. 30°C'de OD600'de ~0.3 McFarland değeri elde edilene kadar aerobik koşullarda ve 1100 rpm çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi.
- OD600'de ~0.3 McFarland değeri elde edildiğinde, 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne 50 µl %10 konsantrasyonlu L-Arabinoz ilave edildi. L-Arabinoz'un son konsantrasyonu % 0,3-0,4 arasında olmalıdır. İlave edilen L-Arabinoz, *Red/ET* rekombinasyon proteinlerinin ekspresyonunu indükleyecektir.
- L-Arabinoz ilave edildikten sonra bakterilerin rekombinasyon için gerekli tüm proteinlerin ifade edildiği sıcaklık olan 37°C'de inkübe edilmesi önemlidir. Bu nedenle 37°C'de 1 saat 1100 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi.
- Bakteri başına sıcaklığa duyarlı plazmidin yaklaşık 5 kopyası vardır ve bir inkübasyon boyunca bakteri sayısı artarken, her bakteri hala ortalama 2-3 plazmid kopyasına sahiptir ve rekombinasyon proteinlerini eksprese edecektir.
- L-Arabinoz ilave edildikten sonra 37°C'de 1 saat 1100 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde inkübe edilen mikrosantrifüj tüpü, +4°C'ye kadar soğutulmuş santrifüj ile 11000 rpm'de 30 sn. santrifüjlendi.
- Süpernatant hızlıca atılarak mikrosantrifüj tüpü buz havuzuna yerleştirildi. Pelet, 1 mL +4°C'ye kadar soğutulmuş % 10 gliserollü ddH₂O eklenerek yeniden süspanse edildi ve +4°C'ye kadar soğutulmuş santrifüj ile 11000 rpm'de 30 sn. tekrar santrifüjlendi. İşlem 2 kere daha hassas bir şekilde tekrarlandı.

- Mikrosantrifüj tüpleri buz havuzunda tutularak, tüpün dibinde kalan 20 µl pelet 1 mL +4°C'ye kadar soğutulmuş ddH₂O ile yeniden süspanse edilerek elektrokompotent bakteriler hazırlanmış oldu.
- Süspanse edilen elektrokompotent bakteri peletine, daha önceden hazırlanan, *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinden 2 µl eklendi ve ısıya maruz kalmadan, +4°C'ye kadar soğutulmuş 1 mm GenePulser elektroporasyon küvetine, soğutulmuş pipet ucu kullanılarak transfer edildi.
- Elektroporasyon işleminde BIORAD MicroPulser elektroporator cihazı kullanıldı. Elektroporator cihazı 5 ms, 1350 V, 10 µF, 600 Ohms değerine ayarlanarak elektroporasyon işlemi uygulandı.
- *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kaseti tranforme edilmiş *pRedET(+)* *S. Kentucky*, antibiyotiksiz 1 mL S.O.C. medium ile yeniden süspanse edilerek steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 1000 rpm'de çalkalayıcılı inkübatörde 37°C'de 3 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda 5000xG'de 30 saniye boyunca santrifüjlenerek süpernatantı atıldı. Bakteri peleti 100 µl LB broth ile süspanse edilip 15 µg/ml kanamisinli LB agara yayma ekim yapılarak 37°C'de 24 saat süre ile aerobik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, 15 µg/mL kanamisinli LB agar üzerinde mutant *S. Kentucky* kolonisi oluşması beklendi.

2.2.4.4. *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* Kaset Transformasyonunun Moleküler Konfirmasyonu

FRT-PGK-gb2-neo-FRT kaseti tranforme edilen ve 15 µg/mL kanamisinli LB agar üzerinde üreyen *S. Kentucky* kolonilerinde, mutasyonun konfirmasyonu PCR ile yapıldı. Öncesinde genomik DNA izolasyonunda “2.2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu” başlığı altında belirtilen protokol uygulandı.

Konfirmasyon primerinin tasarımı, *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinin oluşturduğu homolog rekombinasyon bölgesinden 1852 bp'lık bir sekans bölgesini amplifiye edecek şekilde tasarlandı. Tasarlanan forward konfirmasyon primeri (20 bp) 5'-CGCCACGGCTAATACGTTTC-3' ve reverse konfirmasyon primeri (20 bp) 5'-TCGCCACCGCCAGTAATAAT-3' olarak belirlendi. Konfirmasyon için tasarlanan ve sipariş verilen primerlerin, HPLC metoduna göre saflaştırılması tercih edildi.

PCR Reaksiyon Bileşimi

2x PCR Master Mix	12,5 µl
SK-Conf-F (10 pmol)	1 µl
SK-Conf-R (10 pmol)	1 µl
Mutant S. Kentucky Temp. DNA	1 µl
PCR Water	9,5 µl
Total	25 µl

PCR Amplifikasyon Aşamaları

Initial Denaturation	95 °C	10 dk.	
Denaturation	95 °C	10 sn.	} x 30
Annealing	58 °C	60 sn.	
Extension	72 °C	90 sn.	
Final Extension	72 °C	10 dk.	

2.2.4.5. Mutant *Salmonella* Kentucky’de *aroA*(-) Konfirmasyonu

Bu tez çalışmasında yer alan “2.2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu” ve “2.2.3.2. *aroA* Geninin Moleküler Analizi” adımlarındaki analiz ve protokoller birebir uygulanarak mutant *S. Kentucky* suşunda *aroA* gen mutasyonunun negatifliği konfirme edildi.

2.2.4.6. *pRedET*’in Mutant *Salmonella* Kentucky’den Eliminasyonu

Quick and Easy *E.coli* Gene Deletion Kit protokolünde açıklandığı üzere, *pRedET* plazmidini taşıyan *S. Kentucky*’e *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinin transformasyonundan sonra *pRedET*’yi barındıran bakteriler, 37°C’de gece boyunca inkübe edildiklerinde, *pRedET* plazmidi daha fazla kopyalanamaz ve kaybolur. 50 µg/mL ampisilinli LB agara yapılan pasajlarda, mutant *S. Kentucky*’nin ürememesi beklendi.

2.2.4.7. *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* Kasetinin Eliminasyonu

Kanamisin/neomisin selektif sekansını taşıyan ve bir önceki aşamada transforme edilen *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* doğrusal DNA fragmenti, FRT bölgeleri ile çevrilidir. FRT bölgelerinin arasındaki sekans bölgesi, *FLPe* ekspresyon plazmidinin *S. Kentucky*’e transforme edilmesi ve ardından *FLP* bölgesine özgü rekombinaz ekspresyonu yoluyla elimine edilebilmektedir.

FRT-PGK-gb2-neo-FRT doğrusal DNA fragmentinin eliminasyonu Quick & Easy *E.coli* Gene Deletion Kiti protokolüne göre gerçekleştirildi. Bu protokole göre;

- 1,5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpüne, 50 µg/mL kanamisin içeren 1 mL LB broth ilave edildi. 15 µg/mL kanamisin içeren LB agara pasajlanan *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetini barındıran mutant *S. Kentucky* kültüründen tek bir koloni alınarak, 1 mL 50 µg/mL kanamisinli LB broth içeren mikrosantrifüj tüpüne pasajlandı. 37°C'de 24 saat süre ile aerobik koşullarda ve 100 rpm çalkalamalı ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, Binotto ve ark. (1991), tarafından yayınlanan protokole göre elektrokompotent bakteriler hazırlandı.
- Daha önceden +4°C'ye kadar soğutulmuş % 10 gliserollü ddH_2O , +4°C'ye kadar soğutulmuş 1 mm GenePulser elektroporasyon küvetleri ve +4°C'ye kadar soğutulmuş santrifüj ve kristalize edilmiş buz havuzu hazırlandı.
- 1,5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpüne 1,4 mL kanamisinli (50 µg/mL) LB broth ilave edildi. Bir gün önceden kanamisinli (50 µg/mL) LB brotha pasajlanan ve üreyen bakteri kültüründen 30 µl alınarak 1,4 mL kanamisinli (50 µg/mL) LB broth içeren mikrosantrifüj tüpüne taze pasaj yapıldı. OD600'de ~0.3 McFarland değeri elde edilene kadar aerobik koşullarda ve 1000 rpm çalkalamalı inkübatörde 37°C'de inkübe edildi.
- OD600'de ~0.3 McFarland değeri elde edilen mikrosantrifüj tüpü, +4°C'ye kadar soğutulmuş santrifüj ile 11000 rpm'de 30 sn. santrifüjlendi. Süpernatant hızlıca atılarak mikrosantrifüj tüpü buz havuzuna yerleştirildi.
- Bakteri peleti, 1 mL +4°C'ye kadar soğutulmuş, % 10 gliserollü ddH_2O ile yeniden süspanse edilerek 11000 rpm'de 30 sn. santrifüjlendi. İşlem 2 kere daha hassas bir şekilde tekrarlanarak tamamlandı.
- Mikrosantrifüj tüpü buz havuzunda tutularak, tüpün dibinde kalan 20 µl kadar bakteri peleti, 1 mL +4°C'ye kadar soğutulmuş gliserol içermeyen ddH_2O ile yeniden süspanse edilerek elektrokompotent bakteriler hazırlanmış oldu.
- *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetini barındıran ve elektrokompotent özellik kazandırılan mutant *S. Kentucky* süspanسیونuna, 1 µl *FLPe* ekspresyon

plazmidi eklendi. Buz havuzunda tutularak ve kısa süre pipetasyon yapılarak homojenizasyonu sağlandı.

- Elde edilen homojen karışım, ısıya maruz kalmadan, +4°C'ye kadar soğutulmuş olan 1 mm GenePulser elektroporasyon küvetine, soğutulmuş pipet ucu kullanılarak transfer edildi ve elektroporasyon işlemine kadar buz havuzunda tutuldu.
- Elektroporasyon işleminde BIORAD MicroPulser elektroporatör cihazı kullanıldı. Elektroporatör cihazı 5 ms, 1350 V, 10 µF, 600 Ohms değerine ayarlanarak elektroporasyon işlemi uygulandı.
- *FLPe* ekspresyon plazmidi elektropore edilmiş, *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetini barındıran mutant *S. Kentucky*, antibiyotik içermeyen ve taze hazırlanmış olan, 1 mL S.O.C. medium ile elektroporasyon küvetinde yeniden süspanse edildikten sonra steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 1000 rpm'de, 70 dk. süre ile çalkalayıcı inkübatörde 30°C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda, 100 µl bakteri süspansiyonu steril tek kullanımlık bir öze kullanarak, 15 µg/mL kanamisin içeren LB agara pasajlanarak 24 saat süre ile 30°C'de aerobik koşullarda inkübe edildi.
- 1,5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpüne taze hazırlanmış 1 mL antibiyotiksiz LB broth konuldu. 15 µg/ml kanamisin içeren LB agara pasajlanan kültürden inkübasyon sonunda, tek kullanımlık steril öze ile tek bir koloni alınarak LB brotha pasajlandı. 2 saat süre ile 30°C'de inkübe edildi.
- Hemen ardından inkübatör sıcaklığı 37°C'ye yükseltilerek gece boyunca inkübasyona devam edildi. *FLP/FLPe* proteini bu sıcaklıkta eksprese edilecek ve *FRT* bölgelerini birbirine birleştirilecektir. Aynı zamanda, 37°C'de ekspresyon plazmidi daha fazla kopyalanamayacak ve kaybolacaktır.
- İnkübasyon sonunda üreyen kültürden, hem antibiyotiksiz hem de 15 µg/mL kanamisin içeren taze hazırlanmış LB agara, tek koloni düşecek şekilde steril tek kullanımlık öze kullanılarak ekim yapıldı. 24 saat süre ile 37°C'de aerobik koşullarda inkübe edildi.

- İnkübasyon sonunda antibiyotiksiz LB agarda üreyen mutant *S. Kentucky* kolonilerinden *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinin, *FLP* rekombinasyonu ile başarılı bir şekilde çıkarıldığı kabul edilirken, 15 µg/mL kanamisin içeren LB agarda herhangi bir koloni oluşumu beklenmemektedir.

2.2.5. Mutant *Salmonella Kentucky* ile Saha Suşunun Karşılaştırılması

2.2.5.1. Hareket Yeteneklerinin Belirlenmesi

S. Kentucky suşunun hareket yeteneklerinin belirlenmesinde en eski yaklaşımlardan biri olan ve rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında günümüzde hala yaygın bir şekilde kullanılan yarı katı agarda hareket muayenesi testi tercih edildi (Tittsler ve Sandholzer, 1936). Hareket muayenesinde ticari olarak satın alınan Semi-Solid Nutrient Agar ISO 6579 (Sigma-Aldrich®) kullanıldı. Üretici firmanın direktifleri doğrultusunda saf su içerisinde süspanse edildi. Sık sık karıştırılarak besiyeri tamamen çözünene kadar ısıtıldı. Çözünen besiyeri 121°C'de 15 dk. otoklavlandı. Sterilizasyonu tamamlanan besiyeri 45°C'ye kadar soğutularak 90 mm steril tek kullanımlık petrilere döküldü. Kullanılabilir hale gelene kadar bir süre oda sıcaklığındaki steril bir alanda bekletildi.

Nutrient brotha (NB) 16-20 saat önceden pasajlanan *S. Kentucky* kültüründen, iğne uçlu steril tek kullanımlık öze ile bir koloni alınarak tam merkezi noktadan petriye inokulasyon yapıldı. 37°C'de 12 saat süre ile aerobik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon boyunca her saat başında, inokulasyon merkezinin etrafında oluşan hareket makroskobik olarak gözlemlendi.

2.2.5.2. Antibakteriyel Duyarlılık Testi

aroA Mutant *S. Kentucky* suşu ile saha suşunun antibakteriyel duyarlılık profilinin karakterizasyonunda en eski yaklaşımlardan biri olan ve rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında günümüzde hala yaygın bir şekilde kullanılan disk difüzyon metodu tercih edildi (Matuschek ve ark., 2014). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) direktifleri doğrultusunda disk difüzyon metodolojisi kullanılarak antibakteriyel duyarlılık testi uygulandı.

EUCAST'e göre, disk difüzyon metodunda test edilecek mikroorganizma ile aynı veya benzer türden başka bir suşun rutin kalite kontrolü için kullanılması önerilmektedir. Bu kapsamda, tez çalışmasının konusu olan *S. Kentucky* suşu için *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan ve EUCAST kalite kontrol suşu olan *E. coli* ATCC® 25922 tercih edilerek, antibakteriyel duyarlılık testlerinde, test suşundan bağımsız olarak değerlendirildi.

Bauer ve Kirby tekniğinde kullanılan Mueller-Hinton Agar (MHA), antibakteriyel duyarlılık testinde “*The United States Clinical and Laboratory Standards Institute*” tarafından tavsiye edilen tek besiyeridir (Matuschek ve ark., 2014). Ticari olarak alınan MHA (Neogen), üretici firmanın direktifleri doğrultusunda saf su içerisinde süspanse edildi. Sık sık karıştırılarak besiyeri tamamen çözünene kadar ısıtıldı. Çözünen besiyeri 121°C'de 15 dk. otoklavlandı. Sterilizasyonu tamamlanan besiyeri 45°C'ye kadar soğutulularak steril tek kullanımlık 90 mm dairesel petri kaplarına 4.0±0.5 mm kalınlığında döküldü ve kullanılabilir hale gelene kadar bir süre oda sıcaklığındaki steril bir alanda bekletildi.

Nutrient Agara (NA) 16-20 saat önceden pasajlanan *S. Kentucky* kültüründen, steril PBS'e OD₆₀₀'de ~0.5 McFarland standart değerinde süspansiyon hazırlandı. Bakteri süspansiyonu hiç bekletilmeden, steril pamuklu swab çubuğu kullanılarak, MHA'ın tüm yüzeyi boyunca üç yönlü ve eşit şekilde yayıldı. Bakteri inokulasyonunu takiben 15 dk. içinde antibiyotik diskleri, Oxoid AST Disk Dispenser kullanılarak eşit aralıklarla ve doğru şekilde agar plaklarına yerleştirildi. Agar plakları 37°C'de 24 saat süre ile aerobik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda disk merkezinin etrafındaki zon çapları ölçülerek kaydedildi (Matuschek ve ark., 2014).

2.2.5.3. EDTA Duyarlılık Testi

S. Kentucky suşunun, EDTA duyarlılık testi, Sebkova ve ark. (2008), tarafından yayınlanan metodoloji kullanılarak gerçekleştirildi. Bakteriler, LB agara pasajlanarak 37°C'de 24 saat süre ile aerobik koşullarda inkübe edilerek canlandırıldı. İnkübasyon sonunda üreyen kolonilere biyokimyasal ve serolojik konfirmasyon analizleri yapılarak *S. Kentucky* olarak doğrulandı.

Kullanılan metodolojiye göre,

- EDTA (Sigma-Aldrich®), 4096 µg/mL konsantrasyonda saf suda çözündürüldü ve 121°C'de otoklavlanarak steril edildi. Kullanılmak üzere temiz bir alanda oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutuldu.
- Steril EDTA çözeltisi, mikropate kuyucuklarına 100 µL eşit hacimli dağıtıldı.
- Birinci kuyucukta 2048 µg/mL konsantrasyondan başlanmak üzere, steril LB broth kullanılarak iki katlı dilüsyon metodu ile 1 µg/mL konsantrasyona kadar seyreltildi.
- Ardından ayrı ayrı dilüsyon serileri oluşturularak mutant *S. Kentucky* ile saha suşunun inokulasyonu yapılarak 37°C'de aerobik koşullarda 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda MIC değerleri belirlenerek kaydedildi.

2.2.5.4. İn-Vitro Yaşama Gücü Analizi

Salmonella spp.'nin çevre şartlarında yaşama gücü, kanatlı sürülerine bulaşmasına ve yayılmasına neden olmaktadır. Farklı koşullar altında yaşama gücü ile ilgili araştırma ve literatür oldukça sınırlıdır. Bu bağlamda, Williams ve Benson (1978), tarafından yayınlanan “Survival of *Salmonella* Typhimurium in Poultry Feed and Litter at Three Tempera” isimli çalışma referans alınarak, S. Kentucky aşısı aday suşu, saha suşu ve kontrol suşunun (S. Enteritidis ATCC® 13076™), kanatlı gübresine deneysel inokulasyonu yapılarak, farklı sıcaklıkta yaşama gücü analizleri yapıldı.

Salmonella'nın yaşama gücünün analizinde, doğal, taze kanatlı gübresi kullanılarak saha şartlarının ve uzun süreli depolama koşullarının sağlanması amaçlandı. Deneysel inokulasyon için 28 günlük yaştaki Ross 308 broiler altlığı, Ankara bölgesindeki ticari bir işletmeden biyogüvenlik kurallarına dikkat edilerek temin edildi. Laboratuvara getirilen altlık numunesi, 1:10 oranında PBS/gübre ile karıştırılarak homojen hale getirildi. Kapaklı cam şişelere aktarılıp, 121°C'de 15 dk. süre ile otoklavlanarak steril edildi (Williams ve Benson, 1978).

Steril gübrenin başlangıç inokulasyonu için aşısı aday suşu, saha suşu ve S. Enteritidis ATCC® 13076™ kontrol suşu, NB'a pasajlanarak 37°C'de aerobik koşullarda 24 saat süre ile inkübe edildi. Başlangıç inokulasyon değeri, her suş için 10⁹ cfu/mL olarak ayarlandı. Bakteri süspansiyonundan her tüpe 1 mL eşit hacimli dağıtılarak 10 mL'ye tamamlandı ve 20-30 sn. vorteks ile 1000 rpm'de karıştırıldı. İnokulasyonu tamamlanan gübreler, +4°C, 25°C, 37°C ve 42°C'lik gruplar oluşturularak 10 hafta inkübe edildi. Analiz süresi boyunca, doğal koşullarda olduğu gibi, nem ve pH değerlerine özel bir önem gösterilmedi (Williams ve Benson, 1978).

2.2.5.5. Adhezyon ve İnvazyon Analizi

Bu çalışmanın amacı, *aroA* mutant *S. Kentucky* suşu ile saha suşunun, Caco-2 (ATCC® HTB-37™) kolon epitelyal hücrelerine adhezyon ve invazyon yeteneklerinin karşılaştırılmasıdır. Analizler, AÜVF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Caco-2 hücre hattı 20. ile 30. pasajları arasındayken kullanıldı. % 5 CO₂ ile % 95 atmosferik havada, EMEM ve % 20 FBS kullanılarak büyütüldü (Finlay ve Falkow, 1990). Caco-2 hücreleri, tripsinize edilmiş FBS ile süspanse edilerek, 6 kuyucuklu Becton Dickinson (BD Falcon™) hücre kültürü platelerine eklendi. Media ortamı her üç günde bir EMEM ve % 20 FBS kullanılarak değiştirildi. 15 günlük inkübasyon sonunda elde edilen hücreler EMEM + % 20 FBS ile durulandı (Kottom ve ark., 1995).

Bakteriler, LB agara pasajlanarak 37°C'de 24 saat süre ile inkübe edilerek canlandırıldı. Üreyen kolonilere serolojik konfirmasyon analizleri yapıldı. Her suş için steril PBS kullanılarak ayrı ayrı bakteri süspansiyonları hazırlandı. Adhezyon ve invazyon analizlerinde kullanmak üzere, bakteri sayısını koloni oluşturan birim cinsinden (CFU) belirlemek için BD PhoenixSpec™ Nephelometer kullanıldı.

Adhezyon testi, Kusters ve ark. (1993), tarafından uygulanan prokole göre gerçekleştirildi. Bu protokole göre;

- BD Falcon™ hücre kültürü pleytine, Caco-2 hücreleri pasajlandı. Media ortamı, EMEM ve % 20 FBS ile sürdürüldü. %5 CO₂ + % 95 atmosferik havada, 37 °C'de 24 saat süre ile inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda, hücre tabakaları iki kere +4°C soğuk steril PBS ile yıkandı. Ardından 2 mL % 2.5 gluteraldehit solüsyonu eklenerek +4°C'de 1 saat süreyle bekletildi. Gluteraldehit solüsyonu, +4°C soğuk steril PBS ile 5 defa yıkanarak uzaklaştırıldı.

- Daha sonra hücreler, +4°C soğuk steril PBS ilave edilerek 30 dk. süre ile +4°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki PBS atılarak, işlem 3 kere daha tekrarlandı. Hemen ardından her kuyucuğa, +4°C soğuk steril PBS ilave edilerek gece boyunca +4°C’de inkübe edildi.
- Ertesi gün, kuyucuklardaki PBS uzaklaştırıldı. Plate ortam sıcaklığına ulaşana kadar bir süre beklendikten sonra hücre tabakaları üzerine 37°C EMEM ilave edildi.
- İnokulasyon için hazırlanan bakteri süspansiyonundan, kuyucuklardaki son konsantrasyonu 1×10^7 cfu/mL olacak şekilde ilave edildi. Plateler, 500xG’de 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından, bakteriyel adhezyonun sağlanması için %5 CO₂ + % 95 atmosferik havada, 37 °C’de 30 dk. süre ile inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda öncelikle kuyucuklardaki bakteriyel süspansiyon uzaklaştırıldı. Ardından kuyucuklar +4°C soğuk steril PBS ile 5 defa yıkanarak nonadherent bakteriler tamamen uzaklaştırıldı.
- Adherent bakterileri serbest bırakmak için, daha önceden steril olarak hazırlanmış olan %1’lik Triton X-100 içeren PBS’ten her kuyucuğa 1 mL uygulandı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki bakteri süspansiyonu, %1’lik Triton X-100 içeren PBS’te 10 katlı sulandırılarak yeniden süspanse edildi. Her sulandırma oranından XLD ve NA’a 100 µL yayma ekim yapılarak, 37 °C’de 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, sulandırma derecesine ve üreyen koloni sayısına göre toplam bakteri sayısı hesaplandı. Aynı zamanda üreyen kolonilere serolojik konfirmasyon analizleri yapıldı.

İnvazyon testi, Finlay ve Falkow (1990), ile Kottom ve ark. (1995), tarafından uygulanan prokole göre gerçekleştirildi. Bu protokole göre;

- BD Falcon™ hücre kültürü pleytine, Caco-2 hücreleri pasajlandı. Media ortamı, EMEM ve % 20 FBS ile sürdürüldü. %5 CO₂ + % 95 atmosferik havada, 37°C’de 24 saat süre ile inkübe edildi.

- İnkübasyon sonunda, hücre tabakaları iki kere +4°C soğuk steril PBS ile yıkandı. Ardından 2 mL % 2.5 glutaraldehit solüsyonu eklenerek +4°C'de 1 saat süreyle bekletildi. Glutaraldehit solüsyonu, +4°C soğuk steril PBS ile 5 defa yıkanarak uzaklaştırıldı.
- Daha sonra hücreler, +4°C soğuk steril PBS ilave edilerek 30 dk. süre ile +4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki PBS atılarak, işlem 3 kere daha tekrarlandı. Hemen ardından her kuyucuğa, +4°C soğuk steril PBS ilave edilerek gece boyunca +4°C'de inkübe edildi.
- İnokulasyon için hazırlanan bakteri süspansiyonundan, kuyucuklardaki son konsantrasyonu 1×10^7 cfu/ml olacak şekilde ilave edildi. Plateler, 500xG'de 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından, bakteriyel adhezyonun sağlanması için %5 CO₂ + % 95 atmosferik havada, 37°C'de 30 dk. inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda hücreler +4°C soğuk steril PBS ile üç defa yıkandı.
- Caco-2 hücrelerinin dışında kalan non-invaziv bakterileri öldürmek için, media ortamına 125 µg/mL gentamisin içeren taze EMEM eklenerek, %5 CO₂ + % 95 atmosferik havada, 37°C'de, 90 dakika süre ile inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda öncelikle kuyucuklardaki 125 µg/mL gentamisin içeren EMEM uzaklaştırıldı. Ardından kuyucuklar +4°C soğuk steril PBS ile 5 defa yıkanarak non-invaziv bakteriler tamamen uzaklaştırıldı.
- İnvaziv bakterileri serbest bırakmak için, daha önceden steril olarak hazırlanmış olan %1'lik Triton X-100 içeren PBS'ten her kuyucuğa 1 mL uygulandı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki bakteri süspansiyonu, %1'lik Triton X-100 içeren PBS'te 10 katlı sulandırılarak yeniden süspanse edildi. Her sulandırma oranından XLD ve NA'a 100 µL yayma ekim yapılarak, 37°C'de aerobik koşullarda 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, sulandırma derecesine ve üreyen koloni sayısına göre toplam bakteri sayısı hesaplandı. Aynı zamanda üreyen kolonilere serolojik konfirmasyon analizleri yapıldı.

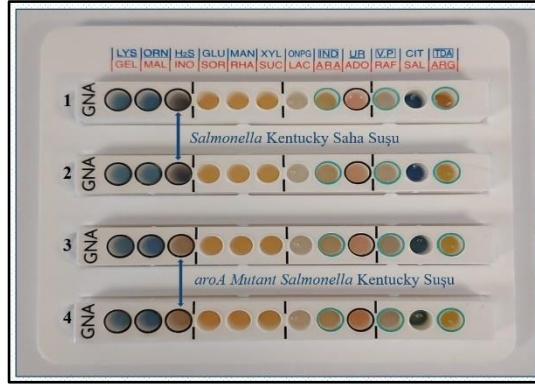
3. BULGULAR

3.1. Mutasyonda Kullanılacak *Salmonella* Kentucky Suşunun Seçimi Bulguları

Mutasyon çalışmalarında kullanılmak üzere AÜVF Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bünyesinde yer alan USRL Kültür Koleksiyonu'ndaki 2018-2020 tarihleri arasında izole edilen *S. Kentucky* suşlarından ribotiplendirme kütüphanesinde en çok ribopatemi olan 20 adet *S. Kentucky*'nin tamamının *aroA* genine sahip olduğu, bu suşlardan ampisilin, kanamisin, neomisin ve kloramfenikole en duyarlı *S. Kentucky* suşu (SK-BS-051020) seçildi ve mutasyon çalışmalarında kullanıldı.

3.2. Serolojik ve Biyokimyasal Analiz Bulguları

Serolojik analizler, White-Kauffmann-Le Minor şeması dikkate alınarak uygulanan lam aglütinasyon testleri sonucunda *aroA* mutant suş ile saha suşunun “8,20:i:z6” formülünü vererek *S. Kentucky* serovarı olarak doğrulandı. Biyokimyasal analizler ise Microgen® GnA-ID System (MID-64CE) kullanılarak kit prosedüründe belirtildiği gibi değerlendirildi. Elde edilen bulgulara göre saha suşu, *Salmonella* cinsinin bütün özelliklerini taşıırken, *aroA* mutant *S. Kentucky*'nin saha suşundan farklı olarak H₂S negatif olduğu belirlendi.



Şekil 3.1. *aroA* Mutant *Salmonella* Kentucky’de H₂S (-) Bulgusunun Gösterilmesi

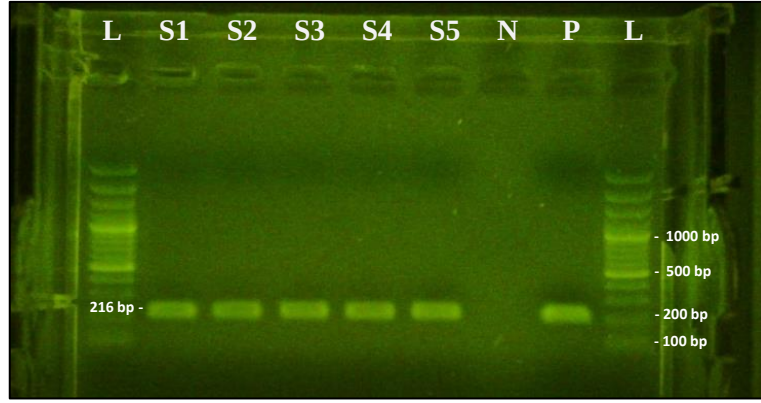
3.3. Moleküler Çalışma Bulguları

3.3.1. Genomik DNA İzolasyonu Bulguları

S. Kentucky’nin genomik DNA izolasyonu başarılı bir şekilde tamamlandı. İzolattaki DNA miktarı NanoDrop 2000 spektrofotometre ile ölçülerek izolasyondaki DNA miktarı ve kalitesi belirlendi. Elde edilen genomik DNA’nın saflık ve konsantrasyon ölçümü NanoDrop spektrofotometre ile yapıldı. Elde edilen verilere göre 260/280 oranına göre DNA miktarı 35,7 ng/µl ve 2,07 olarak belirlendi.

3.3.2. *aroA* Geninin Moleküler Analizi Bulguları

Salmonella Kentucky serovarına spesifik *aroA* gen sekansını kapsayacak şekilde tasarlanan SK-*aroA*-F ve SK-*aroA*-R primer çifti kullanılarak 216 bp’lik hedef PCR ürünü elde edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre mutasyonda kullanılacak *S. Kentucky* serovarında hedeflenen *aroA* gen sekansının varlığı doğrulandı.



Şekil 3.2. Saha Suşu *Salmonella* Kentucky'de *aroA* (+) Geninin Gösterilmesi (L: 100 bp DNA Ladder; N: Negatif Kontrol; P: Pozitif Kontrol; S1 - S5: S. Kentucky 1 - 5).

3.4. Mutasyon Çalışmaları Bulguları

3.4.1. *pRedET*'nin *Salmonella* Kentucky'e Transformasyonu Bulguları

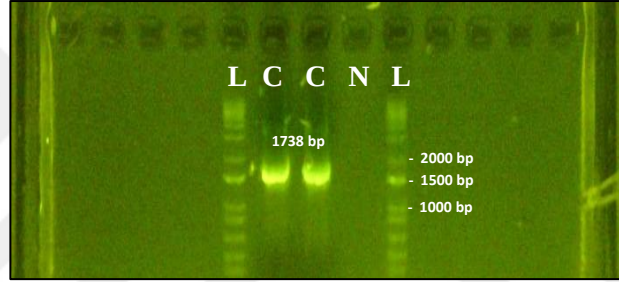
pRed/ET trasforme edilen *S. Kentucky* saha suşu 50 µg/mL ampisilinli LB agara ekim yapılarak 30°C'de 24 saat süre ile aerobik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 50 µg/mL ampisilinli LB agar üzerinde üreyen kolonilere serolojik konfirmasyon analizleri yapılarak *S. Kentucky* olarak doğrulandı. 50 µg/mL ampisilinli LB agar üzerinde *S. Kentucky* kolonilerinin üremesi, *pRed/ET*'nin başarılı bir şekilde *S. Kentucky* saha suşuna transforme edildiğini fenotipik olarak gösterdi.



Şekil 3.3. *pRED/ET* Transformasyonunun Fenotipik Konfirmasyonu

3.4.2. *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* Kasetinin Oluşturulması ve Purifikasyonu Bulguları

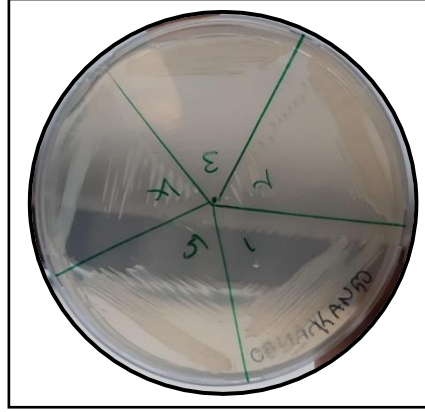
Red/ET homolog rekombinasyon bölgesine her iki uçtan *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kaseti bağlanacak şekilde 50 bp'lik homoloji kolları kapsayan SK-Neo-Csst-F ve SK-Neo-Csst-R primer çifti kullanılarak PCR reaksiyonu ile 1738 bp büyüklüğünde kaset kromozomu elde edilerek agaroz jelde görüntülendi. Elde edilen bantın smear oluşturmaması ile purifikasyonun beklenen şekilde başarılı uygulandığı görüldü.



Şekil 3.4. Kaset Kromozomunun Agaroz Jelde Görüntülenmesi (L: 1 kb DNA Ladder; C: Kaset Kromozomu; N: Negatif Kontrol).

3.4.3. *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* Kasetinin *pRedET(+)* *Salmonella* Kentucky'e Transformasyonu Bulguları

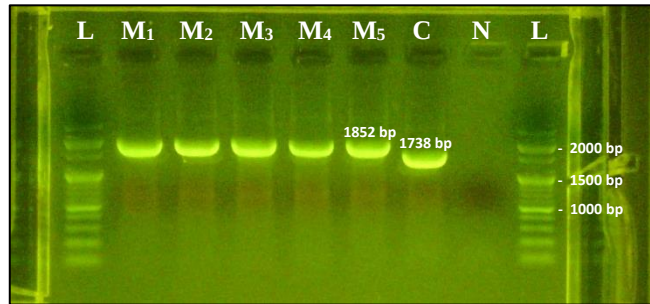
FRT-PGK-gb2-neo-FRT kaseti transforme edilmiş *S. Kentucky*'nin 15 µg/mL kanamisin içeren LB agarda 37°C'de 24 saat süre ile aerobik koşullarda inkübe edildikten sonra üremesi beklendi. Elde edilen bulgulara göre inkübasyon sonunda 15 µg/mL kanamisin içeren LB agar üzerinde *S. Kentucky* kolonilerinin ürediği gözlemlendi. *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* rekombinasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği fenotipik olarak doğrulandı.



Şekil 3.5. *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* Transformasyonunun Fenotipik Konfirmasyonu

3.4.4. *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* Kaset Transformasyonunun Moleküler Konfirmasyonu Bulguları

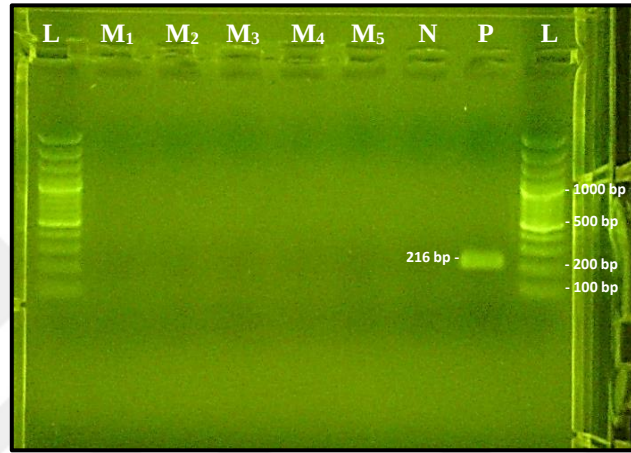
FRT-PGK-gb2-neo-FRT kaseti transforme edilen ve 15 µg/mL kanamisinli LB agar üzerinde üreyen mutant *S. Kentucky* kolonileri seçilerek, mutasyonun moleküler konfirmasyonu PCR ile yapıldıktan sonra %1'lik agaroz jelde görüntülendi. Elde edilen bulgulara göre 1852 bp'lık bir sekans bölgesi amplifiye edilerek mutasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği moleküler olarak konfirme edildi.



Şekil 3.6. *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* Transformasyonunun Moleküler Konfirmasyonu (L:1 kb DNA Ladder; N: Negatif Kontrol; C: Kaset Kromozomu; M1 - 5: *aroA* Mutant *S. Kentucky* 1 - 5).

3.4.5. Mutant *Salmonella* Kentucky'de *aroA*(-) Konfirmasyonu Bulguları

Mutant *S. Kentucky*'den *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinin başarılı eliminasyonundan sonra *S. Kentucky*'nin *aroA* genine spesifik SK-*aroA*-F ve SK-*aroA*-R primer çifti kullanılarak, mutant *S. Kentucky*'de *aroA*(-) olduğu gösterildi.



Şekil 3.7. Mutant *Salmonella* Kentucky'de *aroA* (-) Geninin Gösterilmesi (L:100 bp DNA Ladder; N: Negatif Kontrol; P: Pozitif Kontrol; M1 - 5: Mutant *S. Kentucky* 1 - 5).

3.4.6. *pRed/ET*'nin Mutant *Salmonella* Kentucky'den Eliminasyonu Bulguları

Quick and Easy *E.coli* Gene Deletion Kit protokolünde açıklandığı gibi *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetinin *S. Kentucky*'e transformasyonundan ve rekombinasyonun konfirmasyonundan sonra *pRed/ET* (+) *S. Kentucky*, antibiyotiksiz LB agara pasajlanarak 37°C'de gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 50 µg/mL ampisilinli LB agara yapılan pasajlarda *S. Kentucky*'nin üremediği gözlemlendi. Bu durum, *pRed/ET*'nin başarılı bir şekilde mutant *S. Kentucky*'den elimine edildiğini gösterdi.

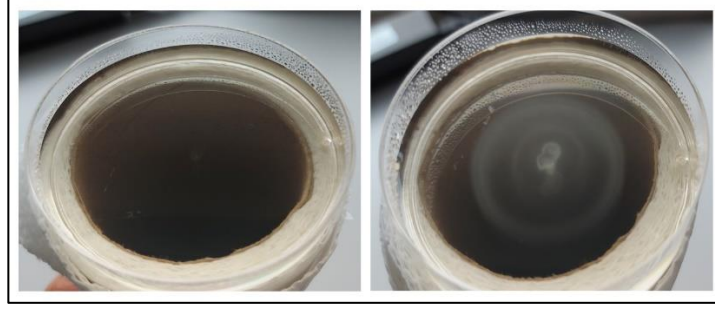
3.4.7. *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* Kasetinin Eliminasyonu Bulguları

Quick and Easy *E.coli* Gene Deletion Kit protokolünde eliminasyon basamaklarının açıklandığı gibi, *FRT-PGK-gb2-neo-FRT* kasetini barındıran mutant *S. Kentucky* suşuna *FLPe* ekspresyon plazmidi elektropore edilerek gerekli işlem basamakları uygun bir şekilde yürütüldü. Elde edilen bulgulara göre antibiyotiksiz LB agarda mutant *S. Kentucky* ürerken, 15 µg/mL kanamisinli LB agarda üreme olmadığı gözlemlendi. Bu durum, *S. Kentucky*'den *FRT-PGK-gb2-neo-FRT*'nin *FLP/FLPe* yoluyla başarılı bir şekilde elimine edildi.

3.5. Mutant *Salmonella Kentucky* ile Saha Suşunun Karşılaştırılması Bulguları

3.5.1. Hareket Yetenekleri Bulguları

aroA mutant *S. Kentucky* suşu ile saha suşu *S. Kentucky*'nin hareket yeteneklerinin belirlenmesinde semi-solid nutrient agar kullanıldı. Saha suşu *S. Kentucky*'de merkezi inokulasyon noktasından çevreye doğru diffuz bir motilite bölgesinin başlangıcı 2 saatlik inkübasyonun sonunda gözlemlenirken, *aroA* mutant *S. Kentucky*'de 4 saat sonra gözlemlendi. 12 saat inkübasyonun sonunda, saha suşunun tüm agar yüzeyini kapladığı gözlemlenirken, *aroA* mutant *S. Kentucky*'nin merkezi inokulasyon noktasından başlayan diffuz motilite bölgesinin inkübasyon süresi boyunca eşit çaplı büyümediği ve özdeş hareketli olmadığı makroskobik olarak gözlemlendi.



Şekil 3.8. *aroA* Mutant *Salmonella* Kentucky (Sol) ile Saha Suşunun (Sağ) Hareket Yeteneğinin Yarı-Katı Agarda Karşılaştırılması

3.5.2. İn-Vitro Yaşama Gücü Analizi Bulguları

Kanatlı gübresinde yürütülen in-vitro yaşama gücü analizinde, *aroA* mutant *S. Kentucky* suşu ile saha suşunun 10 haftalık analiz süresi sonunda, +4°C’de ve 25°C’de canlı bakteri sayısının yalnızca *aroA* mutant *S. Kentucky*’de $\log 10^1$ azalırken, saha suşunda değişmeden sabit kaldığı; 37°C’de canlı bakteri sayısının *aroA* mutant *S. Kentucky*’de $\log 10^4$ azalırken, saha suşunda $\log 10^3$ azaldığı; 42°C’de bakteri sayısının *aroA* mutant *S. Kentucky*’de $\log 10^6$ azalırken, saha suşunun $\log 10^5$ azaldığı belirlendi.

3.5.3. Adhezyon ve İnvazyon Analizi Bulguları

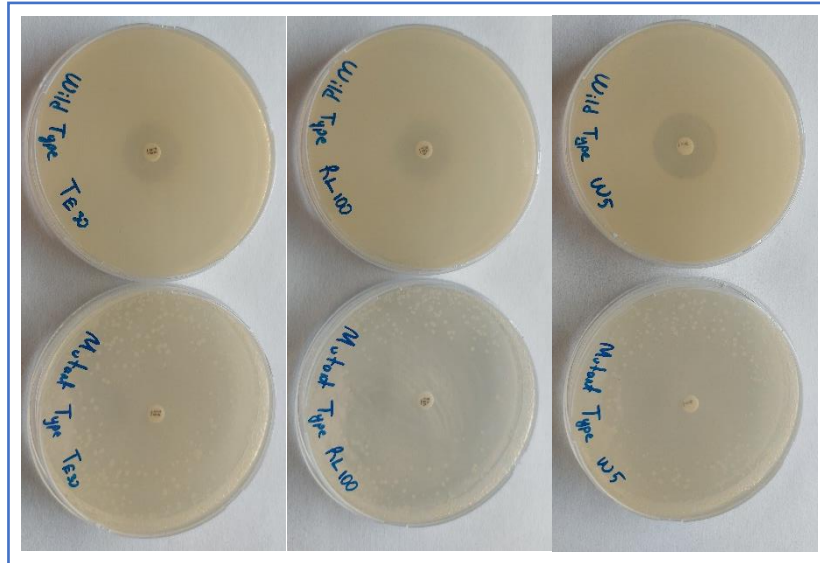
Caco-2 hücre kültüründe yürütülen in-vitro adhezyon ve invazyon deneylerinde, *aroA* mutant *S. Kentucky*’nin, saha suşu *S. Kentucky*’e göre adhezyon ve invazyon yeteneğinin 15 kat azaldığı belirlendi. Adhezyon yeteneklerine bakıldığında, *aroA* mutant *S. Kentucky*’nin % 0,1 olduğu belirlenirken, saha suşu *S. Kentucky*’nin % 1,5 olduğu; invazyon yeteneklerinin ise *aroA* mutant *S. Kentucky*’de % 0,05 olduğu ve saha suşunda % 0,75 olduğu belirlendi.

3.5.4. EDTA Duyarlılık Testi Bulguları

EDTA duyarlılık testi bulgularına bakıldığında, saha suşu *S. Kentucky*'nin EDTA MIC değeri $>1024 \mu\text{g/mL}$ olurken, *aroA* mutant *S. Kentucky*'nin EDTA MIC değeri $64 \mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi. Bu bulgulara göre *aroA* mutant *S. Kentucky*'nin EDTA duyarlılığının saha suşu *S. Kentucky* göre 16 kat arttığı belirlendi.

3.5.5. Antibakteriyel Duyarlılık Testi Bulguları

aroA mutant *S. Kentucky* suşu ile saha suşunun antibakteriyel duyarlılık profilinin karakterizasyonu disk difüzyon metodolojisine göre EUCAST direktifleri doğrultusunda değerlendirildi. Elde edilen bulgulara göre, *aroA* mutant *S. Kentucky* suşunun, saha suşuna göre ampisiline, amoksisiline, trimetoprim, sülfametoksazole daha duyarlı hale geldiği belirlendi.



Şekil 3.9. *aroA* Mutant *Salmonella Kentucky* ile Saha Suşunun Antibakteriyel Duyarlılıklarının Karşılaştırılması

4. TARTIŞMA

Salmonellozis, tüm dünyada insan ve hayvan sağlığının korunmasına yönelik uygulanan kontrol programları sayesinde azalmasına rağmen hala önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Kanatlı orijinli gıda ürünlerinin üretiminde, *Salmonella*'ya bağlı enfeksiyonları önlemek ve kontrol etmek için çeşitli uygulamalar yapılmaktadır. Özellikle damızlık ve yumurtacı sürülerin aşılınması, kanatlı hayvanlarda *Salmonella* enfeksiyonlarını azaltmada etkin rol oynamakta ve dolayısıyla insanlarda salmonellozis prevalansının azaltılmasında akılcı bir uygulama olduğu bilinmektedir (Cerquetti ve Gherardi, 2000). *Salmonella* aşılı ile ilgili çalışmalar 1900'lü yılların sonlarında başlamış ve günümüze kadar birçok araştırmacı, *Salmonella*'nın baskın serovarları üzerine, başta *aro* gen mutasyonu olmak üzere birçok mutasyon çalışması yürütmüştür. Araştırmacıların tamamının ortak hedefi, enfeksiyona neden olmadan koruyucu bağışıklığı etkin bir şekilde oluşturabilen suşlar elde etmek olmuştur (Desin ve ark., 2013).

Bu tez çalışmasında, ülkemizde ve dünyada, çiftlik hayvanlarından ve hayvansal orijinli gıda ürünlerinden sıklıkla izole edilebilen, hem insan sağlığı hem de hayvan sağlığı için büyük riskler oluşturabilen *S. Kentucky* serovarına karşı aşı adayı *aroA* mutant canlı *S. Kentucky* suşu geliştirilerek, *aroA* mutant suş fenotipik ve moleküler analizlerle doğrulandı. Günümüze kadar geçen süreçte, *S. Kentucky* serovarına karşı geliştirilen inaktif aşılardan olmasına rağmen *aroA* mutant canlı *S. Kentucky* aşı suşu geliştirilmesine yönelik bilimsel bir çalışmaya yazılı literatürde rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında oluşturulan aşı adayı *aroA* mutant canlı *S. Kentucky* suşu, ülkemizde ve dünyada ilk çalışma olma niteliğindedir.

Bu tez çalışmasında, *aroA* mutant *S. Kentucky*'de mutasyon ile birlikte saha suşundan farklı olarak hareket özelliğinde, adhezyon ve invazyon özelliklerinde, biyokimyasal aktivitesinde, antibiyotiklere ve EDTA'ya karşı duyarlılığında önemli farklılıklara sahip olduğu belirlendi.

aroA mutant *S. Kentucky* ile saha suşunun hareket yeteneklerinin yarı-katı agarda incelenmesi sonrasında, *aroA* mutant *S. Kentucky*'nin, saha suşuna göre hareket yeteneklerinin belirgin olarak azaldığı belirlendi. Felgner ve ark. (2016), *aroA* mutant *Salmonella* suşunda bir motilite kaybının olduğunu bildirmişlerdir ve *aroA* mutant *Salmonella* suşunun flagellar fenotipini analiz etmişlerdir. *Salmonella*'nın flagellar regülону, *Class-I, II, III* olmak üzere üç promotör sınıfının transkripsiyonel hiyerarşisinde düzenlendiğini bildirmişlerdir. Saha suşunda ve *aroA* mutant suşta, *Class-I ve II* promotörlerinin ekspresyonunun benzer olduğu, *aroA* mutant suşta *Class-III* promotör ekspresyonu down-regüle olmuştur. Bu nedenle *Salmonella*'nın flagellin faz varyasyonunun değiştiğini ve dolayısıyla *aroA* mutant suşta hareket kaybının olduğunu bildirmişlerdir.

Hücre kültüründe yapılan adhezyon ve invazyon testinde, *aroA* mutant *S. Kentucky*'nin, saha suşuna göre adhezyon ve invazyon yeteneğinin 15 kat azaldığı belirlendi. Müştak ve Yardımcı, (2019), adhezyon ve invazyon yeteneklerinin, *aroA* mutant *Salmonella* *Infantis* suşunda, saha suşuna göre 10 kat azaldığını bildirmişlerdir. Galan (1996), *Salmonella*'nın konak hücrelere adhezyonu ve invazyonu için gerekli genleri *SPI-I*'de barındırdığını, Lostroh ve Lee (2001), ise *SPI-I* ile ilişkili *T3SS*'nin, bakteriyel adhezyona ve invazyona aracılık ettiğini ve *T3SS* ile ilgili genlerin düzenlenmesinde ise *aroA* geninin etkili olduğu bildirmişlerdir. Salehi ve ark. (2016), *Salmonella*'nın konak hücreye adhezyonunda aromatik amino asitlerin biyosentezinin önemli bir yer tuttuğunu, Felgner ve ark. (2016),'nın bulgularına göre flagellar faz varyasyonunun değişimine bağlı olarak adhezyon ve invazyon yeteneklerinin azaldığını belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen adhezyon ve invazyon bulguları, diğer çalışmalarda elde edilen bulgular ile benzerdir.

Biyokimyasal analizlerin sonucunda, *aroA* mutant *S. Kentucky* suşunun, saha suşundan farklı olarak H₂S negatif olduğu ve XLD agarda sarımsak koloniler oluşturarak ürettiği belirlendi. Cooper ve ark. (1994), ile McWhorter ve Chousalkar (2018), da *Salmonella* suşlarında yürütmüş oldukları mutasyon çalışmalarında, *aroA* mutant *Salmonella* suşlarının XLD agarda H₂S negatif koloniler oluşturarak ürettiğini bildirmişlerdir. Ortaya çıkan bu durumun, *aroA* mutant bakterilerde şikimat yolağı ile ilişkili olan *NADPH/NADP* reaksiyonları ve *NADPH-Sulfite reductase* ile birlikte hücresel kemostat dinamiklerinin etkili olduğu bildirilmiştir (Siegel ve ark., 1973; Zhang ve ark., 2015). Bu çalışmaların aksine Müştak ve Yardımcı (2019), *aroA* mutant *Salmonella* Infantis suşunda H₂S pozitif bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında elde edilen *aroA* mutant *S. Kentucky* suşunun H₂S negatif koloniler oluşturması, Cooper ve ark. (1994), ve McWhorter ve Chousalkar (2018), tarafından yapılan çalışmalar ile uyumlu bulundu ancak Müştak ve Yardımcı (2019), tarafından yapılan çalışmadaki bulgudan farklıdır. Bu farklılığın nedeni olarak *aroA* mutant *Salmonella* Infantis suşu ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Antibiyotik duyarlılığındaki değişikliklere bakıldığında, *aroA* mutant *S. Kentucky*'nin, saha suşuna göre ampiciline, amoksisiline, trimetoprim ve sülfametoksazole tamamen duyarlı hale geldiği belirlendi. Müştak ve Yardımcı (2019),'nın çalışmalarında elde edilen bulgular, tez çalışmasında elde edilen bulgular ile benzerdir. Felgner ve ark. (2016), *aroA* mutant *Salmonella* suşunda ampisilin ve penisilin duyarlılığının arttığını bildirmişlerdir. Bunun nedeni olarak ubikuinon gösterilmektedir. Ubikuinon, korismattan sentezlenmektedir ve korismatin eksikliğine bağlı olarak ubikuinon sentezindeki kusurlar ile hücre duvarının ve ilişkili olduğu yapıların stabilitesinin etkilendiğini bildirmişlerdir. Sebkova ve ark. (2008), da *aroA* mutant *Salmonella* serovarlarında aromatik amino asitlerin sentezlenememesi ile birlikte dış membran fonksiyonları ve hücre duvarı fonksiyonlarındaki kusurların meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, Felgner ve ark. (2016), ile Sebkova ve ark. (2008),'nın bulguları ile desteklenmektedir.

Basset ve ark. (2004), trimethoprim ve sülfametoksazole olan duyarlılığın artışında bazı temel biyokimyasal süreçlerin rol oynadığını ileri sürmüştür. Bu biyokimyasal süreçlere göre, bakteriler *PabB* ve *PabC* enzimlerinin kombine etkisiyle korismatı kullanarak tetrahidrofolik asit (THF) sentez yolağının bir substratı olan para-aminobenzoik asite (PABA) dönüştürdüğünü ortaya koymuşlardır. Brogden ve ark. (1982), trimethoprim, THF sentez yolağında, dihidrofolik asit (DHF) redüktaz enzimine bağlanarak DHF'in THF'e indirgenmesini engellendiğini ve bakteriyel DNA sentezini engelleyenerek bakterisidal etki ettiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, sülfametoksazolün de aynı yolağın üst basamaklarında görev alan dihidropteroat sentazı inhibe ettiği bilinmektedir (Brogden ve ark., 1982). Tez çalışmasında elde edilen bulgulara bakıldığında, *aroA* mutant *S. Kentucky*'de PABA'nın sentezlenmesinde substrat olarak rol oynayan korismatın eksikliği nedeni ile THF sentez yolağının en baştan itibaren inhibe edildiği ve *aroA* mutant *S. Kentucky*'nin trimethoprim ve sülfametoksazole duyarlı hale geldiği değerlendirildi.

Sebkova ve ark. (2008), 'nın bir araştırmasına göre, *aroA* mutant *Salmonella* serovarlarının dış membran yapısında kusurlara bağlı olarak EDTA duyarlılığının saha suşuna göre 50 kat arttığını bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında, *aroA* mutant *S. Kentucky*'nin EDTA duyarlılığının saha suşu *S. Kentucky* göre 16 kat arttığı belirlendi. Tez çalışmasında elde edilen EDTA duyarlılık bulguları, Sebkova ve ark. (2008)'nin bulguları ile benzer niteliktedir.

Bu tez çalışmasında, broiler altlığında yürütülen in-vitro yaşama gücü analizinde farklı sıcaklıklarda *aroA* mutant suşunun yaşama gücü, saha suşuna göre bir log düşük olduğu belirlendi. Bu bulgu, *aroA* mutant *S. Kentucky*'nin, saha suşuna göre broiler altlığında yaşama gücünün saha suşuna göre zayıfladığını gösterdi. Felgner ve ark. (2016), *aroA* mutant *Salmonella* suşlarındaki zayıflığın nedeni olarak bakteri metabolizmasını sürdürmek için işlevsel bir şikimat yolağı eksikliğinin önemini vurgulamaktadır. Tez çalışmasında saha suşuna yönelik elde edilen bulgular Tucker (1967), ile Williams ve Benson (1978)'in bulguları ile benzer niteliktedir.

Salmonella aşı çalışmalarının başladığı 1900'li yıllardan günümüze kadar geçen süreçte, baskın *Salmonella* serovarlarına karşı birçok aktif ve inaktif aşı çalışmasının yanı sıra modern aşı teknolojilerinin de bu çalışmalara dahil olduğu bilinmektedir. Bu aşı aday suşlarının serovarlar üzerine antijenik çapraz koruyuculukları da araştırılmış olup başarılı sonuçlar elde edildiği bilinmektedir (Acevedo-Villanueva ve ark., 2021; Desin ve ark., 2013). Bu tez çalışmasının konusu olan *S. Kentucky* serovarına karşı sınırlı sayıda aktif ve inaktif aşı çalışması literatürlerde taranmıştır. Mohammed ve ark. (2015), inaktif *S. Kentucky* aşı çalışmaları yürütmüşlerdir. Elde edilen bulgulara bakıldığında humoral bağışıklığı sağladığını, ELISA testi ile antikor titresinin ölçülebildiğini, %80 oranında koruyuculuk sağladığını ve fekal saçılımı azalttığını bildirmiştir.

Salama ve ark. (2018), *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* serovarlarını içeren üçlü inaktif karma aşı çalışması yürütmüştür. İki doz aşının uygulanmasından üç hafta sonra virulent *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* saha suşları ile tehit edilmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre karma *Salmonella* aşısının koruyuculuk oranları tek dozda %79,5 iken, ikinci dozdan sonra %82,5 olduğu belirlenmiştir. Igomu ve ark. (2020), *S. Kentucky*'nin mutant suşunun elde edilmesinde kimyasal mutasyon yöntemi olan five-bromouracil kullanmıştır ve elde edilen bulgulara göre *S. Kentucky*'nin bağırsak kolonizasyonunu ve dışkıda saçılımını belirgin düzeyde azalttığını bildirmiştir.

Canlı *Salmonella* aşıları, diğer aşı formlarına göre çeşitli avantajlar sunmaktadır. Bunların başında mukozal bağışıklığı uyarmaya ek olarak, humoral ve hücrel bağışıklığı da uyardığı bilinmektedir (Gayet ve ark., 2017). Bu tez çalışması esnasında, taranan bilimsel literatürlerde, *aroA* mutant *Salmonella Kentucky* ile ilgili bir çalışma bulunamadığından, detaylı bilgiye ulaşılamadı ve bir değerlendirme yapmak mümkün olmadı.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Salmonella Kentucky, ülkemizde ve dünyada, kanatlı hayvanlardan ve kanatlı orijinli hayvansal gıdalardan izole edilen baskın serovarlar arasında yer almaktadır. Günümüze kadar geçen süreçte, bilimsel literatürlerde yapılan taramalar sonucunda *S. Kentucky*'e karşı geliştirilmiş *aroA* mutant canlı aşı suşu bulunamamıştır. Bu tez çalışmasında, ülkemizde ve dünyada ilk defa canlı *aroA* mutant *S. Kentucky* aşı adayı suşu geliştirildi. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

- Ribotiplendirme kütüphanesinde en çok ribopaterni olan suşlar arasından *aroA* genini barındıran ve mutasyonda fenotipik belirleyici olan ampisilin, kanamisin, neomisin, kloramfenikol duyarlılığı en yüksek olan *S. Kentucky* suşu, mutasyon çalışmalarında kullanılmak üzere aşı adayı suşu olarak belirlendi.
- Homolog rekombinasyon tekniği kullanılarak *S. Kentucky* suşunda *aroA* geninin mutasyonu başarıyla gerçekleştirildi ve mutasyonun konfirmasyonu yapıldı.
- *aroA* mutant *S. Kentucky* suşu ile saha suşunun fenotipik ve genotipik olarak ayrılabilirdiği belirlendi.
- *aroA* mutant *S. Kentucky* suşu ile hedef türlerdeki çalışmalarla potansiyel aşı olarak kullanılması ile ilgili daha detaylı bilgilere ulaşılması mümkün olacaktır.

Bu tez çalışmasında geliştirilen aşı adayı *aroA* mutant canlı *S. Kentucky* suşunun, potansiyel kullanılabilirliği açısından detaylı çalışmalara gereksinim vardır. Yürütülecek in-vivo çalışmalar, aşı adayı *aroA* mutant canlı *S. Kentucky* suşunun, kullanılabilir aşı olma potansiyeline katkı sağlayacaktır. Hedef tür(ler)de mutant suş ile yapılacak aşılama çalışmaları sonrasında kolonizasyon ve mukozal bağışıklığın belirlenmesi ve epruvasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır. Ayrıca *aroA* mutant canlı *S. Kentucky*'nin dışkı ile saçılımı, saçılım süresi ve çevreye etkilerinin de araştırılması yararlı bilgiler sağlayacaktır. Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, konuyla ilgili çalışma yürüten diğer çalışmalara ve araştırmacılara katkı sağlama niteliğindedir.

ÖZET

Kanatlı Orijinli *Salmonella* Kentucky Suşlarından Canlı Mutant Aşı Adayı Suşunun Geliştirilmesi

Salmonella, insanlarda ve hayvanlarda gastrointestinal sistem enfeksiyona neden olan önemli zoonotik bir patojendir. Tavuklarda, *Salmonella* sıklığını azaltmada aşılama özellikle *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* kolonizasyonuna karşı kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, Türkiye’de kanatlı hayvanlarda dominant *Salmonella* serovarlarından biri olan *S. Kentucky*’e karşı *aroA* mutant canlı aşı aday suşunun geliştirilmesi ve in-vitro karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, USRL kültür koleksiyonundaki *S. Kentucky* suşlarından fenotipik ve moleküler özelliklerine göre mutasyon yapılacak suş seçimi gerçekleştirildi. Seçilen suшта, *aroA* mutasyonu Lambda-Red rekombinasyon metodu ile gerçekleştirildi. *aroA* mutant suş ile saha suşuna karşılatırmalı olarak adhezyon ve invazyon analizi, hareket analizi, biyokimyasal analizler, antibiyotik ve EDTA duyarlılık analizi yapıldı. *aroA* mutant canlı *S. Kentucky* aşı aday suşunun in-vitro analiz bulgularında saha suşuna göre adhezyon ve invazyon yeteneğinin 15 kat zayıfladığı; hareketliliğinin azaldığı; H₂S üretmediği; ampisiline, amoksisiline, trimethoprime, sülfametoksazole daha duyarlı hale geldiği; EDTA duyarlılığının 16 kat arttığı belirlendi.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, kanatlı hayvanlarda aşı potansiyeli olan *aroA* mutant canlı *S. Kentucky* suşu elde edildi. Gelecekte yürütülecek in-vivo ve epruvasyon çalışmaları sonrasında şuan için aşı aday suşu olan *aroA* mutant canlı *S. Kentucky* suşunun, kullanılabilir bir aşı olma potansiyelinin yüksek olduğu belirlendi. *aroA* mutant canlı *S. Kentucky* suşunun epruvasyon çalışmalarının yapılması, kolonizasyon ve mukozal bağışıklığın belirlenmesi ile aşı olarak kullanılabilirliği ile ilgili bilgi sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: *aroA*, Aşı, Kanatlı, Mutasyon, *S. Kentucky*.

SUMMARY

Development of Live Mutant Vaccine Candidate Strain from *Salmonella* Kentucky Strains of Poultry Origin

Salmonella is an important zoonotic pathogen that causes gastrointestinal tract infections in humans and animals. In poultry, vaccination is used to reduce the incidence of *Salmonella*, especially against colonization of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. In this thesis, it was aimed to develop and in-vitro characterization of *aroA* mutant live vaccine candidate strain against *S. Kentucky*, one of the dominant *Salmonella* serovars in poultry in Turkey.

In this thesis, strain selection was performed from *S. Kentucky* strains in the USRL culture collection according to their phenotypic and molecular characteristics. In the selected strain, *aroA* mutation was carried out by *Lambda-Red* recombination method. Adhesion and invasion analysis, movement analysis, biochemical analysis, antibiotic and EDTA susceptibility analysis were performed comparatively to the *aroA* mutant strain and the field strain. In the in-vitro analysis findings of the *aroA* mutant live *S. Kentucky* vaccine candidate strain, the adhesion and invasion ability was weakened by 15 fold compared to the field strain; decreased mobility; does not produce H₂S; become more sensitive to ampicillin, amoxicillin, trimethoprim, sulfamethoxazole; It was determined that EDTA sensitivity increased 16 fold.

As a result, in this thesis study, *aroA* mutant live *S. Kentucky* strain with vaccine potential in poultry was obtained. After in-vivo and challenge studies to be carried out in the future, it was determined that the *aroA* mutant live *S. Kentucky* strain, which is currently a vaccine candidate, has a high potential to be a usable vaccine. Performing challenge studies of *aroA* mutant live *S. Kentucky* strain will provide information about its use as a vaccine, as well as colonization and determination of mucosal immunity.

Key Words: *aroA*, Mutation, Poultry, *S. Kentucky*, Vaccine.

KAYNAKLAR

- ACEVEDO-VILLANUEVA KY, AKERELE GO, AL HAKEEM WG, RENU S, SHANMUGASUNDARAM R, SELVARAJ RK. (2021). A Novel Approach against *Salmonella*: A Review of Polymeric Nanoparticle Vaccines for Broilers and Layers. *Vaccines*. **9**: 1041.
- AKAN M. (2010). Editörden. Kanatlılarda *Salmonella* Enfeksiyonları Özel Sayısı. Akan M. (Ed.). ISSN:1309-6907. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*. **1**: 2.
- ALDERTON MR, FAHEY KJ, COLOE PJ. (1991). Humoral Responses and Salmonellosis Protection in Chickens Given a Vitamin-Dependent *Salmonella* Typhimurium Mutant. *Avian Dis*. **35**: 435-442.
- ALPER MD, AMES BN. (1978). Transport of Antibiotics and Metabolite Analogs by Systems Under Cyclic AMP Control: Positive Selection of *Salmonella* Typhimurium *cya* and *crp* Mutants. *J. Bacteriol*. **133**: 149-57.
- BABU U, SCOTT M, MYERS MJ, OKAMURA M, GAINES D, YANCY HF, LILLEHOJ H, HECKERT RA, RAYBOURNE RB. (2003). Effects of Live Attenuated and Killed *Salmonella* Vaccine on T-Lymphocyte Mediated Immunity in Laying Hens. *Vet. Immunol. Immunopathol*. **91**: 39-44.
- BAILEY JS, STERN NJ, FEDORKA-CRAY P, CRAVEN SE, COX NA, COSBY DE, LADELY S, MUSGROVE MT. (2001). Sources and Movement of *Salmonella* Through Integrated Poultry Operations: A Multistate Epidemiological Investigation. *J. Food. Prot*. **64**: 1690-1697.
- BARROW PA. (2007). *Salmonella* Infections: Immune and Non-Immune Protection with Vaccines. *Avian Pathol*. **36**: 1-13.
- BARROW PA, HASSAN JO, BERCHIERI A JR. (1990). Reduction in Faecal Excretion by Chickens of *Salmonella* Typhimurium by Immunization with Avirulent Mutants of *Salmonella* Typhimurium. *Epidemiol. Infect*. **104**: 413-426.
- BARROW PA, LOVELL MA, BERCHIERI A JR. (1991). The Use of Two Live Attenuated Vaccines to Immunize Egg-Laying Hens Against *Salmonella* Enteritidis Phage Type 4. *Avian Pathol*. **20**: 681-692.
- BARROW PA, LOVELL MA, MURPHY CK, PAGE K. (1999). *Salmonella* Infection in a Commercial Line of Ducks; Experimental Studies on Virulence, Intestinal Colonisation and Immune Protection. *Epidemiol. Infect*. **123**: 121-132.
- BARROW PA, WALLIS TS. (2000). Vaccination Against *Salmonella* Infections in Food Animals: Rationale, Theoretical Basis and Practical Application. In *Salmonella in Domestic Animals*. Edited by: Wray A and Wray C. Oxford: CAB International. **PP**: 323-339.
- BASSET, GJ, QUINLIVAN EP, RAVANEL S, REBEILLE F, NICHOLS BP, SHINOZAKI K, SEKI M, ADAMS-PHILLIPS LC, GIOVANNONI JJ, GREGORY JF, HANSON AD. (2004). Folate Synthesis in Plants: The P-Aminobenzoate Branch is Initiated by a Bifunctional PabA-PabB Protein that is Targeted to Plastids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**: 1496-1501.
- BEAL RK, SMITH AL. (2007). Antibody Response to *Salmonella*: Its Induction and Role in Protection Against Avian Enteric Salmonellosis. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther*. **5**: 873-881.

- BENDER SL, MEHDI S, KNOWLES JR. (1989). Dehydroquinase Synthase: The Role of Divalent Metal Cations and of Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Catalysis. *Biochemistry*. **28**: 7555-7560.
- BIEDZKA-SAREK M, EL SKURNIK M. (2006). How to Outwit the Enemy: Dendritic Cells Face Salmonella. *APMIS*. **114**: 589-600.
- BINOTTO J, MACLACHLAN PR, SANDERSON KE. (1991). Electrotransformation in Salmonella Typhimurium LT2. *Can. J. Microbiol.* **37**: 474-477.
- BRADEN CR. (2006). Salmonella enterica serotype Enteritidis and Eggs: A National Epidemic in the United States. *Clin. Infect. Dis.* **43**: 512-517.
- BRENNER FW, VILLAR RG, ANGULO FJ, TAUXE R, SWAMINATHAN B. (2000). Salmonella Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2465-2467.
- BROGDEN RN, CARMINE AA, HEEL RC, SPEIGHT TM, AVERY GS. (1982). "Trimethoprim: A Review of its Antibacterial Activity, Pharmacokinetics and Therapeutic Use in Urinary Tract Infections". *Drugs*. **23**: 405-430.
- CALLAWAY TR, EDRINGTON TS, ANDERSON RC, BYRD JA, NISBET DJ. (2008). Gastrointestinal Microbial Ecology and the Safety of Our Food Supply as Related to *Salmonella*. *J. Anim. Sci.* **86**: 163-172.
- CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). (2017). Foodborne Outbreak Online Database. <https://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>. Erişim Tarihi: 01.06.21.
- CERQUETTI MC, GHERARDI MM. (2000). Vaccination of Chickens with a Temperature Sensitive Mutant of Salmonella Enteritidis. *Vaccine*. **18**: 1140-1145.
- CHAPPELL L, KAISER P, BARROW P, JONES MA, JOHNSTON C, WIGLEY P. (2009). The Immunobiology of Avian Systemic Salmonellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **128**: 53-59.
- CHATFIELD S, STRAHAN K, PICKARD D, CHARLES IG, HORMAECHE CE, DOUGAN G. (1992). Evaluation of *Salmonella* Typhimurium Strains Harboring Defined Mutations in *htrA* and *aroA* in the Murine Salmonellosis Model. *Microb. Pathog.* **12**: 145-151.
- CHATFIELD S, ROBERTS M, LI J, STARNES A, DOUGAN G. (1994). The Use of Live Attenuated Salmonella for Oral Vaccination. *Dev. Biol. Stand.* **82**: 35-42.
- CIRILLO DM, VALDIVIA RH, MONACK DM, FALKOW S. (1998). Macrophage Dependent Induction of The Salmonella Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System and its Role in Intracellular Survival. *Mol. Microbiol.* **30**: 175-188.
- COOPER GL, NICHOLAS RA, CULLEN GA, HORMAECHE CE. (1990). Vaccination of Chickens with a *Salmonella* Enteritidis AroA Live Oral *Salmonella* Vaccine. *Microb. Pathog.* **9**: 255-265.
- COOPER GL, VENABLES LM, WOODWARD MJ, HORMAECHE CE. (1994). Invasiveness and Persistence of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, and a Genetically Defined *S. Enteritidis aroA* Strain in Young Chickens. *Infect. Immun.* **62**: 4739-4746.
- CORACINI JD, DE AZEVEDO WF JR. (2014). Shikimate Kinase, a Protein Target for Drug Design. *Curr. Med. Chem.* **21**: 592-604.
- COSSART P, SANSONETTI PJ. (2004). Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens. *Science*. **304**: 242-248.

- COYNAULT C, NOREL F. (1999). Comparison of The Abilities of *Salmonella* Typhimurium rpoS, aroA and rpoS aroA Strains to Elicit Humoral Immune Responses in BALB/c Mice and To Cause Lethal Infection in Athymic BALB/c Mice. *Microb.Pathog.* **26**: 299-305.
- CURTISS R 3RD, KELLY SM. (1987). *Salmonella* Typhimurium Deletion Mutants Lacking Adenylate Cyclase and Cyclic AMP Receptor Protein Are Avirulent and Immunogenic. *Infect.Immun.* **55**: 3035-3043.
- D'AOUST J, MAURER J. (2007). *Salmonella* Species. Editors, DOYLE M, BEUCHAT L. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 3rd. Washington, USA: ASM Press. **PP**: 187-236.
- DAVIS MA, HANCOCK DD, BESSER TE. (2002). Multiresistant Clones of *Salmonella enterica*: The Importance of Dissemination. *J. Lab. Clin. Med.* **140**: 135-141.
- DEKA RK, KLEANTHOUS C, COGGINS JR. (1992). Identification of the Essential Histidine Residue at the Active Site of Escherichia coli Dehydroquinase. *J. Biol. Chem.* **267**: 22237-22242.
- DESIN TS, KOSTER W, POTTER AA. (2013). *Salmonella* Vaccines in Poultry: Past, Present and Future. *Expert Rev Vaccines.* **12**: 87-96.
- DEWICK PM. (1998). The Biosynthesis of Shikimate Metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **15**: 17-58.
- DOUGAN G, SMITH L, HEFFERON F. (1989). Live Bacterial Vaccines and Their Applications as Carriers for Foreign Antigens. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **33**: 271-300.
- DUNKLEY KD, CALLAWAY TR, CHALOVA VI, MCREYNOLDS JL, HUME ME, DUNKLEY CS, KUBENA LF, NISBET DJ, RICKE SC. (2009). Foodborne *Salmonella* Ecology in The Avian Gastrointestinal Tract. *Anaerobe.* **15**: 26-35.
- EDWARDS PR. (1938). A New *Salmonella* Type: *Salmonella* Kentucky. *J. Hyg. (Lond).* **38**: 306-308.
- EFSA. (2019). *Salmonella* Control in Poultry Flocks and Its Public Health Impact. EFSA Panel on Biological Hazards. *EFSA Journal.* **17**: e05596.
- EISENSTEIN TK, KILLAR LM, STOCKER BA, SULTZER BM. (1984). Cellular Immunity Induced by Avirulent *Salmonella* in LPS Defective C3H/HeJ Mice. *J. Immunol.* **133**: 958-61.
- ELSEMORE DA, ORNSTON LN. (1994). The pca-pob Supraoperonic Cluster of *Acinetobacter Calcoaceticus* Contains quiA, The Structural Gene for Quinate-Shikimate Dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **176**: 7659-7666.
- EYKMAN JF. (1881). The Botanical Relations Of *Illicium Religiosum*, Sieb., *Illicium Anisatum*, Lour. *Am. J. Pharm.* **53**: 412.
- FADL AA, VENKITANARAYANAN K, KHAN MI. (2002). Identification of *Salmonella* Enteritidis Outer Membrane Proteins Expressed During Attachment to Human Intestinal Epithelial Cells. *J. Appl. Microbiol.* **92**: 180-186.
- FEASEY NA, DOUGAN G, KINGSLEY RA, HEYDERMAN RS, GORDON MA. (2012). Invasive Non-Typhoidal *Salmonella* Disease: An Emerging and Neglected Tropical Disease in Africa. *Lancet.* **379**: 2489-2499.
- FEBERWEE A, HARTMAN EG, DE WIT JJ, DE VRIES TS. (2001). The Spread of *Salmonella* Gallinarum 9R Vaccine Strain Under Field Conditions. *Avian Dis.* **45**: 1024-1029.
- FELGNER S, FRAHM M, KOCIJANCIC D, ROHDE M, ECKWEILER D, BIELECKA A, BUENO E, CAVA F, ABRAHAM WR, CURTISS R, HAUSSLER S, ERHARDT M, WEISS S. (2016).

- aroA-Deficient *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is More Than a Metabolically Attenuated Mutant. *Mbio*. **7**: e01220-16.
- FIELD TE, HOWARD JG, WHITBY JL. (1955). Studies on the Rapid Production of a Non-Specific Type of Immunity to *Salmonella Typhi* Infection in Mice. *J. R. Army Med. Corps*. **101**: 324-444.
- FINLAY B, FALKOW S. (1990). *Salmonella* Interactions With Polarized Human Intestinal Caco-2 Epithelial Cells. *J. Infect. Dis*. **162**: 1096-1106.
- FOLEY SL, NAYAK R, HANNING IB, JOHNSON TJ, HAN J, RICKE SC. (2011). Population Dynamics of *Salmonella enterica* Serotypes in Commercial Egg and Poultry Production. *Appl. Environ. Microbiol*. **77**: 4273-4279.
- FROST JW, BENDER JL, KADONAGA JT, KNOWLES JR. (1984). Dehydroquinase from *Escherichia coli*: Purification, Cloning, and Construction of Overproducers of The Enzyme. *Biochemistry*. **23**: 4470-4475.
- GALAN JE. (1996). Molecular and Cellular Bases of *Salmonella* Entry into Host Cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. **209**: 43-60.
- GALAN JE, ZHOU D. (2000). Striking a Balance: Modulation of the Actin Cytoskeleton by *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **97**: 8754-8761.
- GALAN JE, 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; World Health Organization Global Salm-Surv. (2006). Web-Based Surveillance and Global *Salmonella* Distribution, 2000-2002. *Emerg. Infect. Dis*. **12**: 381-388.
- GARNER CC, HERRMANN KM. (1984). Structural Analysis of 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonate 7-Phosphate by 1H and Natural-Abundance 13C-NMR Spectroscopy. *Carbohydrate Research*. **132**: 317-322.
- GAST RK. (2007). Serotype-Specific and Serotype-Independent Strategies for Preharvest Control of Food-Borne *Salmonella* in Poultry. *Avian Dis*. **51**: 817-828.
- GAYET R, BIOLEY G, ROCHEREAU N, PAUL S, CORTHESEY B. (2017). Vaccination Against *Salmonella* Infection: The Mucosal Way. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **81**: e00007-17.
- GERMANIER R, FUER E. (1975). Isolation and Characterization of *Gale* Mutant Ty21a of *Salmonella Typhi*: A Candidate Strain for a Live, Oral Typhoid Vaccine. *J. Infect. Dis*. **131**: 553-558.
- GIBSON F. (1999). The Elusive Branch-Point Compound of Aromatic Amino Acid Biosynthesis. *Trends Biochem. Sci*. **24**: 36-38.
- GRIFFIN HG, GASSON MJ. (1995). The Gene (*aroK*) Encoding Shikimate Kinase I from *Escherichia coli*. *DNA Sequence*. **5**: 195-197.
- GRIMONT PA, WEILL FX. (2007). Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. **9**: 1-166.
- GROISMAN EA, CHIAO E, LIPPS CJ, HEFFRON F. (1989). *Salmonella Typhimurium* *phoP* Virulence Gene is A Transcriptional Regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **86**: 7077-7081.

- HAFEZ HM. (2010). Salmonella Infections in Poultry: Control Approaches in the European Union. *Turkiye Klinikleri J. Vet. Sci.* **1**: 80-88.
- HAHN I. (2000). A Contribution to Consumer Protection: TAD Salmonella vac1 E—a New Live Vaccine for Chickens Against Salmonella Enteritidis. *Lohmann Information.* **23**: 29-32.
- HALL RM. (2010). Salmonella Genomic Islands and Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica*. *Future Microbiol.* **5**: 1525-1538.
- HARRISON JA, VILLARREAL-RAMOS B, MASTROENI P, DEMARCO DE HORMAECHE R, HORMAECHE CE. (1997). Correlates of Protection Induced by Live Aro- *Salmonella* Typhimurium Vaccines in The Murine Typhoid Model. *Immunology.* **90**: 618-625.
- HERRMANN KM. (1983). The Common Aromatic Biosynthetic Pathway. In Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation, Ed. Herrmann KM, Somerville RL. London. Addison-Wesley. **PP**: 453.
- HERRMANN KM, WEAVER LM. (1999). The Shikimate Pathway. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **50**: 473-503.
- HONE DM, ATTRIDGE SR, FORREST B, MORONA R, DANIELS D, LABROOY JT, BARTHOLOMEUSZ RC, SHEARMAN DJ, HACKETT J. (1988). A *galE* via (Vi antigen-negative) Mutant of Salmonella Typhi Ty2 Retains Virulence in Humans. *Infect. Immun.* **56**: 1326-1333.
- HOWARD ZR, O'BRYAN CA, CRANDALL PG, RICKE SC. (2012). Salmonella Enteritidis in Shell Eggs: Current Issues and Prospects for Control. *Food Research International.* **45**: 755-764.
- IGOMU EE, FAGBAMILA IO, ELAYONI EE, PWAJOK D, AGU GC, GOVWANG PF, MAMMAN PH. (2020). Production and efficacy testing of live attenuated and inactivated vaccines against experimental Salmonella Kentucky infection in broiler chickens. *AJOL.* **21**: 192-203.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. (2017). ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella spp. ISO Central Secretariat Chemin de Blandonnet 8 CP 401-1214 Vernier, Geneva, Switzerland.
- ISSENHUTH-JEANJEAN S, ROGGENTIN P, MIKOLEIT M, GUIBOURDENCHE M, DE PINNA E, NAIR S, FIELDS PI, WEILL FX. (2014). Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor Scheme. *Res. Microbiol.* **165**: 526-530.
- IZGUR M. (2010). Kanatlı Salmonella Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi. *Turkiye Klinikleri J. Vet. Sci.* **1**: 61-78.
- JOHANSSON ME, HANSSON GC. (2016). Immunological Aspects of Intestinal Mucus and Mucins. *Nat. Rev. Immunol.* **16**: 639-649.
- KHAN MI, FADL AA, VENKITANARAYANAN KS. (2003). Reducing Colonization of *Salmonella* Enteritidis in Chicken by Targeting Outer Membrane Proteins. *J. Appl. Microbiol.* **95**: 142-145.
- KILLAR LM, EISENSTEIN TK. (1985). Immunity to *Salmonella* Typhimurium Infection in C3H/HeJ and C3H/HeNCrlBR Mice: Studies with An Aromatic Dependent Live *Salmonella* Typhimurium Strain as a Vaccine. *Infect. Immun.* **47**: 605-612.
- KISHORE GM, SHAH DM. (1988). Amino Acid Biosynthesis Inhibitors As Herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 627-663.

- KLOSE KE, MEKALANOS JJ. (1997). Simultaneous Prevention of Glutamine Synthesis and High-Affinity Transport Attenuates *Salmonella* Typhimurium Virulence. *Infect. Immun.* **65**: 587-596.
- KOPECKO DJ, SIEBER H, URES JA, FURER A, SCHLUP J, KNOF U, COLLIOUD A, XU D, COLBURN K, DIETRICH G. (2009). Genetic Stability of Vaccine Strain *Salmonella* Typhi Ty21a Over 25 Years. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**: 233-246.
- KOTTOM TJ, NOLAN LK, BROWN J. (1995). Invasion of Caco-2 Cells by *Salmonella* Typhimurium (Copenhagen) Isolates From Healthy and Sick Chickens. *Avian Dis.* **39**: 867-872.
- KUSTERS JG, MULDER-KREMERS GAWM, VAN DOORNIK EM, VAN DER ZEIJST BAM. (1993). Effects of Multiplicity of Infection, Bacterial Protein Synthesis and Growth Phase on Adhesion to and Invasion of Human Cell Lines by *Salmonella* Typhimurium. *Infect. Immun.* **61**: 5013-5020.
- LI Q, REN J, XIAN H, YIN C, YUAN Y, LI Y, JI R, CHU C, QIAO Z, JIAO X. (2020). rOmpF and OMVs as Efficient Subunit Vaccines Against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Infections in Poultry Farms. *Vaccine.* **38**: 7094-7099.
- LINDE K, HAHN I, VIELITZ E. (1997). Development of Live *Salmonella* Vaccines Optimally Attenuated for Chickens. *Lohmann Information.* **20**: 23-31.
- LIU W, YANG Y, CHUNG N, KWANG J. (2001). Induction of Humoral Immune Response and Protective Immunity in Chickens Against *Salmonella* Enteritidis After a Single Dose of Killed Bacterium-Loaded Microspheres. *Avian Dis.* **45**: 797-806.
- LOSTROH CP, LEE CA. (2001). The *Salmonella* Pathogenicity Island-I Type III Secretion System. *Microbes Infect.* **3**: 1281-1291.
- LOWE DC, SAVIDGE TC, PICKARD D, ECKMANN L, KAGNOFF MF, DOUGAN G, CHATFIELD SN. (1999). Characterization of Candidate Live Oral *Salmonella* Typhi Vaccine Strains Harboring Defined Mutations in *aroA*, *aroC*, and *htrA*. *Infect. Immun.* **67**: 700-707.
- MACIOROWSKI KG, JONES FT, PILLAI SD, RICKE SC. (2004). Incidence, Sources, and Control of Foodborne *Salmonella* spp. in Poultry Feeds. *WPSJ.* **60**: 446-457.
- MASTROENI P, CHABALGOITY JA, DUNSTAN SJ, MASKELL DJ, DOUGAN G. (2000). *Salmonella*: Immune Responses and Vaccines. *Vet. J.* **161**: 132-164.
- MATUSCHEK E, BROWN DF, KAHLMEIER G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**: 255-66.
- McCAPES RH, COFFLAND RT, CHRISTIE LE. (1967). Challenge of Turkey Poults Originating from Hens Vaccinated with *Salmonella* Typhimurium Bacterin. *Avian Dis.* **11**: 15-24.
- McWHORTER AR, CHOUSALKAR KK. (2018). A Long-Term Efficacy Trial of a Live, Attenuated *Salmonella* Typhimurium Vaccine in Layer Hens. *Front. Microbiol.* **9**: 1380.
- MEENAKSHI M, BAKSHI CS, BUTCHIAH G, BANSAL MP, SIDDIQUI MZ, SINGH VP. (1999). Adjuvanted Outer Membrane Protein Vaccine Protects Poultry Against Infection with *Salmonella* Enteritidis. *Vet. Res. Commun.* **23**: 81-90.
- MEYER H, KOCH H, METHNER U, STEINBACH G. (1993). Vaccines in Salmonellosis Control in Animals. *Zentralbl. Bakteri.* **278**: 407-415.

- MILLER SI, LOOMIS WP, ALPUCHE-ARANDA C, BEHLAU I, HOHMANN E. (1993). The *PhoP* Virulence Regulon and Live Oral *Salmonella* Vaccines. *Vaccine*. **11**: 122-125.
- MIR R, JALLU S, SINGH TP. (2015). The Shikimate Pathway: Review of Amino Acid Sequence, Function and Three-Dimensional Structures of the Enzymes. *Crit. Rev. Microbiol.* **41**: 172-189.
- MOHAMMED NN, ABDEL AZIZ WR, ZAKI ES. (2015). Efficacy of locally prepared *Salmonella* Kentucky vaccine in chicken. *BVMJ*. **29**: 153-160.
- MONTE DM, SELLERA FP. (2020). *Salmonella*. *Emerging Infectious Diseases*. **26**: 2955.
- MÜŞTAK İB, YARDIMCI H. (2019). Construction and in vitro characterisation of *aroA* defective (*aroAD*) mutant *Salmonella* Infantis. *Arch Microbiol.* **201**: 1277–1284.
- NAGARAJA KV and RAJASHEKARA G. (1999). “Vaccination Against *Salmonella* enterica serovar Enteritidis Infection: Dilemma and Realities”. In *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Humans and Animals, Edited by: Saeed AM. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA. **PP**: 397-404.
- NATARO J, BOPP C, FIELDS P, KAPER J, STROCKBINE NA. (2011). *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: VERSALOVIC J, CARROLL K, FUNKE G, JORGENSEN J, LANDRY M, WARNOCK D, Editors: Manual of Clinical Microbiology. 10th. Washington DC, USA. ASM Press. **PP**: 603-626.
- NATARO JP, BOPP CA, FIELDS PI, KAPER JB, STROCKBINE NA. (2007). “*Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*,” in Manual of Clinical Microbiology, 9th Ed. Eds P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M.A. Pfaller. Washington, D.C. ASM Press. **PP**: 670–687.
- NIKOLAUS T, DEIWICK J, RAPPL C, FREEMAN JA, SCHRODER W, MILLER SI, HENSEL M. (2001). SseBCD Proteins are Secreted by the Type-III Secretion System of *Salmonella* Pathogenicity Island-2 and Function as a Translocon. *J. Bacteriol.* **83**: 6036-6045.
- O’CALLAGHAN D, MASKELL D, LIEWFY, EASMON CS, DOUGAN G. (1988). Characterization of Aromatic and Purine Dependent *Salmonella* Typhimurium: Attenuation, Persistence, and Ability to Induce Protective Immunity in BALB/c Mice. *Infect. Immun.* **56**: 419-423.
- PARKER C, ASOKAN K, GUARD-PETTER J. (2001). Egg Contamination by *Salmonella* serovar Enteritidis Following Vaccination with Delta AroA *Salmonella* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**: 73-78.
- PASCUAL DW, SUO Z, CAO L, AVCI R, YANG X. (2013). Attenuating Gene Expression (AGE) for Vaccine Development. *Virulence*. **4**: 384-390.
- PELASEYED T, BERGSTROM JH, GUSTAFSSON JK, ERMUND A, BIRCHENOUGH GM, SCHUTTE A, VAN DER POST S, SVENSSON F, RODRIGUEZ-PINEIRO AM, NYSTROM EE, WISING C, JOHANSSON ME, HANSSON GC. (2014). The Mucus and Mucins of the Goblet Cells and Enterocytes Provide the First Defense Line of the Gastrointestinal Tract and Interact with the Immune System. *Immunol. Rev.* **260**: 8-20.
- PRITCHARD DG, NIVAS SC, YORK MD, POMEROY BS. (1978). Effects of Gal-E-Mutant of *Salmonella* Typhimurium on Experimental Salmonellosis in Chickens. *Avian Dis.* **22**: 562-575.
- ROBERTS F, ROBERTS CW, JOHNSON JJ, KYLE DE, KRELL T, COGGINS JR, MCLEOD R. (1998). Evidence for The Shikimate Pathway in Apicomplexan Parasites. *Nature*. **393**: 801-805.
- ROBERTSON J, YOSHIDA C, GURNIK S, NASH J. (2018). Completed Genome Sequences of Strains from 36 Serotypes of *Salmonella*. *Genome Announc.* **6**: e01472-17.

- RODRIGUEZ A, PANGLOLI P, RICHARDS HA, MOUNT JR, DRAUGHON FA. (2006). Prevalence of Salmonella in Diverse Environmental Farm Samples. *J. Food Prot.* **69**: 2576-2580.
- RYAN MP, O'DWYER J, ADLEY CC. (2017). Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen Salmonella. *Biomed Res. Int.* **Epub 2017**: 3782182.
- SALAMA SS, GAMAL FEZ, GADALLAH F. (2018). Estimation of protective indices in chicken vaccinated with single and booster doses of trivalent salmonella vaccine. *J Bacteriol Mycol.* **6**: 200-203.
- SALEHI S, HOWE K, LAWRENCE ML, BROOKS JP, BAILEY RH, KARSI A. (2016). Salmonella enterica Serovar Kentucky Flagella Are Required for Broiler Skin Adhesion and Caco-2 Cell Invasion. *Appl Environ Microbiol.* **83**: e02115-16.
- SANCHEZ S, HOFACRE CL, LEE MD, MAURER JJ, DOYLE MP. (2002). Animal Sources of Salmonellosis in Humans. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **221**: 492-497.
- SAREYYÜPOĞLU B. (2010). Kanatlı Salmonella Enfeksiyonlarının Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle Teşhisi. *Türkiye Klinikleri J. Vet. Sci.* **1**: 69-79.
- SCHLUMBERGER MC, MULLER AJ, EHRBAR K, WINNEN B, DUSS I, STECHER B, HARDT WD. (2005). Real-Time Imaging of Type III Secretion: Salmonella SipA Injection into Host Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 12548-12553.
- SCHWARZ S, LIEBISCH B. (1994). Pulsed-Field Gel Electrophoretic Identification of Salmonella enterica serovar Typhimurium Live Vaccine Strain Zoosaloral H. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**: 469-472.
- SEBKOVA A, KARASOVA D, CRHANOVA M, BUDINSKA E, RYCHLIK I. (2008). aro Mutations in Salmonella enterica Cause Defects in Cell Wall and Outer Membrane Integrity. *J. Bacteriol.* **190**: 3155-3160.
- SHEA JE, HENSEL M, GLEESON C, HOLDEN DW. (1996). Identification of a Virulence Locus Encoding a Second Type-III Secretion System in *Salmonella* Typhimurium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 2593-2597.
- SIEGEL LM, MURPHY MJ, KAMIN H. (1973). Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Sulfite Reductase of Enterobacteria. I The Escherichia coli Hemoflavoprotein: Molecular Parameters and Prosthetic Groups. *J. Biol. Chem.* **248**: 251-264.
- 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.
- SONG M, KIM HJ, KIM EY, SHIN M, LEE HC, HONG Y, RHEE JH, YOON H, RYU S, LIM S, CHOY HE. (2004). ppGpp Dependent Stationary Phase Induction of Genes on *Salmonella* Pathogenicity Island-I. *J. Biol. Chem.* **279**: 34183-34190.
- SPRINGER S, LEHMANN J, LINDNER TH, THIELEBEIN J, ALBER G, SELBITZ HJ. (2000). A New Live *Salmonella* Enteritidis Vaccine for Chicken - Experimental Evidence of Its Safety and Efficacy. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **113**: 246-252.
- STALLINGS WC, ABDEL-MEGUID SS, LIM LW, SHIEH HS, DAYRINGER HE, LEIMGRUBER NK, KISHORE GM. (1991). Structure and Topological Symmetry of The Glyphosate Target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase: A Distinctive Protein Fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 5046-5050.

- SU LH, CHIU CH, CHU C, OU JT. (2004). Antimicrobial Resistance in Nontyphoid *Salmonella* Serotypes: A Global Challenge. *Clin. Infect. Dis.* **39**: 546-551.
- TACKET CO, HONE DM, CURTISS R 3RD, KELLY SM, LOSONSKY G, GUERS L, HARRIS AM, EDELMAN R, LEVINE MM. (1992). Comparison of the Safety and Immunogenicity of delta *aroC* delta *aroD* and delta *cya* delta *crp* *Salmonella* Typhi Strains in Adult Volunteers. *Infect. Immun.* **60**: 536-541.
- TENNANT SM, WANG JY, GALEN JE, SIMON R, PASETTI MF, GAT O, LEVINE MM. (2011). Engineering and Preclinical Evaluation of Attenuated Nontyphoidal *Salmonella* Strains Serving as Live Oral Vaccines and As Reagent Strains. *Infect. Immun.* **79**: 4175-4185.
- TENNANT SM, LEVINE MM. (2015). Live Attenuated Vaccines for Invasive *Salmonella* Infections. *Vaccine.* **33**: 36-41.
- TINDALL BJ, GRIMONT PAD, GARRITY GM, EUZEBY JP. (2005). Nomenclature and Taxonomy of the Genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 521-524.
- TITSLER RP, SANDHOLZER LA. (1936). The Use of Semi-Solid Agar for the Detection of Bacterial Motility. *J. Bacteriol.* **31**: 575-580.
- TUCKER JF. (1967). Survival of *Salmonella* in Built-up Litter for Housing of Rearing and Laying Fowls. *Brit. Vet. J.* **123**: 92-103.
- VAN IMMERSEEL F, DE BUCK J, DE SMET I, MAST J, HAESBROUCK F, DUCATELLE R. (2002). The Effect of Vaccination with a *Salmonella* Enteritidis *aroA* Mutant on Early Cellular Responses in Caecal Lamina Propria of Newly-Hatched Chickens. *Vaccine.* **20**: 3034-3041.
- VAN IMMERSEEL F, METHNER U, RYCHLIK I, NAGY B, VELGE P, MARTIN G, FOSTER N, DUCATELLE R, BARROW PA. (2005). Vaccination and Early Protection Against Non-Host-Specific *Salmonella* Serotypes in Poultry: Exploitation of Innate Immunity and Microbial Activity. *Epidemiol. Infect.* **133**: 959-978.
- VIELITZ E, CONRAD C, VOSS M, LOHREN U, BACHMEIER J, HAHN I. (1992). Immunization Against *Salmonella* Infections Using Live and Inactivated Vaccine Preparations. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **99**: 483-485.
- WILLIAMS J, BENSON S. (1978). Survival of *Salmonella* Typhimurium in Poultry Feed and Litter at Three Temperatures. *Avian Dis.* **22**: 742-747.
- ZHANG J, TEN PIERICK A, VAN ROSSUM HM, SEIFAR RM, RAS C, DARAN JM, HEIJNEN JJ, WAHL SA. (2015). Determination of the Cytosolic NADPH/NADP Ratio in *Saccharomyces cerevisiae* Using Shikimate Dehydrogenase as Sensor Reaction. *Sci. Rep.* **5**: 12846.