

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

***SALMONELLA* SEROTİPLERİNDE BİYOFİLM VE
VİRULENS İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

EYÜP SALİH DOYURAN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

AYDIN-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Eyüp Salih DOYURAN tarafından hazırlanan "SALMONELLA SEROTİPLERİNDE BİYOFİLM VE VIRULENS İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/01/2018

Üye	: Prof. Dr. Şükrü KIRKAN	ADÜ
Üye	: Prof. Dr. K. Serdar DİKER	AÜ
Üye	: Prof. Dr. Ergün Ö. GÖKSOY	ADÜ
Üye (Tez Danışmanı):	Doç. Dr. Serap SAVAŞAN	ADÜ
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Fulya OCAK	CBÜ



ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, sistemli bir şekilde çalışmayı öğreten ve hayat görüşü ile beni aydınlatan, öneri ve yorumları ile hep destek olan ve doktora öğrenimime başladığımdan beri yanımda olup, yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Serap SAVAŞAN'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine ve çalışanlarına, çok teşekkür ederim.

Çalışmamın çeşitli basamaklarında sabırla beni destekleyen eşime ve aileme teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Tarihçe, Sınıflandırma ve İsimlendirme	3
2.2.Taksonomi	4
2.3.Morfoloji, Kültür ve Biyokimyasal Özellikler	7
2.4.Antijen Yapısı	10
2.4.1..Somatik (O)-Hücre Duvar Antijeni	10
2.4.2.O-Antijen Değişimleri.....	11
2.4.3.Lizojenik Konversiyon	11
2.4.4.Plazmid Konversiyon	11
2.4.5.Hareket (H) Antijenleri	12
2.4.6.Trifazik suşlar.....	12
2.4.7.Vİ Antijeni.....	12
2.4.8.Fimbrial Antijenler	13
2.5.Serotiplendirme	13
2.5.1. <i>Salmonella</i> Antijenleri.....	13
2.5.2.Serotiplendirmede Rutin Algoritma.....	14
2.5.3.Epidemiyolojik Açıdan Önemli <i>Salmonella</i> Serotipleri.....	14
2.5.4.Faj Tiplendirme ve Profajlar	15
2.5.5.Serotiplere Göre Moleküler Tiplendirme Metodları	16
2.6. <i>Salmonella</i> Virulens Faktörleri	17

2.6.1. <i>Salmonella</i> Virulens Plazmidleri.....	19
2.6.2. <i>Salmonella</i> Patojenite Adaları.....	19
2.6.2.1. <i>Salmonella</i> Patojenite Adası-1 (SPA-1).....	20
2.6.2.2. <i>Salmonella</i> Patojenite Adası-2 (SPA-2).....	22
2.6.2.3. <i>Salmonella</i> Patojenite Adası-3 (SPA-3).....	23
2.6.2.4. <i>Salmonella</i> Patojenite Adası-4 (SPA-4).....	24
2.6.2.5. <i>Salmonella</i> Patojenite Adası-5 (SPA-5).....	24
2.6.2.6. <i>Salmonella</i> Patojenite Adası-6 (SPA-6).....	25
2.6.2.7. <i>Salmonella</i> Patojenite Adası-7 (SPA-7).....	25
2.6.2.8. <i>Salmonella</i> Patojenite Adası-8 (SPA-8).....	25
2.6.2.9. <i>Salmonella</i> Patojenite Adası-9 (SPA-9).....	25
2.6.2.10. <i>Salmonella</i> Patojenite Adası-10 (SPA-10).....	26
2.6.2.11. <i>Salmonella</i> Genomik Adası-1 (<i>Salmonella</i> Genomic Island;SGI-1).....	26
2.6.2.12. Yüksek Patojenite Adası (High Pathogenicity Island; HPI).....	26
2.6.3. Tip III Sekresyon Sistemi (TTSS).....	28
2.6.4. Enfeksiyonun Hücre İçi Dönemi.....	28
2.6.5. Barsaktan Yayılım ve Sistemik Enfeksiyon.....	28
2.6.7. Doğal ve Kazanılmış Bağışıklıktan Kaçış.....	29
2.7. <i>Salmonella</i> Biyofilmleri.....	30
2.7.1. Biyofilm İçerisindeki Hayat Döngüsü.....	37
2.7.1.1. Tutunma ve Kolonizasyon.....	37
2.7.1.2. Büyüme ve Gelişme.....	38
2.7.1.3. Hareket.....	39
2.7.1.4. Ayrılma ve Eksternal Kolonizasyon.....	39
2.7.2. Biyofilmlerin Avantajları.....	40
2.7.3. <i>Salmonella</i> 'larda Biyofilm Oluşumu.....	41
2.7.4. <i>Salmonella</i> 'ların Biyofilm Oluşturmasında Etkili Hücresel Elemanları (Yüzey Eklentileri).....	50
2.7.4.1. Flagella.....	50
2.7.4.2. Fimbria.....	50
2.7.5. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Çevresel Faktörler.....	51
2.7.6. Hücreden Hücreye İletişim.....	52
2.8. Patogenez ve Virülans Mekanizmaları.....	53

3.GEREÇ VE YÖNTEM	54
3.1.Metot	54
3.1.2. İdentifikasyon	54
3.1.3. Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak Belirlenmesi	54
3.1.4.Salmonella Serotiplerindeki Biyofilm İle İlgili sdiA, , bapA, agfD, adrA ve invA Gen Varlıklarının PCR İle İncelenmesi.....	54
4. BULGULAR	55
4.1. Bakteri İzolatları	58
4.2. İdentifikasyon Bulguları.....	58
4.3.PCR Bulguları	58
5.TARTIŞMA	58
6.SONUÇ	67
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ	81

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CDC	: Centers for Disease Control and Prevention US
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
WKL	: White-Kaufmann-Le Minor
SPA	: <i>Salmonella</i> Patojenite Adası
TTSS	: Tip III Salgılama Sistemi
SGI	: <i>Salmonella</i> Genomic Island
HPI	: High Pathogenicity Island
EPS	: Eksopolisakkarit
AHL	: N-Asilhomoserin Lakton
QS	: Quorum Sensing
PCR	: Polymerase Chain Reaction

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>Salmonella</i> spp.tanısında biyokimyasal tanımlama testleri şeması	9
Şekil 2. <i>S. enterica</i> 'nın virulens lokuslarının genetik haritası	27
Şekil 3. Biyofilm oluşma basamakları	40
Şekil 4. <i>Salmonella</i> biyofilminin önemli bir parçası olan selülozun biosentezinin aktivatörü <i>adrA</i> 'nın ve onun üzerinden <i>csgD</i> 'nin etkileri.....	46
Şekil 5. <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium'un biyofilm oluşturma regülasyonu.....	49
Şekil 6. <i>Salmonella</i> serotiplerindeki (44 adet) <i>bapA</i> , <i>sdiA</i> , <i>invA</i> , <i>agfD</i> ve <i>adrA</i> gen varlıklarının dağılımları	59
Şekil 7. <i>Salmonella</i> Typhimurium serotipine ait 10 örnekten elde edilen genlerin dağılımı	64
Şekil 8. <i>Salmonella</i> Enteridis serotipine ait 10 örnekten elde edilen genlerin dağılımı	65
Şekil 9. <i>Salmonella</i> Infantis serotipine ait 24 örnekten elde edilen genlerin dağılımı.....	66

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Elektron mikroskopunda <i>S.Typhimurium</i> biyofilm görüntüsü.....	31
Resim 2. Organik yüzeyde <i>Salmonella</i> biyofilmlerinin yakından, büyüteç altında ve stereoelektron mikroskop görünüşleri	33
Resim 3. <i>Salmonella</i> spp.tarafından üretilmiş biyofilmler;yukarıdan aşağıya paslanmaz çelik,cam ve plastik malzemede (A:16°, B:20°, C:28° ve D:35°C’de).....	35
Resim 4. İncelenen suşların <i>bapA</i> geni spesifik PCR sonucu.....	61
Resim 5. İncelenen suşların <i>sdiA</i> geni spesifik PCR sonucu	62
Resim 6. İncelenen suşların <i>invA</i> geni spesifik PCR sonucu.....	62
Resim 7. İncelenen suşların <i>adrA</i> geni spesifik PCR sonucu	63
Resim 8. İncelenen suşların <i>agfD</i> geni spesifik PCR sonucu	63

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. White-Kauffmann-Le Minor şeması 2010 versiyonu	5
Tablo 2. Çalışmada kullanılan oligonükleotid gen dizileri.....	57
Tablo 3. <i>Salmonella</i> serotiplerindeki <i>bapA</i> , <i>sdiA</i> , <i>invA</i> , <i>agfD</i> ve <i>adrA</i> gen varlıklarının yüzde (%) dağılımları	59
Tablo 4. Tüm <i>Salmonella</i> serotiplerindeki (44 örnek) <i>bapA</i> , <i>sdiA</i> , <i>invA</i> , <i>agfD</i> ve <i>adrA</i> genlerinin varlığı.....	59
Tablo 5. <i>Salmonella</i> serotiplerindeki <i>bapA</i> , <i>sdiA</i> , <i>invA</i> , <i>agfD</i> ve <i>adrA</i> genlerinin her bir serotipteki pozitif sayıları ve yüzdeleri	64

ÖZET

SALMONELLA SEROTİPLERİNDE BİYOFİLM VE VİRULENS İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Doyuran ES. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2018.

Araştırmamızda *Salmonella* serotiplerinde biyofilm ve virulens genlerinin ilişkisi incelenmiştir. *Salmonella* serotiplerindeki biyofilm ile ilgili *bapA*, *sdiA*, *invA*, *agfD* ve *adrA* gen varlıkları PCR yöntemi ile incelendi. Araştırma için farklı kaynaklardan izole edilmiş olan 44 adet *Salmonella* izolatının 10'u *Salmonella* Typhimurium, 10'u *Salmonella* Enteritidis ve 24'ü *Salmonella* Infantis'tir. İncelenen 44 serotipin, 38' inde (% 86.36) *bapA* geni, 26 sında (% 59) *sdiA* geni, 44 ünde yani tamamında (% 100) oranında *invA* geni, 39 unda (%88.64) *agfD* geni ve 35 inde (%79.55) oranında *adrA* geni tespit edilmiştir.

İncelenen çeşitli virulens genlerinin özelliklerin saptanmasında fenotipik yöntem ile PCR tekniği uyumluluk göstermesine karşın, bazı özelliklerde PCR tekniği ile saptanan sonuçların fenotipik sonuçlara kıyasla yüksek bulunması moleküler çalışmaların çok sayıda gen ile ilişkili bir özelliğin ayrıntılı olarak incelenmesinde yarar sağladığını ve her iki yöntemin bir arada kullanılmasının daha güvenilir bir sonuç elde etmede önemli olduğunu ortaya koydu.

Bu çalışma ile; *Salmonella*'nın insanlar için patojen olduğu ve dünyada letal etkili bir çok salgına yol açtığı göz önüne alınırsa gıda üretim yerlerinde, hammaddeden son ürüne kadar genel hijyenik kuralların uygulanmasının ve kros kontaminasyonu engelleyici önlemlerin alınmasının gerekliliği ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Salmonella*, Biyofilm, Virulens, PCR

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BIOFILM AND VIRULENCE AFFECT ON *SALMONELLA* SEROTYPES

Doyuran ES. Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Microbiology Programme, PhD Thesis, Aydın, 2018..

In our research, biofilm and virulence genes affect on *Salmonella* serotypes is investigated. Biofilm related existence of *bapA*, *sdiA*, *invA*, *agfD* and *adrA* genes of *Salmonella* serotypes is investigated with PCR method. For research, 44 *Salmonella* isolates taken from different sources and consist of 10 *Salmonella* Typhirium, 10 *Salmonella* Enteritidis and 24 *Salmonella* Infantis. 38 (86.36%) of investigated 44 serotypes contain *bapA* gene, 26 (59%) contain *sdiA* gene, 44 (100%) contain *invA* gene, 39 (88.64%) contain *agfD* gene and 35 (79.55%) contain *adrA* gene.

Despite the consistency of detected virulence genes characteristics through phenotypic method and PCR technique, for some characteristics results were higher with PCR technique than phenotypic method. This states that multigene related characteristic investigations can benefit from molecular researches and using both methods together is essential to produce more reliable results.

With this research, regarding that *Salmonella* is a pathogen for human kind and causes lethal epidemics around the world, the necessity of applying hygienic rules from raw material to final product and taking precautions to avoid cross contamination at food production areas is presented.

Keywords: *Salmonella*, Biofilm, Virulence, PCR

1. GİRİŞ

Salmonellozis, dünyada en sık görülen gıda kaynaklı enfeksiyonlardandır. Bütün toplumları etkilemektedir. *Salmonella* serotipleri gastroenterit, tifo, bakteriyemi, fokal enfeksiyonlar ve ömür boyu taşıyıcılığa kadar geniş bir hastalık spektrumuna yol açabilmektedir. Bu hastalıklar etiyolojik olarak değerlendirildiğinde, birbirinden net olarak ayrılan farklılıklar göstermektedir. Ancak konak patojen ilişkilerinin temel moleküler mekanizmalarının benzerliği, *Salmonella*'ları söz konusu ilişkilerin açıklanmasında model bir mikroorganizma haline getirmektedir. *Salmonella*'da patojeniteyi sağlayan moleküler elemanların genetik ve biyokimyasal esasının tanısı, enfeksiyon hastalıklarının temel biyolojik süreçlerinin açıklanmasına öncülük etmektedir (Dolapçı ve Erdem, 2013).

Salmonella'ların insan dışında vahşi memeliler, kuşlar, haşere, sürüngen ve evcil hayvanlardan oluşan geniş bir konak spektrumu vardır. *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi ve *Salmonella* Sendai gibi bazı *Salmonella* serotipleri insana uyumludur ve bilinen başka konakları yoktur. *Salmonella* Typhimurium gibi bazı serotipler insan ve değişik hayvanlardan oluşan geniş bir konak yelpazesinde yer alırlar. Bir kısmı ise *Salmonella* Dublin büyükbaş hayvanlar, *Salmonella* Arizonae sürüngenler gibi belirli konağa yerleşirler ama bazen insanda da hastalık geliştirebilirler (Akçelik ve Akkoç, 2010).

Salmonella enfeksiyonları epidemik ya da endemik olarak seyredilmekte ve özellikle bağışıklık sistemi zayıf olan yaşlılar ve yenidoğanlar başta olmak üzere immunsupresif bireylerde ciddi hastalıklara yol açabilmektedir. İnsan *Salmonella* enfeksiyonlarında primer kaynak kontamine et ve süt ürünleri gibi hayvan kaynaklı gıda ürünleridir. *Salmonella* tüm dünyada gıdalar aracılığı ile enfeksiyona yol açan en önemli etmendir. Bu vakaların %26' sının etmeni *Salmonella enterica* serovar Typhimurium olarak belirlenmiştir. *Salmonella* 'nın en çok bulunduğu gıda maddelerinin başında hayvansal ürünler gelmektedir. Bunlar arasında kümes hayvanları eti, kıyma, sosis, yumurta ürünleri, su ürünleri, dondurma, süt tozu ve krema en yüksek risk içeren gıdalardır. Ayrıca çeşitli soslar ve salatalar, pudingler ve diğer süt ürünleride *Salmonella* riski taşıyan gıdalar arasında yer almaktadır. Hammadde işleme teknolojisi, depolama ve pazarlama koşulları *Salmonella* riskinin büyümesine neden olmaktadır. *Salmonella*'ların yol açtığı gastroenteritin şiddeti konağın yaşına bağlıdır. Yenidoğanlarda, bebeklerde ve yaşlılarda daha şiddetlidir (Akçelik ve Akkoç, 2010).

Günümüzde ülkeler arası gelişen ticari ilişkiler sonucunda gıda ürünlerinin bütün dünyada yaygın dolaşımı göz önüne alındığında, bu gıda ürünlerinden kaynaklanabilecek *Salmonella* salgınları geniş coğrafi bölgeleri etkileyebilmektedir (Dolapçı ve Erdem, 2013).

Bugün dünyada 2 milyondan fazla olgu oluşturan ve 200.000'den fazla insanın ölmesine sebep olan tifo ve paratifo ile çok daha fazla morbidite hatta bazen mortalite nedeninin *Salmonella* gastroenteritleri olduğu bildirilmektedir. Bunun dışında *Salmonella* cinsindeki bakteriler portörlük, lokal abseler ve enfeksiyonlar, sepsis gibi geniş bir enfeksiyon yelpazesi oluştururlar. *Salmonella* enfeksiyonları, insan sağlığı kadar veteriner hekimliği ve bununla ilgili gıda sanayini de çok fazla ilgilendirir. Hayvansal gıdalardan insanlara bulaşabileceği ve besin ile ilişkili salgınlar yaptığı için de veteriner hekimliğin önemli konularından biridir. Birçok gelişmiş ülkede, insanlardaki gıda kaynaklı salmonelloz olgularının temel nedeni; *Salmonella*'lar ile kontamine kanatlı hayvanlardır. Kanatlı hayvanların *Salmonella*'lar ile kontamine olmasına neden ise çoğu zaman kontamine hayvan yemleridir.

Salmonellozun sıcakkanlı hayvanlarda oluşturduğu sistemik ya da sistemik olmayan enfeksiyonların moleküler düzeyde araştırılmasında *Salmonella* Typhimurium model organizma olarak kullanılmaktadır.

Tifo etkeni *Salmonella* Typhi insan konakçılarda safra taşlarının üzerinde biyofilm oluşturmak suretiyle asemptomatik olarak hayatta kalmaya devam eder. Bu nedenle asemptomatik konakçılarda patojenin yok edilmesi için antibiyotik uygulaması, çoğu kez yetersiz bir uygulama olmaktadır.

Salmonella enfeksiyonlarında bulaşma fekal-oral yolla gerçekleşir. Alt yapının sağlıklı olmadığı, evsel ve çevresel atık sularının, kanalizasyon sularının içme ve kullanma sularına karıştığı yerlerde salgınlar daha yoğun görülmektedir (Gülmez, 2013).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe, Sınıflandırma ve İsimlendirme

Tifo basili, Karl Joseph Eberth tarafından gözlenmiş, Koch bu bulguyu doğrulamış George Gaffky ise kültürünü yapmayı başarmıştır. *Salmonella* ismi, domuz barsağından izolasyonunu yapan Daniel Elmer Salmon'un adına izafeten verilmiştir. Pfeiffer ve Kolle ile Gruber ve Durham ayrı ayrı yaptıkları çalışmalar ile tifo basiliyle immunize edilen deney hayvanının serumu ile aynı bakterinin aglutine olduklarını ortaya koymuşlardır. Georges Widal ve Sicard Paris'te, Grunbaum Londra'da birbirinden bağımsız olarak hasta serumlarını tifo basili ile aglutine ederek serolojik tanıyı ortaya koymuşlardır. Antijenik analiz, Casellani ile başlamış, Smith ve Reagh somatik ve flagellar antijenleri, Weil ve Felix ile Andrex's flagellar antijenlerin difazik oluşunu, Felix ve Pitt ise Vi antijenini tanımlamışlardır (Gedikoğlu, 2013; Töreci, 2013).

White ilk antijenik şemayı oluşturmuş, Kauffmann bu şemayı geliştirmiştir. Kauffmann-White antijenik şeması 1941 yılında 100 serotip içerirken, 1988 yılında sayı 2000'lere ulaşmış ve yeni veriler ile devam etmektedir (Minor ve ark, 1984). Kauffmann-White antijenik şeması Le Minor tarafından geliştirilmiş ve artık "Kauffmann-White-Le Minor antijenik şeması" olarak adlandırılmaktadır. Serovar sayısı 2010 yılında 2610'a çıkmıştır (Töreci, 2013).

Salmonella'ların sınıflandırılmasında ve nomenklaturünde bugüne kadar pek çok değişim olmuştur. Taksonomi dinamik bir bilim dalıdır ve bilgi arttıkça taksonomide değişiklikler olmakta, yeni bilgiler edinilince, yeni yöntemler uygulandıkça sınıflamada, nomenklaturde, identifikasyon kriterlerinde değişimler olmakta, yeni ve farklı mikroorganizmalar izole edilmekte, yeni türler ve cinsler tanımlanmaktadır. *Salmonella* cinsi, sınıflandırması ve nomenklaturü belki en çok değişen, en karışık olan bakteri cinslerinden biridir. *Salmonella* cinsi, Enterobacteraceae ailesinde yer alır (Töreci, 2013).

2.2. Taksonomi

Alem (Kingdom): *Bacteria*

Şube (Division): *Proteobacteria*

Sınıf (Class): *Gamma Proteobacteria*

Takım (Order): *Enterobacteriales*

Familya (Family): *Enterobacteriaceae*

Cins (Genus): *Salmonella*

Tür (Species): *S.bongori*

S.enterica

Taksonomik olarak 1983 yılına kadar çok sayıda tür içerdiği kabul edilmekte iken, son yıllarda yapılan genetik çalışmalar, suşlar arasında yüksek oranda DNA benzerliğini ortaya koymuştur. *Salmonella* 'lar, *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki türe ayrılmıştır. *Salmonella enterica* 'nın I, II, IIIa, IIIb, IV ve VI olarak altı alt türü (subspecies) bulunmaktadır. Daha önce subspecies V olarak gruplananlar ise *Salmonella bongori* olarak sınıflandırılmıştır. İnsanda patojen olan *Salmonella* 'ların büyük çoğunluğu *Salmonella enterica* subsp. Enterica (subspecies I) içinde; diğerleri ise önceleri Arizonae olarak isimlendirilen subspecies IIIa ve IIIb 'de yer almaktadır. Sınıflandırmada bazı türler bazı özellik farklılıkları ile alt türlere (subspecies, subsp.), alt türlerde antijenik farklılıklarına göre serotip veya "serovar", belirli fajlara duyarlılığına göre bakteriyofaj tipi veya "fagovar", bazı biyokimyasal özelliklerine göre biyotip veya "biyovar" gibi alt taksonlara ayrılabilir. *Salmonella* 'ların 7 alt türü, somatik O ve flagellar H antijenlerine göre serotip-serovara ayrılmaktadır (Minor ve ark, 1984; Patrick ve ark, 2007; Töreci, 2013).

Salmonella serovarlarının isimlendirilmesi özeldir. Diğer bakterilerde serovarlar antijenik formülleri ile belirtilmekte iken *Salmonella* 'lar; oluşturdukları hastalık, etkili oldukları konak veya ilk izole edildikleri yere izafeten verilmiş olan özel isimler ile anılır ve tür ismi gibi italik harfler ile değil düz yazılır (Gedikoğlu, 2013). *Salmonella enterica* subsp. Enterica (subspecies I) 'daki serovarlar özel adları ile diğer alt türlerdeki serovarlar alt tür sayısını gösteren Romen rakamları ve antijen formülü ile yazılır (Guibourdenche ve ark, 2010).

Salmonella enterica subsp. Enterica suşları antijenik olarak birbirinden farklı 2600'ü aşan sayıda serovarlara (serotiplere) ayrılır:

Tablo 1. White-Kauffmann-Le Minor Şeması 2010 Versiyonu (Guibourdenche ve ark. 2010)

					Serovar Sayısı	Oranı	
Salmonella enterica subsp. Enterica					(I)	1547	% 59,3
“	“	“	Salamae	II)	513	% 19,7	
“	“	“	Arizonae	(IIIa)	100	% 3,8	
“	“	“	Diarizonae	(IIIb)	341	% 13,1	
“	“	“	Houtenae	(IV)	73	% 2,8	
“	“	“	İndica	(VI)	13	% 0,5	
Salmonella bongori					(V)	23	% 0.9
					2610		

Bu serovarlardan sadece ikisi dünyada ilk defa Türkiye’den izole edilmiştir. Bunlar S.İstanbul ve S.Adana’dır (Öngen ve ark, 2013). Dünyada ve Türkiye’de *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium en sık izole edilen serotiptir.

Salmonella esasen insan ve hayvanların bağırsaklarında bulunan bir patojendir. Bazı *Salmonella*’lar konağa adapte olmuş ya da konağa spesifiktir. Bunun en önemli örneği *Salmonella enterica* serovar Typhi’dır. Konağa spesifik diğer serovarlar: Paratyphi, Sendai (insan), Pullorum/Gallinarum (kanatlılar), Dublin (sığırlar), Choleraesuis (domuzlar, ancak insanlarda enfekte eder); Typhimurium ve Enteritidis (insan, sığır, kanatlılar, koyun, domuz, at ve yabani kemirgenlerde ana hastalık etmenleridir) sayılabilir (Akçelik ve Akkoç,2010).

Bakteri genetiği konusundaki ilerlemelerle bakterilerin sınıflandırılması 1970’lerde değişmiştir. Bir bakterinin ne olduğunu, bütün canlılardaki gibi, taşıdığı genetik şifre belirler ve genetik şifreyi de çift ipçikli DNA molekülünün boyutu, guanin-sitozin(GC) çifti ile adenin-timin(AT) çiftinin oranı ve gen olarak fonksiyon gören DNA iplikçisindeki nükleotidlerin sıralanması belirler. *Salmonella*’larda DNA molekülünde 4,8-4,9 milyon kadar baz çifti vardır ve 4400-5600 kadar gen olarak kabul edilebilecek kodlayabilen nükleotid dizisi içerir. DNA-DNA hibridizasyon deneyleri *Salmonella*’ların sınıflandırılmasında çok kullanılan ve güvenilir deneylerdir (Gedikoğlu, 2013; Jacobsen ve ark, 2011).

Salmonellozun sıcakkanlı hayvanlarda oluşturduğu sistemik ya da sistemik olmayan enfeksiyonların moleküler düzeyde araştırılmasında *Salmonella* Typhimurium model organizma olarak kullanılmaktadır (Akçelik ve Akkoç,2010).

Salmonella enterica subsp. Enterica (subspecies I) insanda ve sıcakkanlı hayvanlarda enfeksiyon oluşturan serovarların büyük çoğunluğunu ve A, B, C1, C2, D ve E somatik antijen

gruplarındaki suşların çoğunu içerir. Bu alt türdeki serovar sayısı bilinen serovarların % 59,3'ü olduğu halde yapılan izolasyonların % 99,5'i insan izolatlarının da % 99'dan fazlası bu alt türdendir (Brenner ve ark, 2000). *Salmonella enterica* subsp. Enterica (subspecies I) dışındaki alt türler ve *Salmonella bongori* daha çok soğukkanlı hayvanlardan ve çevreden izole edilir.

Bir ülkede izole edilmiş serovarların ve kaynaklarının bilinmesi o ülkede daha sonra izole edilecek *Salmonella*'ların tanımlanmasında önem taşımakta ve yardımcı olmaktadır. Bir bakterinin *Salmonella* olduğunun morfolojik ve biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesinden sonra serovarının belirlenmesi, *Salmonella* antijenlerine karşı hazırlanmış faktör serumları ile yapılan lam aglütinasyon deneyleri ile sağlanır.

Salmonella enterica izolatları klasik olarak serotiplendirme, biyokimyasal özellikler ve faj tiplendirmesi gibi fenotipik yöntemlerle tanımlanmakta ve tiplendirilmektedir. Serotiplendirme, özgül antiserumlar kullanılarak bakterinin yüzey lipopolisakkaritleri (O antijeni), flagella proteinleri (H antijenleri) ve kapsüler protein (Vi antijeni) yapılarının ortaya konulmasına dayalı bir yöntemdir. Mikroorganizmanın hücresel metabolik enzimlerinin analizi ile ortaya konulan biyokimyasal profili, antimikrobiyal duyarlılık /dirençlilik özellikleri ve faj tiplendirme de *Salmonella* izolatlarının fenotipik tiplendirmesinde kullanılan diğer yöntemlerdir (Dolapçı ve Erdem, 2013).

Epidemiyolojik araştırmalarda salmonelloz salgınlarının tanımlanması izlerinin takip edilmesi için, serotiplendirme ve diğer fenotipik yöntemlerden ziyade daha spesifik düzeyde taksonomik bilgi veren ve kaynak suşun parmak izini ortaya koyabilecek yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Parmak izi çıkarma amacıyla, pulsed field jel elektroforezi (PFGE) yöntemi 1990'larda *Salmonella*'lara uyarlanmış ve salgın kaynağı olan suşları tanımlamadaki kapasitesi gösterilerek, kısa sürede sık kullanılır hale gelmiştir. PFGE, günümüzde *Salmonella* moleküler tiplendirmesinde "altın standart" olarak kabul edilmektedir (Wattiau ve ark, 2011; Winokur, 2003)

Surveyans çalışmaları son yıllarda, klasik yöntemlere ek olarak, çoğunluğu DNA temeline dayanan alternatif yöntemlerin geliştirilmesi ile daha kolaylaşmıştır.

Sınıflandırmada Yeni Yaklaşımlar (Dolapçı ve Erdem, 2013);

1.DNA microarray temelli testler

2.PCR temelli testler

LPS ve flagellar yapısal genlere dayanan moleküler serotiplendirme

Genomik belirteçlere dayalı moleküler serotiplendirme (Premi test)

3.DNA dizi analizi temelli testler

4.Hızlı fenotipik parmak izi teknolojileri

PyMS "Piroliz kütle spektrometresi"

MALDI-TOF MS

FT-IR "Fourier transform infrared spektroskopisi"

Raman spektroskopisi

Diğer fenotipik yöntemler

2.3. Morfoloji, Kültür ve Biyokimyasal Özellikler

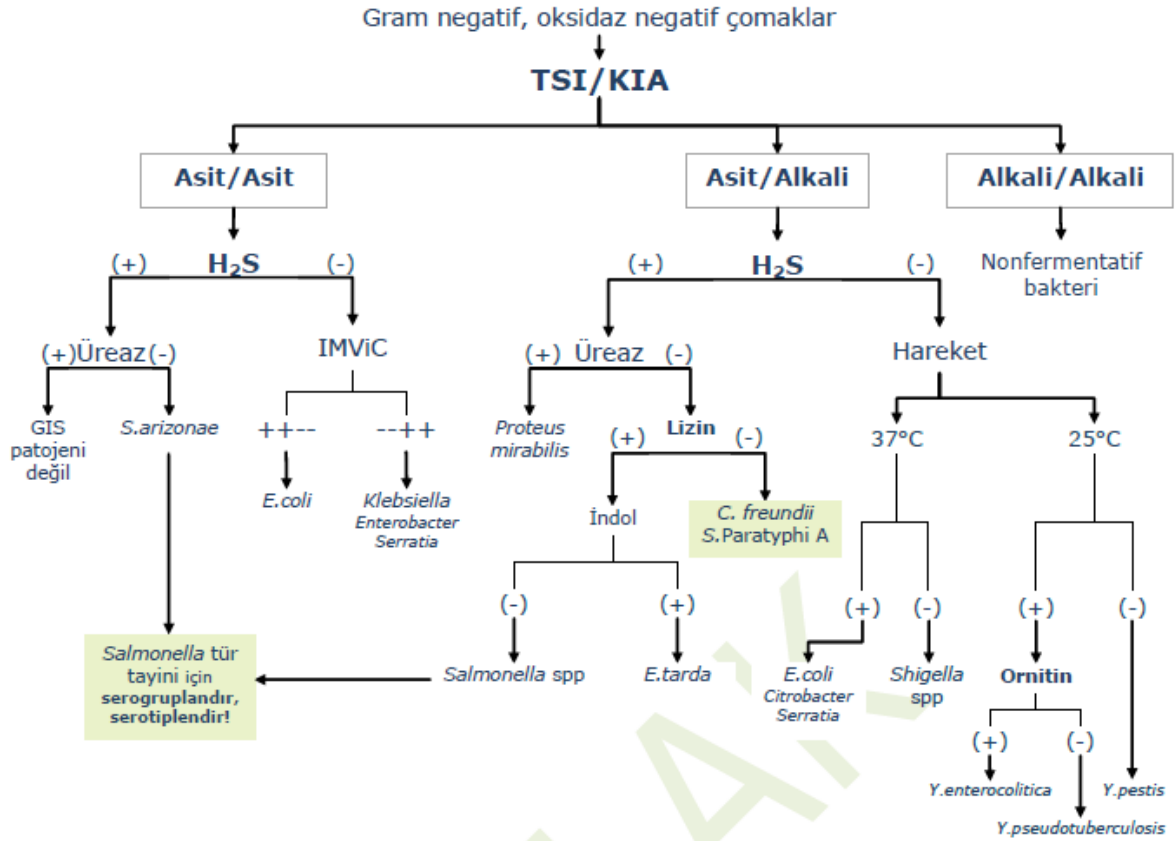
Salmonella, diğer Enterobacteriaceae üyeleri gibi fakültatif anaerobik, spor oluşturmeyen, kapsülsüz, 2-3 µm uzunluğunda ve 0,4-0,6 µm eninde çubuk şeklinde bir hücre morfolojili gram negatif basildir. Boyalı preparatlarda çoğunlukla tek tek görülürler. *Salmonella* Gallinarum (biotip Pullorum dâhil) serovarı dışında hareketlidir ve peritrik flagellaya sahiptir. Klinik izolatlarda, diğer serovarlara ait hareketsiz suşlarda bulunmuştur. Suşlarda flagellar antijenler difazik varyasyon gösterebilmektedirler. Doğal ortamda biyofilm oluşturabilmekte ve 'rdar' fenotipi olarak adlandırılan çok hücreli bir fenotipe de rastlanmaktadır. 'Rdar' fenotipi *Salmonella* 'ya kurumaya ve sodyum hipoklorüre karşı direnç kazandırmaktadır. Laboratuar besiyerlerinde kolaylıkla üreyebilen *Salmonella* etkenleri; 37°C' de 24-48 saatte küçük yuvarlak S tipi koloniler oluştururlar. Biyokimyasal aktiviteleri oldukça yüksektir. Genellikle laktozu fermente etme yetenekleri yoktur; nitrat, H₂S, sitrat ve lizin dekarboksilaz reaksiyonları pozitifdir. *Salmonella* suşları için ortak olan biyokimyasal özelliklerin en belirleyici olanlarını bile taşımayan atipik suşların varlığı nedeniyle tanımlama için biyokimyasal ve serolojik yöntemler birlikte kullanılmaktadırlar (Gülmez, 2013).

Salmonella suşları düzgün (smooth-S) koloni oluşturmakla birlikte, mukoid (M) koloni gelişimi de görülebilmektedir. M koloni gelişme olasılığı, S.Paratyphi B gibi bazı serovarlarda, düşük sıcaklık, düşük nem ve yüksek ozmolarite varlığında daha yoğun görülmektedir. Saf kültürlerde S ve M koloni morfolojilerini birlikte gösteren *Salmonella* suşları da tespit edilmiştir (Gülmez, 2013).

Bir çok *Salmonella* suşu fimbria sentezlemektedir. Daha çok tip 1 fimbria, tip 2 fimbria ve tip 3 fimbria yapımına rastlanmaktadır. *Salmonella* genomunda 35 farklı fimbrial gen kümesi saptanmıştır. Fimbrial gen bölgelerinin kaybı/kazanılması ve allel varyasyonları ile seyreden evrimsel süreçler çeşitliliğin devamını sağlamaktadır (Yue,2012). İnce agragatif fimbrianın yapımını düzenleyen genler, ekstrasellüler yapının düzenlenmesinde de rol

oynamaktadır. O antijeninden oluşan ve çevresel faktörlere, özellikle kurumaya direnç sağlayan bir kapsülde oluşturabilmektedir. Bu kapsülün yapımının fimbriya ve selülozla ilişkili ekstrasellüler matriks ile birlikte düzenlendiği gösterilmiştir (Gibson, 2006).

Salmonella dayanıklı bir patojendir. Değişen çevre koşullarında hayatta kalabilmekte, 7-48°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında, pH 4-8 arasında üreyebilmektedir. Gelişme için optimum sıcaklıkları 37°C'dir. *Salmonella* 'lar düşük pH, düşük su aktivitesi ya da yüksek yağ içeriğine sahip gıdalarda sıcaklığa dirençlidir. Gıdaların dondurularak depolanmasında, özellikle donma sıcaklığı civarında canlılık düşer (Akçelik ve Akkoç, 2010). *Salmonella* 'lar % 8 tuz konsantrasyonunda canlılığını sürdürebilir, fakat suların dezenfeksiyonunda kullanılan yoğunluktaki kloro dayanamaz ölürler. *Salmonella* 'lar toprakta, suda, sütte, peynirde, tereyağında, sığır dışkısında, dondurmada günlerce ve haftalarca canlılığını koruyabilen bakterilerdir. Glukoz, maltoz, mannitol ve genellikle sorbitolden asit ve çoğunlukla gaz oluşturmaktadır. Laktoz negatiftirler. Genellikle sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanabilmekte, üç şekerli demirli besiyerinde, TSI agarda H₂S yapabilmekte, lizin ve ornitini dekarboksile edebilmektedir. Sukroz ve adenitol fermentasyonu ve indol oluşumu nadiren gözlenmektedir. Metil red testi pozitif, Voges-Proskauer negatiftir. Üre hidrolizi ve fenilalanin deaminasyonu görülmemektedir. Biyokimyasal özelliklerin plazmide bağlı olması atipik biyokimyasal özelliklere sahip suşların ortaya çıkmasını kolaylaştırmakta, doğru tanımlamayı zorlaştırmaktadır (Gülmez, 2013). Çoğu *Salmonella* prototroftir yani üremesi için gerekli organik bileşikleri sentezleyebilmekte ve uygun bir karbon kaynağı varlığında minimum tuz besiyerinde çoğalabilmektedir. Dışkı gibi mikrobiyal yükün yüksek olduğu örneklerde seçici ve ayırt ettirici besiyerleri kullanılmalı, besin örneklerinde ise büyük hacimli örneklerde düşük yoğunlukta bulunan *Salmonella* 'ların üretilmesi için zenginleştirme uygulamaları gerekmektedir (Gülmez, 2013).



Şekil.1. *Salmonella* spp. tanısında biyokimyasal tanımlama testleri şeması

(Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Klinik Bakterioloji Tanı Standartları Çalışma Grubu, 2015)

Salmonella izolasyonunda kullanılan besiyerlerinin bileşimi, önemli iki özelliklerini ortaya çıkarma esasına dayanmaktadır. Bu özellikler, H₂S oluşturmaları (*S. Paratyphi* hariç) ve laktozu fermente edememeleri olup, *E. coli*'den ayırımlarında kullanılan en önemli testlerdir.

Salmonella, dışkı örnekleri dışındaki klinik örneklerde, rutin kültür için kullanılan besiyerlerinde rahatlıkla üretilebilmektedir. Dışkıda *Salmonella* ve *Shigella* türlerinin saptanabilmesi için MacConkey agar, *Salmonella*-*Shigella* (SS) agar, Hektoen enterik agar, ksiloz lizin deoksikolat agar gibi seçici ve ayırt ettirici besiyerlerinin yanı sıra, gram negatif GN buyyon ve selenit F besiyeri gibi zenginleştirici sıvı besiyerleride kullanılmaktadırlar. Bu besiyerleri, gram pozitif bakterilerin üremesini baskılayan safra tuzları, deoksikolat veya selenit F içermektedirler. Zenginleştirici besiyerleri, kültürde izolasyon oranlarını yükseltmektedir (York, 2004).

Salmonella türlerinin üretilmesi için EMB agar, SS agar, Selenit F buyyon, XLD agar, HE agar, DCA agara ekilmesi, kolonilerin laktoz kullanımı ve H₂S üretimi başta olmak üzere biyokimyasal özelliklerine göre identifikasyondan sonra Kaufman-White-Le Minor şemasına

göre serotiplendirilmeleri yapılır. Moleküler tiplendirme için genellikle PFGE yöntemi kullanılmaktadır. Serolojik tanı içinse Gruber-Widal testi uygulanmaktadır (Ağca, 2013).

2.4. Antijen Yapısı

Diğer enterik bakteriler gibi *Salmonella*'larda somatik, yüzey ve flagella olmak üzere üç tip antijen içerir.

1.Somatik (O) antijenleri: Hücre duvarı lipopolisakkarit tabakasından oluşan ısıya dirençli polisakkarit yapılarıdır.

2.Hareket (H) antijenleri: Flagellaya ait ısıya duyarlı proteinlerdir. *Salmonella* cinsine özgü olarak difazik varyasyon gösterirler.

3.Vi antijeni: *Salmonella* Typhi ve az sayıda *Salmonella* serovarında bulunur. Hücre yüzeyinde bulunur, polisakkarit yapıdadır.

Salmonella'lar antijenik çeşitlilikleri nedeni ile özel olarak sınıflandırılmaktadır. Antijenik formül; somatik O antijenleri, faz-1 ve faz -2 H antijenleri olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Kısımlar 3 sütun halinde sıralanır ve “iki nokta üst üste “ (:) ile faktörler ise “virgül” (,) ile birbirinden ayrılırlar. Somatik-O antijenleri rakamlar ile ifade edilir. Faj ile ilişkili somatik faktörlerin altı çizilir, yani bu faktörler ancak faj aracılı olarak bulunurlar. Faz-1 H antijenleri a-z kadar küçük harfler ile belirlenir. Z harfiden sonra z₁-z₈₃ olarak devam eder. Faz-2 H antijenleri 1-12 kadar rakamlar ile numaralanır. Bazı H antijenleri faz spesifiktir (Gedikoğlu, 2013a).

2.4.1. Somatik (O)-Hücre Duvar Antijeni

Somatik (O)-hücre duvar antijeni “Ohne-hauch-yayılmayan” anlamında (O) harfi ile gösterilir. Bütün *Salmonella* serotiplerinde bulunan bu antijenik yapı, hücre duvarında protein ve lipidlere bağlı olarak yer alır. O antijeni, hücre duvarında yer alan lipopolisakkarit tabakası ile ilişkilidir. Isıya dayanıklıdır. Lipopolisakkarit, gram negatif bakterilerin dış membranının önemli bir bileşenidir. Lipit A, core oligosakkariti ve O spesifik polisakkarit (O antijeni) olmak üzere 3 ayrı bölgeden oluşur. Core polisakkaritleri, Enterobacteriaceae için ortak yapıya sahiptir. O antijen özgülüğünü core kısmına bağlanan şeker yan dalları verir (Gedikoğlu, 2013a).

O-antijen biyosentezi nükleotid şeker sentezi ile başlar ve şekerlerin eklenmesi ile devam eder. Bu işlem için gerekli olan enzimler O-antijen gen bölgesinde yer alır. Antijenlerin gen bölgesinde değişimler her zaman söz konusu olabilmektedir. Transpozonların bu değişimde önemli rolü vardır.

O-antijen özgüllüğünü sağlayan polisakkarid zincirlerin tekrarlayan dalları, tek bir şeker molekülünün değişikliği ile grup değişmesine neden olabilir (Gedikoğlu, 2013a).

2.4.2. O-Antijen Değişimleri

S-R değişimi: *Salmonella* 'lar S formda koloni oluşturur. Bazı şartlarda S-R değişimi olabilir. R mutant suşlar; Ra-Re olarak sınıflandırılır. Ra mutantlar O spesifik yan dalları içermez, Rb'den Re'ye kadar olan suşlar ise progresif olarak core bölgesinden şeker kaybeder. R formlar doğal ortamda seyrek yer alır. Genellikle laboratuvar şartlarında ve çok pasaj yapılan suşlarda gözlenir (Gedikoğlu, 2013a).

2.4.3. Lizojenik Konversiyon

O-antijeninin özgül yapısı, faj aracılığı ile oluşan lizojenik konversiyon ile farklılaşabilir. Polisakkaritlerin tekrarlayan birimlerinin kimyasal yapısında minik farklar gelişir ve değişiklikler genetik olarak ortaya konabilir. Bakteri faj ile enfekte olduktan sonra dakikalar içinde yeni özellik kazanabilir. Faj konversiyonu ile ilişkili faktörlerin altı çizilerek işaretlenir. Bazı gruplarda bir faktörün varlığı ya da kaybı önemli bir değişik oluşturmaz.

2.4.4. Plazmid Konversiyon

O-antijen özgüllüğü plazmid aracılığı ile de değişime uğrayabilir. Bir faktör plazmid aracılı olarak kazanılıp, kaybedilebilir.

2.4.5. Hareket (H) Antijenleri

Hareketli *Salmonella*'larda bulunan, flagellaya ait, ısıya duyarlı proteinlerdir. Hauch – yayılan anlamında (H) harfi ile gösterilir. Flagella; protein yapısında ve güçlü antijenik özellik gösteren flagellin adı verilen filamentlerden oluşur. *Salmonella* serovarlarının çoğunluğu difaziktir. Yani antijenik yapıları farklı olan iki farklı antijen içerirler. Az sayıda *Salmonella* ise monofaziktir yani flagella fazlarından birine sahiptir. Üreme sırasında majör flagella antijeninin periyodik olarak değişimi söz konusudur. Bu protein antijenlerinin değişkenliği bir tek amino asit ile bile olabilir (Herrera-Leo'n, 2004).

WKL şemasında yer alan 69 flagellar antijenin birbirleri ile antijenik benzerliği yoktur veya çok azdır.

Bazı serovarlarda flagellin proteinin polimerizasyonu ve sekresyonu ile ilgili gen bölgesinin yüksek oranda görülmüş olduğu gösterilmiştir. Genin santral kısmı hareket ile ilişkilidir. Uzunluk ve sekans yönünden yüksek oranda değişkendir. Ancak hareket üzerine olumsuz etkisi yoktur. Benzer serovarlarda, horizontal gen transferi ile flagellaları farklı olabilmektedir (Gedikoğlu, 2013a).

H antijenlerinin yapımı; faz-1 (fljC) ve faz-2 (fljB) gibi iki bağımsız kromozomal gen bölgesi tarafından kontrol edilmektedir. Üçüncü bir gen bölgesi olarak; fljA bulunur. fljB gen bölgesinin repressörü olarak bulunur ve faz değişiminin regülasyonunda yer alır (Gedikoğlu, 2013b).

2.4.6. Trifazik suşlar

Doğadan izole edilen bazı nadir suşlarda 3 veya daha fazla sayıda antijenik olarak farklı flagella bulunabilir.

2.4.7. Vi Antijeni

Bakterinin hücre duvarının dışında bulunan antijenik yapılardır. Vi kapsül polisakkariti; yapısal (viaB) ve fonksiyonel (viaA) gen bölgeleri kromozom üzerinde farklı gen bölgelerinde yer alır. Vi antijeni, *S.Typhi*, *Paratyphi C* ve *Dublin*'de bulunur. Bu serotipler genetik olarak yakın değildir. *S.Typhi* ve *Paratyphi C* suşlarının % 99'u via genine

sahiptir. Vi genlerine sahip suşlar, laboratuvar şartlarında, miktarına ve bulunduğu serovara göre farklı koloni yapısı oluştururlar. Sürekli pasajlar ile Vi⁺suşlar, Vi yapım özelliğini kaybedebilir (Gibson, 2006).

2.4.8. Fimbrial Antijenler

Salmonella serotiplerinin hepsi tip-1 fimbria içerir. Tifo olgularının çoğunda ve aşılamlar ile tip-1 fimbria antikorları oluşur. Bu antikorlar Gruber-Widal testinde yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir. Fimbriaların tanısal bir değeri yoktur, ancak serolojik tanıda sorun yaratabilmeleri nedeni ile önemlidir (Gedikoğlu, 2013a).

2.5. Serotiplendirme

Salmonella serotiplerinin kesin identifikasyonları antijenik formlere göre yapılmaktadır. Ancak aynı antijenik yapı gösteren farklı *Salmonella*'lar da mevcuttur. Bunlar birbirinden ancak biyokimyasal özellikleri ile ayrılırlar ve biovar olarak kabul edilmektedirler. Örneğin *S.Gallinarum* ve *S.Pullorum* aynı antijenik formüle sahip olup ancak *S.Pullorum*'un ornitin dekarboksilaz pozitif olmasıyla ayrımları yapılmakta ve bu iki etken biovar olarak kabul edilmektedir. Bazı suşlar *Salmonella*'ların ortak biyokimyasal özelliklerini taşımadığından, biyokimyasal testler tek başına değerlendirme için kullanılmazlar. Biyokimyasal testlerin ayırt edici özelliğinin zayıf olması nedeni ile *Salmonella*'larda serotiplendirme daha ön plandadır.

2.5.1. *Salmonella* Antijenleri

O antijenleri; O grup antijenleri ve yardımcı O antijenleri olmak üzere ikiye ayrılır. O grup antijenleri, rfb gen bölgesi tarafından kodlanan, bütün Enterobacteriaceae ailesinde bulunan ve serotiplendirmenin esas belirleyicisi olan antijenlerken, yardımcı O antijenleri ise bakteriyofaj ya da plazmidler gibi ekstrakromozomal elemanlarca kodlanan, belirli serotiplerde bulunan ve serotiplendirme açısından çok da önemli olmayan antijenlerdir (Threlfall, 2005).

H antijenleri; difazik varyasyon gösterir; Faz-1 ve Faz-2. Faz-1 antijenleri diğer enterik bakteriler ile homoloji gösterirken, Faz-2 antijenini kodlayan gen, *Salmonella*-spesifik genom üzerinde yer alır. Bu iki genin ekspresyonu daima bir düzen içinde gerçekleşir. Her ikisi birden eksprese olmaz (Threlfall, 2005).

Vi antijenleri; homolog O antiserumu ile aglütinasyonu engelleyen yüzey polisakkaritidir. Vi antijeni varlığında O antiserumları ile aglütinasyonun, bakteri süspansiyonu 100°C de 60 dakika kaynatıldıktan sonra yapılması gerekir. Aksi takdirde aglütinasyon maskelenecektir (Threlfall, 2005).

Perçin (2013)' e göre 67 O antijeni tanımlanmasına rağmen, bazıları minör antijenler grubuna alındığından, bazıları ise bilinen majör antijenin faj konversiyonu ile oluşan kimyasal modifikasyonu olduğu belirlendiğinden, bugün 46 O serogrubu kullanılmaktadır.

İnsan *Salmonella* enfeksiyonlarında etken *Salmonella enterica* subsp. Enterica alt türüne aittir. Bu alt türdeki serotiplerin % 96,5'i ise 6 O serogrubuna aittir. Bu O serogruplarının ilgili H antijenlerinin kullanılmasıyla insanlarda enfeksiyon yapan *Salmonella* serotiplerinin tamamına yakını tanımlanabilir (Perçin, 2013).

2.5.2. Serotiplendirmede Rutin Algoritim

Serotiplere göre invazyon, kinolonlara direnç ve dolayısıyla prognoz değişmektedir. Dışkı kültürü yapılan rutin laboratuvarlarda temel biyokimyasal reaksiyonlara göre *Salmonella* şüpheli bir suş izole edildiğinde O, Vi, Faz-1 H ve Faz-2 H antiserumları kullanılarak aglütinasyon araştırılmalı, gerektiğinde Sven Gard besiyeri ile faz inversiyonu sağlanarak serotiplendirme yapılmalıdır.

Bir *Salmonella* etkeni antijenik formülüne göre tanımlanırken; öncelikle somatik antijene ait faktörler, varsa yüzey antijeni, hareketli ve difazik ise Faz-1 ve Faz-2 antijenik faktörleri sıra ile yazılır.

2.5.3. Epidemiyolojik Açıdan Önemli *Salmonella* Serotipleri

***Salmonella Enteritidis*,** yumurta kaynaklı salgınların en büyük sebebidir. Hayvan kaynaklı pek çok yiyecek salmonelloz salgınlarına yol açabilmektedir. *Salmonella Enteritidis*'in tavuk yumurtasını asemptomatik olarak enfekte etme ve tavuk çiftliklerinde

uzun süre canlı kalabilme özelliği ve pişmemiş yumurta ile kontamine gıdalar sayesinde bu serotipe ait salgınlar bildirilmiştir.

Salmonella Typhimurium, hem insanlarda hem de evcil ve vahşi hayvanlarda en sık izole edilen ilk üç *Salmonella* serotipinden biridir.

Salmonella Virchow, tifo dışı salmonellozlar içinde kan dolaşımına en yüksek oranda invazyon gösteren serotiptir.

Salmonella Typhi, insana adapte serotiplerdendir. Ancak giderek artan çoklu ilaç direnci giderek büyüyen bir problemdir.

Salmonella Paratyphi A

Salmonella Paratyphi B

Salmonella Hadar

Salmonella Heidelberg

Salmonella Gallinarum, kanatlılarda enfeksiyon yapan hareketsiz bir serotiptir ve kuşlarda yüksek mortalite ile seyrederek (Perçin, 2013).

Salmonella Infantis

2.5.4. Faj Tiplendirme ve Profajlar

Serotiplendirme ve faj tiplendirme yöntemleri, genotiplendirme yöntemleri ile karşılaştırıldığında az sayıda techizata ihtiyaç gösteren, basit teknolojilere sahip ucuz ve zahmetli olmayan yöntemlerdir. Faj tiplendirme sistemlerinin uygulanabilirliği, fajlardan korunmada rol oynayan konak kontrollü modifikasyon ve restriksiyon sistemleri, lipopolisakkaritlere ve dış membranlara adsorbsiyon, süperenfeksiyonları engelleyen sistemler ve konağın immun sistemine etki yeteneği gibi durumlarla etkilenen faj konak özgüllüğüne bağlıdır. Faj tiplendirme fenotipik bir yöntemdir. Günümüzde *Salmonella* serovarları için bir çok faj tiplendirme şemaları kullanılmaktadır (Tekeli, 2013).

Bakteriyel genom çeşitliliğini sağlayan en önemli özellikler; gerçekleşen internal modifikasyonlar ve horizontal gen transferi mekanizmalarıdır. Bakteriyofajlar bakteri yaşamına etki ederler. Bu etkiler, lizojenik konversiyon, genomik düzenlemeler, gen bozulması, litik enfeksiyondan korunma, rekabet edilen suşların lizisi ve lizojenik konversiyon, transdüksiyon gibi yeni uyum faktörlerinin sağlanmasıdır. Lizojenik konversiyon, bakterinin temperate faj ile enfeksiyon sonrası fenotipini değiştirmesidir. Profaj ve profaj kalıntıları bakteriyel genomda sık görülürler. Dizilim analizleri yapılmış bakteri

genomlarının yaklaşık %60'ı profaj elemanları taşımaktadır. Profajlar aynı zamanda yeni genlerin bakteri DNA'sına eklenmesi nedeniyle, aynı tür içinde birçok farklılığa sebep olan elemanlardır. Profajlar bulundukları bakteri hücresinin patojenitesine önemli katkılarda bulunurlar. Profaj ve kalıntıları *Salmonella*'larda çeşitli virulens genlerini taşımaktadır. Profaj kaynaklı virulens genleri ile ilgili çalışmalar çoğunlukla *Salmonella* Typhimurium, Typhi, Paratyphi ve Enteritidis üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak diğer serovarlarda da bu tip genler bulunmaktadır. Bazı fajlar, faj fonksiyonları için gerekli olan nükleik asit dışında farklı bakterilerden replikasyon sırasında alınmış DNA parçaları da taşımaktadırlar. Alınan bu DNA parçaları faja bir katkıda bulunmayıp, konak hücreye (bakteriye) katkı sağlıyorsa bu genlere “moron”adı verilmektedir. Moronların patojen bakterilerin evriminin temeli olduğu düşünülmektedir. Moron ile kodlanmış birtakım özellikler konağın (bakterinin) uyumunu artırır, bu durum profaj yayılımını kolaylaştırır. Faj ile kodlanmış ekstra fonksiyonlar konak bakterinin bulunduğu ortama veya yeni bir ortama uyumunu artırır. Bu değişiklikler, moronları ve bulundukları faji, bakteri için zorunlu hale getirir ve profajı sabitleştirir. Genel olarak moronlar faj genomuna ekler halinde görülmektedirler. Guanin-sitozin içerikleri, çevre genlerden farklıdır ki bu horizontal transferin göstergesidir. Moronlarda, replase profajlardan ekspresyonlarına aracılık eden promotor ve terminatör elemanlar vardır (Tekeli, 2013).

2.5.5. Serotiplere Göre Moleküler Tiplendirme Metodları

Günümüzde geleneksel White-Kaufmann-Le Minor şemasına göre yapılan *Salmonella* serotiplendirmesi bütün dünyada *Salmonella* sınıflandırılmasında “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte moleküler yöntemler suşların tanımlanmasında ve belirli suşların genetik ilişkilerinin ortaya konulmasında evrensel olarak kullanılmaktadır (Malorny, 2011).

Salmonella suşlarının metabolik aktivitelerinin ortaya konulması temeline dayalı biyokimyasal özellikleri, serotiplendirme, faj tiplendirmesi, antimikrobiyal duyarlılık testleri ve multilokus enzim elektroforezi gibi yöntemle ile birlikte değerlendirilerek fenotipik olarak yapılan identifikasyon ve sınıflandırması bütün dünyada yıllardır başarıyla kullanılmaktadır. Fenotipik tiplendirme teknikleri, bakterinin farklı suşlarında bulunan belirli genlerin ürünlerinin ekspresyonlarının saptanması temeline dayanmaktadır. Bakteri tiplendirmesi için genomun nükleotid sekansındaki farklılıkları tanımlamaya dayanan ve gen ekspresyonundan büyük oranda bağımsız olan genotipik yöntemlerle bu açıdan tamamen zıttırlar. Tek başlarına

fenotipik yöntemler, sıklıkla birbirleriyle yakın ilişkili *Salmonella* izolatlarının ortaya konulmasında yeterli ayrımı sağlayacak bilgi verememektedirler. Diğer taraftan yeni uygulamaya konulan genotipik yöntemlerin bu gibi suşların ayrımında kapasiteleri gittikçe artmaktadır (Bishop, 2006).

Serotiplere göre moleküler tiplendirme metodlarının karşılaştırılmasında, farklı metodlar sıklıkla PFGE ile karşılaştırılarak değerlendirilmektedir. Bunun en büyük nedeni *Salmonella* moleküler tiplendiriminde PFGE'nin "altın standart" olarak kabul edilmesidir.

Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (PFGE), bakteri genomunun nadir kesen enzimlerle kesilerek, daha az sayıda ancak daha büyük boyutta DNA parçaları elde edilip, bu parçaların özel bir elektroforez tekniğiyle ayrıştırılması esasına dayanan bir RFLP (Restriction fragment length polymorphism) yöntemidir. Bu yöntemde DNA parçaları dalgalanmalar gösteren elektrik akım alanında ayrıştırılır. Bu yaklaşımla 800 kb'a kadar olan büyüklükteki DNA parçaları çözünebilir. Nadir kesen enzimlerin kullanımı ile elde edilen bu profil, bütün bakteri genomunun DNA sekansını yansıtan bir DNA "parmak izi" elde etmemizi sağlar. Oluşan farklı kesim profilleri, izolatlar arasında genetik karşılaştırmaların yapılmasında kullanılır (Riley, 2004).

Standardize Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (PFGE) protokolleri uygulanarak elde edilen bant paternleri, ulusal ve uluslararası veri tabanları oluşturulmasında kullanılır (Dolapçı, 2013).

2.6. *Salmonella* Virulens Faktörleri

Salmonella 'lar aşamalı olarak salgıladıkları virulens faktörleri ile bulundukları konağı yönlendirirler. *Salmonella* 'larda 40'ın üzerinde virulens faktörü tanımlanmıştır. *Salmonella* tarafından salgılanan 300 ilave protein olduğu tahmin edilmektedir. Diğer enterik patojenlerin aksine *Salmonella* 'ların hepsi virulen kabul edilir. İnsan enfeksiyonları ile ilişkili olan bütün izolatların hastalık oluşturma kapasitesi vardır. Suşun virulensi, başlangıç dozu, enfeksiyonun kaynağı ve konak duyarlılığı gibi pek çok faktöre bağlı olarak hastalık tipi derecesi değişir. *Salmonella* 'lar çok çeşitli enfeksiyonlar oluşturabilirler, en sık görüleni gastroenterittir. Her serotip gastroenterit oluşturabilir. Her bir serotip için farklı virulens faktörleri görev alır. Diğer enterik patojenlerde olduğu gibi bu virulens faktörleri hem bakteriyel kromozomda hem de plazmidde bulunur. *Salmonella* kromozomunda bulunan 3000'den fazla genin en az 150-300 tanesinin patojenitede de rol oynadığı tahmin edilmektedir (Us, 2013).

Salmonella’lar alındıktan sonra ancak çeşitli fizyolojik ve immunolojik engelleri aştıktan sonra lokalize enfeksiyon oluşturabilirler. Dış çevredeki pH’nın yavaş bir şekilde düşmesine (pH’nın 7.6 dan 5,5’e ve sonrasında 3,3’e değişimi) maruz kaldıktan sonra asit toleransının gelişmesi “asit tolerans cevabı” olarak isimlendirilmiştir. Bakterinin bu cevabı pH 5,5-6 aralığında uyarılır; ardından gelen düşük pH’da yaşayabilme yeteneği mikroorganizma tarafından iç pH dengesinin devamı sonucunda gerçekleşir. Ortaya çıkan bu asit tolerans cevabı *Salmonella*’nın mide asiditesine dayanmasında ve fagozomun asidik ortamında canlılığını sürdürmesinde rol oynar (Us, 2013).

Salmonella gastrik asit etkisine rağmen canlılığını sürdürdükten sonra ince barsaklara gelir ve enfeksiyon için tercih ettiği bir bölge olan terminal ileumun epitelyum hücreleri veya M hücelerine tutunur. Barsak Peyter plaklarındaki epitelyum hücrelerinin ve M hücrelerinin invazyonu *Salmonella*’ların sistemik alana geçebilmek için kullandığı mekanizmalardan biridir. Tutunmada fimbrialar görev alır (Us, 2013).

Tutunmanın ardından epitelyum hücrelerinin, M hücrelerinin ve makrofajların hızlı invazyonu sonucunda bağırsak enfeksiyonu gelişir. Bu süreçte en az altı farklı genetik bölge rol alır. *Salmonella*’nın invazyon genotipi in vitro olarak makrofajlar, T ve B hücreleri gibi çeşitli hücre dizilerine penetre olması ve replikasyonu ile ilişkilidir. İnvaziv *Salmonella* Typhimurium makrofajlar içinde replike olur ve ardından büyük vakuoller içinde kalır. Virulen *Salmonella* saatler içinde konak hücre zarının buruşmasına, sitotoksik tepkimelere ve apoptozise yol açar. Böylece enfeksiyon meydana gelir, bakteri canlılığını devam ettirir ve konağın bağışık cevabından kaçarak sistemik olarak yayılır.

Salmonella Typhi ve *Salmonella* Paratyphi A, B, C invaziv patojenlerdir. Enfeksiyon bölgesi olan ince bağırsaklara ulaşmak için öncelikle mide asidini aşmaları gerekir. Bu durum tifoid suşlar da dahil bütün *Salmonella*’larda bulunan asit tolerans cevabı ile aşılanır. Tifo ve paratifo dışındaki diğer *Salmonella*’lar, bakteri aracılı endositoz ile bakteri hücrelerin fagositozunda diğer bağırsak epitelyum hücrelerini uyabilirlerken, tifoid ve paratifoid basiller Peyter plaklarının üstündeki M hücrelerini tercih ederler. Alımı takiben organizma makrofaj ve lenfositlerle veya submukozadaki diğer lenfoid dokularla etkileşir. Makrofajlar içinde hayatta kalabilmeleri sayesinde bağırsaklardan mezenterik lenf nodlarına yayılırlar. Torasik kanaldan sistemik dolaşıma geçerek karaciğer ve safra kanallarını enfekte ederler. Hareket yeteneğinin sağlamlığı, demir taşıma sistemi (enterochelin), Vi antijeni (kompleman C3’ün bağlanmasını engelleyerek komplemanın öldürücü etkisini azaltır) tifoid suşlardaki diğer önemli virulens faktörleridir (Us, 2013).

2.6.1. *Salmonella* Virulens Plazmidleri

Salmonella'nın patogeneğinde ençok çalışılan faktör virulens plazmidleridir. Plazmidler tanımlanmış ilk horizontal aktarılan DNA elemanlarıdır. Bu şekilde genetik materyal kazanan bakteriler hızla patojen bakterilere dönüşürler. Virulens plazmidleri büyük moleküler ağırlıkta (50-100 kb) ve sadece bazı *Salmonella* serotiplerinde varolan plazmidlerdir. Bu kromozom dışı elemanların büyüklükleri serotipten serotipe değişmekle birlikte beş geni kodlayan 8 kb'lık bölgesi bütün virulen plazmidlerde bulunur. Bu bölgeye *spv* (*Salmonella* plazmid virulens) genleri denir. Yapılan çalışmalarda gastroenterit gibi erken enfeksiyonlarda *spv* genlerinin rol oynadığına dair çok az kanıt rastlanmıştır. Virulens plazmidleri kan izolatlarında (% 76), dışkı (% 42) izolatlarına göre daha yaygın olarak bulunur. Bu durum *spv*'nin septisemi gibi geç enfeksiyonlarda rol oynadığını göstermektedir (Us, 2013). *Salmonella*'nın bağırsak dışı bölgelere (ör. mezenterik lenf nodları, karaciğer, dalak) yayılımı *spv* taşıyan serotiplerde, virulens plazmidi taşımayanlara göre fazladır. *spv* genlerine sahip serotiplerin virulens plazmidi olmayan suşlara göre bağırsak dışı dokularda daha fazla çoğaldıkları gösterilmiştir. *spv* pozitif *Salmonella* Dublin suşları ile yapılan hayvan deneylerinde hayvanlarda ağır diyare geliştiği ve enfeksiyonun ölümle sonuçlandığı görölmüştür. *spv* düzenleyici kusuruna sahip mutant suşlar sistemik bir hastalık belirtisi oluşturmayıp sadece hafif bir enterite neden olurlar. Bu bulgular *spv* virulens genlerinin hem bağırsakta hemde bağırsak dışı oğalmada rol oynadığını düşündürmektedir (Us, 2013).

2.6.2. *Salmonella* patojenite adaları

Kromozomal DNA'nın horizontal aktarımını sağlayan plazmidler dışında başka mekanizmalarda söz konusudur. Çeşitli virulens fonksiyonlarının kromozomun farklı bölgelerinde gruplanması, bu bölgelerin genetik olarak sabit olmaması ve sıklıkla silinmesi yeni bir genetik eleman formunun varlığını akla getirdi. Patojenite adası terimi ilk kez 1983'te *E.coli*'nin üropatojen suşlarının hemolitik aktivitesi ile ilgili genlerin genetik değişkenliğini gözlemleyen Hacker ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır.

Patojenite adaları, bakteri kromozomundaki büyük ve ayrı genetik oluşumlardır. Bir veya daha fazla virulens geni içerirler. Genellikle genetik olarak dengesizdirler. Bu durum doğrudan tekrarlar, integrazlar, transpozazlar ve bakteriyofaj genleri gibi DNA hareketliliği ile ilgili genetik elemanların varlığını kapsamaktadır. Patojenite adalarının DNA'larının

bileşimi genomdan farklıdır. Guanin ve sitozin rezidülerinin yüzdesi (% G+C) olarak ifade edilen baz bileşimi her bir bakteri türü için özeldir. Kromozomun ortalama baz bileşiminden daha fazla veya az G+C içeren bir DNA parçası bu bölgenin bir başka türden horizontal olarak alındığını gösterir. Genellikle tRNA'ları kodlayan genler ile ilişkilidirler. tRNA genlerinin farklı bakteri türlerindeki korunmuş yapılarından dolayı, horizontal olarak kazanılan DNA'nın başlangıç ucu oldukları düşünülmektedir. Patojenite adasının kazanılması sayesinde bakteriler diğer patojenlerden gelen karmaşık virulens fonksiyonlarına hızla sahip olurlar. Etkenin konak aralığı genişler ve konak organizmada yeni bölgelere kolonize olabilir (Us, 2013).

Salmonella Enterica'nın önemli virulens özellikleri; enterositlerle etkileşerek diyareye yol açma, patojen olmayan hücrelerin invazyonu, fagozitoza rağmen hayatta kalabilme ve ökaryot konak hücrelerinde çoğalabilmedir. Bu virulens fonksiyonları karmaşık multigen özelliklerdir. Virulens fenotiplerinin genetik temelini incelemek amacıyla çeşitli özelliklerde patojenite adalarına sahip olan *Salmonella* Enterica'da büyük virulens gen grupları tanımlanmıştır ve bunlara "Salmonella Patojenite Adası (SPA)" adı verilmiştir. Pek çok SPA'ları karşılaştırmalı genomik çalışmalar ile araştırılmıştır. Fakat çoğunun virulensdeki rolü henüz tam açıklığa kavuşmamıştır (Hensel, 2006).

2.6.2.1. *Salmonella* Patojenite Adası-1 (SPA-1)

SPA-1 içindeki genler invazyon yapamayan *S. Enterica* suşlarının tanımlanması sırasında transpozon mutagenesi yaklaşımı ile belirlendi. Daha sonraki incelemelerle invazyon fenotipinde pek çok genin gerekli olduğu ortaya çıktı. Bu genler *Salmonella* kromozomunda patojenite adasının pek çok özelliğine sahip olan farklı bir invazyon bölgesindeki sentizom 63 içinde gruplandı. Bu bölgeye daha sonra SPI-1 adı verildi.

SPI-1; *S.bongori* ve *S.enterica*'nın bütün alt türlerinde bulunur. SPI-1 genlerinin dizileri kıyaslandığında bu gen grubunun *Salmonella* türlerinde ve *Shigella* türlerinin virulens plazmidinde bulunan spa/mxi bölgesi içindeki invazyon genlerinde korunduğu gösterilmiştir (Us, 2013).

SPI-1 yaklaşık 40 kb büyüklüğündedir. SPA-1 herhangi bir tRNA geni ile ilişkili değildir. Fonksiyonel incelemeler SPI-1'in en az 2 farklı elemendan oluştuğunu gösterir. Bir elemanı, Tip III sekresyon sisteminin (TTSS) birleşmesi ve fonksiyonu için gerekli olan yaklaşık 30 genden oluşur. TTSS, gram negatif bakterilerde bulunan proteinlerin ökaryot hedef hücre içine temas sonucu aktarılmasına aracılık eden makromolekül kompleksleridir.

SPI-1 tarafından kodlanan TTSS, hücre dışındaki *Salmonella* tarafından proteinlerin konak hücreye taşınmasına aracılık eden iğne ucu benzeri yüzey eklentileri oluşturur. SPI-1’de bulunan *sit ABCD* genlerinin küçük bir grubundan oluşan başka bir elemanı demir alım sistemini kodlar, fakat invazyonda rol oynamaz (Hensel, 2006).

Enfeksiyon esnasında *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* patojenite adası-1 (SPI-1)’de kodlanan tip III salgı sistemi (T3SS-1) aracılığı ile efektör proteinlerini enjekte ederek, enterositlere ve mikrofild (M) hücrelerine dahil olur. Altı efektör, Rho ailesi GTPazlar için iki guanin nükleotit değişim faktörü (*SopE* ve *SopE2*), inozitol fosfat fosfataz (*SopB*, *SigD* olarak da anılmaktadır), aktin bağlanma proteinleri (*SipA* ve *SipC*) ve aktiviteleri bilinmeyen efektörler (*SopA* ve *SopD*), beraber çalışmak suretiyle bakterinin bağırsak epitel hücrelerine girmesini sağlamakta ve bağırsak mukozasında enflamasyon oluşumunu başlatmaktadır (Akçelik ve Akkoç, 2010).

SPI-1, *S. enterica*’nın önemli bir virulens özelliği olan fagositoz yapmayan hücrelerin invazyonu için gereklidir. *Salmonella*’nın invazyon genleri ile Shigellanın *mxi/spa* invazyon genleri yakın ilişkilidir. SPI-1 genlerinde mutasyona sahip *Salmonella*’ların hücre kültürü ve hayvan modellerindeki invazivliği azalır. Bağırsağın invazyonu sırasında SPI-1’in kodladığı *SipB* proteini makrofajlarda bulunan hücre içi kaspaz-1’i aktive eder (Hersh, 1999). Kaspaz-1 sistein proteaz ailesinin bir üyesidir ve enfekte makrofajlarda apoptozu uyarak *Salmonella*’ların bu hücrelerden kaçmasına yol açar. Aynı zamanda polimorf nükleer lökositlerin lokal inflamasyonu ve infiltrasyonunu artıran bioaktif sitokinlerin üretilmesi için, proinflamatuvar sitokinler olan IL1 β ve IL18’i de parçalar. Kaspazın *SipB* aracılı aktivasyonu Peyer plakları ve mezenterik lenf nodlarında kolonizasyonu artırır. *Salmonella* konak savunmasını yıkarak bakterilerin daha uzun süre konakta kalmasına izin veren, böylece daha çok yayılmasını sağlayan proteinler salgılar. SPI-1 tarafından kodlanan tip III salgılama sistemi (TTSS) pek çok etkili proteinin konak hücrelere aktarılmasında rol oynamaktadır. Tip III salgılama sistemin (TTSS) bakteri sitoplazmasından konak hücre sitoplazmasına salgılanmayı sağlayan ve en iyi bilinen ve en çok çalışılan mekanizmadır (Heffron, 2011). *SipA*, *SipB*, *SipC*, *SptP* ve *AvrA*, SPI-1 bölgesindeki genler tarafından kodlanır. *SipABC* ve *SptP*, *Salmonella* türlerinde korunmuştur. *AvrA* SPI-1 üzerinde bulunur ve çok değişkendir. Efektör protein *SopA*, *SopB*, *SopD*, *SopE* ve *SopE2*, SPI-1 dışındaki bağımsız bir bölge tarafından kodlanır. *SopB*, *SopD*, *SopE2* bölgeleri *Salmonella* türlerinde korunmuş iken, faj içeren *SopE*’nin dağılımı değişkendir (Us, 2013).

SPI-1 tarafından salgılanan efektörler epitelyum hücrelerinin invazyonunda ve bağırsak inflamasyonunun ardından gelişen gastroenterit için zorunludur. SPI-1, TTSS

antijenleri işleyen M hücrelerinin öldürülmesi ve böylece bağırsaktaki lenfoid dokuya girişlerinin engellenmesi için gereklidir. *Salmonella* aynı zamanda CD18 taşıyan hücreler tarafından da kan dolaşımına taşınabilir. *Salmonella* 'lar hücreleri toll benzeri reseptörlere, nod benzeri reseptörlere, sitoplazmik reseptörlere ve diğer potansiyel reseptörlere bağlanan bakteri ürünlerine maruz bırakarak enflamasyon gelişimine yol açarlar (Monark, 2008). Bu etkileşim sonucu öncül yangısal sitokin ve kemokinler salınır ve inflamasyon süreci başlar. Kemokinler profesyonel fagositleri bağırsak lümenine toplar. Bu durum insanlarda yangısal diyare ile sonuçlanır. SPI-1 efektörleri *SipA*, *SipC*, *SopB*, *SopD*, *SopE*, *SopE2* ve *SptP* enfeksiyonun erken intestinal aşamasında önemlidir (Us, 2013).

Salmonella bir konak hücre ile temasa geçtiğinde hücre bakteriyi yakalar ve hücre içine alır. Hücre invazyonuna aracılık eden dört adet efektör vardır: *SopB*, *SopE*, *SopE2* ve *SptP*.

İnsan vücudundan alınan doku örnekleri *Salmonella* Typhimurium ile insan bağırsak mukozası arasındaki ilişkinin tanınması için kullanılmaktadır. İnsan epitel hücrelerinin kullanıldığı bu çalışmalarda; *SopB* tarafından üretilen fosfatidil inozitol fosfatazlar ile *SopE-SopE2* tarafından üretilen RhoGTPaz'ların beraberce *Salmonella* Typhimurium işgali için gerekli olan WASp/Scar proteinlerini aktive ettiği belirlenmiştir. Aktive edilen WASp/Scar proteinleri Arp2/3 kompleksini etkileyerek aktin filamentlerinin yeni dallar oluşturmalarını sağlamaktadır. *SipA* proteini bu aşamada aktin polimerizasyonu için gerekli olan kritik dal konsantrasyon miktarını düşürmekte, yeni dalların oluşumunu hızlandırmakta ve ADF/kofilin tarafından yönetilen aktin çözülmelerini engellemektedir. Yeni aktin dallarının hızlıca büyümesi membranı dışarı doğru itmekte ve membran kabartılarının oluşmasına, makropinozitoz ile bakterinin içeri alınmasını sağlamaktadır (Akçelik ve Akkoç, 2010).

İnsanlarda yangısal diyarede dışkıda beyaz küre artar. Diyare sonucunda normal flora ortadan kalkar ve besin maddelerinin *Salmonella* açısından göreceli fazlalığı ile bağırsaklarda *Salmonella* replikasyonu artar. İnsanda *Salmonella* Typhi oral enfeksiyonun ardından monositlerin içinde taşınarak hızla kan dolaşımına geçer.

2.6.2.2. *Salmonella* Patojenite Adası-2 (SPA-2)

SPI-2, *Salmonella*'nın sistemik enfeksiyonu gerçekleştirebilmesini ve konak organlarında çoğalabilmesini sağlar. Bu virulens fenotipi, *S. enterica*'nın fagositik hücrelerde yaşayabilme ve çeşitli ökaryotik hücrelerde vakuoller içinde çoğalabilme yeteneğini sağlar (Akçelik ve Akkoç, 2010).

40 kb büyüklüğünde olup, 32 geni kodlamaktadır. Bu genlerin çoğu konak hücre içinde bakteri üremesi sırasında eksprese edilir. Bu genin ekspresyonu sistemik enfeksiyon oluşumu için önemlidir ve bakterinin makrofaj içinde çoğalmasını kontrol eder.

Salmonella enfeksiyonlarında gerçek doku hasarı, nötrofiller yardımıyla; proteazların, miyeloperoksidazların ve NADPH oksidazların salgılanması ile gerçekleşmektedir. Epitelin bariyer fonksiyonu ortadan kalktıktan sonra, kan damarlarından çok miktarda damar sıvısı kaybı gelişir ve kandan bağırsak lümenine yüksek oranda sıvı geçişi olur. Nadiren, bakteriler koruyucu makrofaj cevabı oluşmadan önce kan dolaşımına girebilirler ve bu durumda da septik şok ve ölüm görülür. Bağırsak mukozasında canlı kalabilmek için *Salmonella* Typhimurium'un kullandığı niş, makrofajların içerisidir. Makrofajların içerisinde canlı kalmak için ise, SPI-2 tarafından kodlanan ikinci bir tip III salgı (T3SS-2) sistemine ihtiyaç duyulur. Bu bakterilerde T3SS-2'nin inaktivasyonu sonucu, buzağılarda ve streptomisin ile muamele edilmiş farelerde *Salmonella* Typhimurium'un ağızdan enfeksiyonunu takip eden 24 saat içerisinde bağırsak mukozasında nötrofil sızmasının önemli ölçüde düştüğü belirlenmiştir. Enflamasyonunun, hücre içi bir adaptör protein olan ve Toll benzeri reseptörlerden (TLR) alınan sinyalleri birleştiren MyD88'e bağımlı olması, lamina propria'da T3SS-2 ortamlı bakteriyel hayatın, patojen tanıyan algılayıcılar tarafından sürekli izlendiğini göstermektedir (Akçelik ve Akkoç, 2010).

2.6.2.3. *Salmonella* Patojenite Adası-3 (SPA-3)

SPA-3 17 kb büyüklüğündedir ve 10 gene sahiptir. Bu adacık *Salmonella enterica* serovar Typhi ve Typhimurium ile *Salmonella bongori*'de bulunur. SPA-3 tarafından kodlanan temel virulens faktörü, yüksek afiniteli magnezyum transport sistemi (MgtS)'dir. Sitoplazmik membranda yerleşim gösteren MgtS, *Salmonella* türlerinin gerek hücre içinde gerekse makrofajların içinde canlı kalabilmesi için gereklidir.

SPI-3 tarafından kodlanan virulens faktörü, *Salmonella*'nın konak hücre içinde canlı kalabilmesi için önemli olan yüksek affiniteli magnezyum transport sistemidir (MgtCB). MgtCB sistemindeki bozucu bir mutasyonu içeren suşların sistemik virulens etkileri ve hücre içinde çoğalma miktarları azdır. Bu gen kümesi için de bulunan *misL*, bir ototransporter proteini kodlamaktadır. *S. Typhimurium* ile enfekte olmuş tavuk ve farelerde bağırsak yüzeyinde bakteriyel kolonizasyonun gerçekleşmesi için *misL* geninin tam aktivitesini göstermesi gerekir. *Salmonella* patojenite adası-3 (SPI- 3) *S. enterica* serovar Typhimurium kromozomunda 81 dakikika bölgesinde yer alan *selC* tRNA geninin önünde (3' ucunda,

downs tream) lokalize olan 17kb uzunluğunda bir bölgeyi kapsamaktadır. Bu bölgenin C+G içeriği % 47,5'tur ve genomun diğer bölgelerindeki G+C içeriğinden (%52) farklıdır. SPI-3'un merkezinde yer alan 4 genlik grup *rmbA*, *misL*, *fidL* ve *marT* yalnız bazı alt türlerde bulunmaktadır ve insersiyon seri kalıntıları tarafından genler ayrılmaktadır. SPI-3 altı transkripsiyon ünitesi halinde organize olmuş on açık okuma kalıbı (ORF) içermektedir. Bu açık okuma kalıpları, yukarıda söz edilen 4 gen dışında, Mg²⁺ transporter protein MTB ve biyokimyasal fonksiyonu bilinmeyen *MgtC*'yi kodlayan operonu oluşturmaktadır. *MgtC* geni makrofaj içinde ve in vitro koşullarda düşük Mg²⁺ konsantrasyonunda bakterinin canlılığını korumasında rol almaktadır (Akçelik ve Akkoç, 2010).

2.6.2.4. *Salmonella* Patojenite Adası-4 (SPA-4)

27 kb büyüklüğündedir ve tRNA'ya bitişik yerleşim göstermektedir. Bu adacık 18 genden oluşur ve Tip 1 sekresyon sistemi (TOSS)'ni kodlayan genleri içerdiği düşünülmektedir. SPA-4 sitotoksin sekresyonunda rol alır ve hücreyi apoptoza götürür. Bu genlerin kodladığı proteinler etkenin makrofaj içinde canlı kalmasını sağlar.

SPI-4 da bulunan genler T3SS'e benzer DNA baz dizi özelliği göstermektedir. Bunun yanında transpozon mutasyonu denemeleri sonucunda *Salmonella*'nın makrofaj içinde hayatta kalabilmesi için gerekli fonksiyonları içeren bir kaç lokus tanımlanmıştır. SPI-4 içinde yer alan bu lokuslardan biri *ims94* olarak adlandırılmaktadır. SPI-4, T3SS'e benzer bir mekanizma ile SiiE adı verilen bir adhezin kodlamaktadır. Ancak bu adhezin, fimriyal adhezinlerden farklı bir fonksiyon ile epitel hücrelere tutunmaya yardımcı olmaktadır. % 44,8 gibi diğer patojenite adalarına oranla düşük bir G+C içeriğine sahip olan SPI-4, 23 kb büyüklüğünde bir bölgeyi işgal etmektedir. Dizi analizi çalışmalarından elde edilen verilerde söz konusu bölge *Salmonella* Typhi ile *Salmonella* Typhimurium arasında önemli farklılıklar göstermektedir (Akçelik ve Akkoç, 2010).

2.6.2.5. *Salmonella* Patojenite Adası-5 (SPA-5)

Büyüklüğü 7,6 kb olan SPA-5 bölgesi 6 geni kodlamaktadır. Enterik enfeksiyonların patogenezesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir.

SPI-5, salgı sistemleri ile translokasyonları gerçekleştirilen efektör proteinleri kodlar. T3SS-1 aracılığı ile translokasyonu yapılan ve sıvı salınımını başlatarak diyareye neden olan *SopB* efektör proteini ve T3SS-2 aracılığı ile translokasyonu gerçekleştirilen *PipB* efektör

proteini bu lokusta kodlanır. SPI-5 genlerinin regülasyon sistemleri, SPI-2 genleri ile benzerdir. Bu genlerin aktivasyonu, hücre içi (in vivo) ya da bakterilerin Mg^{2+} kısıtlamasına maruz kaldığı in vitro koşullarda gelişir. *SopB* ifadesi, Hi 1A fonksiyonuna (SPI-1 kodlu merkezi regülatör protein) bağlıdır (Akçelik ve Akkoç, 2010).

2.6.2.6. *Salmonella* Patojenite Adası-6 (SPA-6)

59 kb'lık bir bölgedir ve hem Typhi hem de Typhimurium serovarlarında bulunmaktadır. Bu adacık *Salmonella* kromozomal adacığı (SCI) olarak da bilinir. Yapılan çalışmalarda, serovar Typhimurium'daki SCI lokusu yok edildiğinde, etkenin neden olduğu sistemik enfeksiyonların patogeneğinde bir değişiklik olmamakla birlikte hücre kültüründe invazyonun gerçekleşmediği görülmüştür.

2.6.2.7. *Salmonella* Patojenite Adası-7 (SPA-7)

Majör patojenite adası (MPI) olarak da bilinen SPA-7 133 kb'lık en büyük *Salmonella* adacığıdır. Bu adacık tarafından kodlanan en önemli virulens faktörü Vi antijenidir. Vi antijeni kapsüler ekzopolisakkarit yapısında olup, tifo sırasında ateşin yükselmesine neden olmaktadır. Bir diğer virulens faktör, pilgen kümesi tarafından kodlanan tip IVB pilusudur. SPA-7'de ayrıca *sopE* geni de bulunur. *sopE* geni *sopE* fajını aktive eder ve bu fajın diğer izolatlara transferini sağlar (Sırıken, 2013).

2.6.2.8. *Salmonella* Patojenite Adası-8 (SPA-8)

6,8 kb büyüklüğündedir ve *pheV* tRNA'nın yakınında yer alır. Saroj ve ark (2008) bu genin serovar Typhi dışında serovar Cholerasis ve Paratyphi A'da da bulunduğunu bildirmişlerdir. Virulens genleri bakteriyosinlerdir, ancak bu genlerin fonksiyonları henüz açıklanmamıştır (Sırıken, 2013).

2.6.2.9. *Salmonella* Patojenite Adası-9 (SPA-9)

Yaklaşık 16 kb büyüklüğündedir. Serovar Typhi kromozomundaki Lizojenik bakteriyofaja bitişik olarak bulunur. SPA-9, TOSS ve RTX (repeats-in-toxin) benzeri toksini kodlayan genleri içermektedir (Sırıken, 2013).

2.6.2.10. *Salmonella* Patojenite Adası-10 (SPA-10)

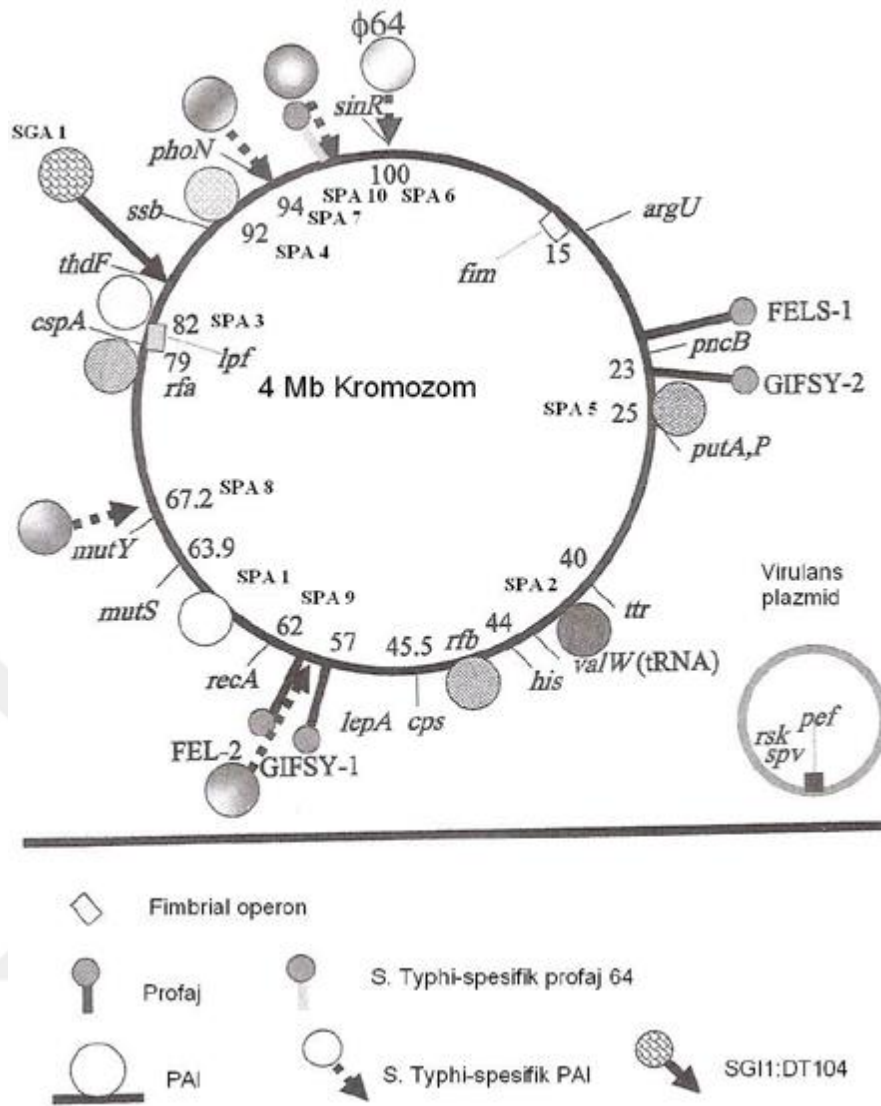
32,8 kb büyüklüğündedir ve tRNA leuX'de yerleşim göstermektedir. SPA-10'un virulens faktörü olarak, konak hücre yüzeyinde tutunmayı sağlayan sef fimbria proteinlerini kodlamaktadır (Sırıken, 2013).

2.6.2.11. *Salmonella* Genomik Adası-1 (*Salmonella* Genomic Island; SGI-1)

Çoklu direnç integronları (yer değiştirebilen genetik elemanı) içeren mobilize bir yapı olup, *Salmonella enterica* kökenlidir. Bir başka deyişle çoklu antibiyotik direnç genlerini taşıyan gen kümelerini içerir. 43 kDa'luk bir lokus olup pek çok *S. enterica* serotiplerinde bulunmaktadır. SGI-1 içeren suşların çoklu antibiyotik direnci gösterdiği belirlenmiştir (Sırıken, 2013).

2.6.2.12. Yüksek Patojenite Adası (High Pathogenicity Island HPI)

Demir alımı için ihtiyaç duyulan siderofor (demir taşıyıcı) biyosentezi için gerekli genleri içerir ve *S. enterica*'da bulunur. HPI'ya sahip olan suşlar demir eksikliği olan ortamlarda demir şelatörü sentezlemektedirler (Sırıken, 2013).



Şekil.2. *S.enterica*'nın virulens lokuslarının genetik haritası.

Gen adalarının spesifik tRNA'ları veya toparlayıcı genlerin pozisyonları kısmi olarak kromozomlar üzerinde tarif edilmiştir. Sadece enterik ateş ile ilgili *Salmonella* serovarlarında bulunan kesik çizgili oklar yoluyla haritaya yerleştirilen serovar Typhi gen adaları olan SPA 6-10 da kapsayan tüm 10 *Salmonella* patojenite adaları çemberde resimlenmiştir. Profaj genomları da haritada bulunmaktadır ve lolipop şeklinde gösterilmiştir. Adhezin/fimbrial operonlar kare olarak şematize edilmiştir (D'aoust ve Maurer, 2007).

2.6.3. Tip III Sekresyon Sistemi (TTSS)

“Moleküler enjektör” olarak da bilinen TTSS, temasa bağılı sekresyon veya konak hücreye virulens proteinlerinin aktarımını gerçekleştirir. 20 den fazla proteinden oluşmuş karmaşık bir yapı olup, bu proteinlerin organizasyonu enjektör yapısıyla benzeşmektedir. TTSS’den sorumlu genler *Salmonella*’da kromozomal yerleşim göstermektedir. SPA-1 tarafından kodlanan TTSS intestinal enfeksiyonun başlatılmasından, SPA-2 tarafından kodlanan TTSS ise sistemik enfeksiyonun oluşumundan sorumludur.

Tip III efektör moleküller, iç ve dış membranların genişlemesine yol açacak proteinlerin oligomerik yapıdaki kompleks birliğine ihtiyaç duyarlar. Sec mekanizması salgı için şart değildir ancak, yapısal proteinlerin iç membrandan translokasyonunu idare eder. *SipA*, *SopA*, *SopB*, *SopD*, *SopE* ve *SopE2* *Salmonella Typhimurium*’da SPI-1 de kodlanan TTSS tarafından salgılanan efektör moleküllerdendir. Bunlar bakteriyel invazyondan sonra epitelyum hücrelerine enjekte olur (Akçelik ve Akkoç, 2010).

2.6.4. Enfeksiyonun Hücre İçi Dönemi

Salmonella hücre içinde “*Salmonella* içeren vakuol” denilen bir vezikül içinde bulunur ve orada replike olur. Bakteri içine alındıktan sonra SPI-2 aracılığı ile epitel hücreleri veya makrofajlar gibi profesyonel fagositlerin içine efektörler salgılanır. SPI-2, TTSS *Salmonella*’nın fagosit içinde hayatta kalışını ve replikasyonunu artırır. SPI-2’de mutasyon varsa enfeksiyon sonrası devamlılık sürdürülemez. *Salmonella* hücre içine girdiğinde veziküler trafik tamamen değişir. Hücre enfeksiyonundan yaklaşık 2-6 saat sonra enfekte olan hücre tipine bağılı olarak *Salmonella* replikasyona başlar.

2.6.5. Barsaktan Yayılım ve Sistemik Enfeksiyon

Tifoya yol açmayan *Salmonella* serotipleri, sağlıklı bireylerin savunma mekanizmaları ile baş edemezler ve bu nedenle bakterilerin intestinal mukozadan sistemik enfeksiyon bölgelerine yayılması kısıtlanır. Gastroenterite yol açan ve tifo etmeni olmayan *Salmonella* serotiplerinin konak işgal mekanizmaların anlaşılması üzerine sağlanan gelişmeler, Typhi’nin savunma mekanizmalarını aşmasında yardımcı olan spesifik özelliklerini ve neden

gastroenterit yerine tifoya yol açtığını tanımlamamıza yardımcı olmuştur. Özellikle *Salmonella*'da patojenite ile ilişkili moleküler elemanların genetik ve biyokimyasal esasının tanısı, enfeksiyon hastalıklarının temel biyolojik süreçlerinin açıklanmasına öncülük etmektedir.

Salmonella ve konak hücre arasındaki ilk etkileşimin ardından hücrenin dengesi bozulur. Enfeksiyona karşı aktif bir yangısal yanıt oluşur veya hücre ölümüne gider. Hücre ölümü fazla miktarda sitokin salınımı ile sonuçlanır. Yangısal sitokinlerin salınımından sonra kemotaktik makrofajlar *SipB* ve kaspaz 1 arasındaki direkt etkileşim ile öldürülür. *Salmonella* hücre enfeksiyonu sonrası farklı efektörlerin açığa çıkması sonucu makrofajları öldürür. İleumda SPI-2 barsak penetrasyonundan önce uyarılır. *Salmonella* piroptoz ile hücre ölümüne yol açar. Piroptoz DNA'nın kırıldığı ve zar üzerinde por oluşumu ile hücrenin parçalandığı apoptozun daha yangısal bir türüdür. *Salmonella* ayrıca kaspaz 1'i aktive eden trombosit aktive edici faktörü uyaran flagellinin sitoplazmaya salınımı sonucu inflamazomu aktive eder.

Salmonella zaman zaman da olsa oral enfeksiyonun ardından dakikalar içinde kan dolaşımına ulaşır. İntestinal kanaldan kana yayılmak için iki yolu kullanır:

- 1.Fagositer hücreler içinde taşındığı dakikalar veya birkaç saat süren direkt yol
- 2.Bakterilerin lenfatik sistemden geçtiği ve en az 24 saat süren indirekt yol

Salmonella kan dolaşımına başlıca M hücreleri, Peyer plakları, mezenterik lenf nodları ve lenfatikler aracılığı ile dahil olur (Heffron, 2011). Hücre enfeksiyonundan 4 saat sonra “*Salmonella* içeren vakuol“ gittikçe daha çok bakteri ile dolar. Komşu hücreler bakteriyel progeniyi aldığında ilk olarak enfekte olan hücreler ölür. Daha sonra bakteri uzak bölgelere ulaşır (Us, 2013).

2.6.7. Doğal ve Kazanılmış Bağışıklıktan Kaçış

Dentritik hücreler immun sistemin ilk antijen sunan hücreleridir ve naif T hücrelerini direkt olarak uyarabilme özelliğindedir. *Salmonella* proteinlerinin işlenmesi ve dentritik hücreler tarafından sekonder lenfoid organlardaki naif T hücrelerine sunulması ile etkili bir kazanılmış bağışık yanıt ortaya çıkar. *Salmonella* dentritik hücreleri öldürür. Patojenlere maruz kalan dentritik hücreler enfekte patojene karşı pek çok sitokin salgırlar. Bir *Salmonella* enfeksiyonunu ortadan kaldırmak için CD4, CD8 ve B hücreleri gerekir (Wick, 2007).

2.7. *Salmonella* Biyofilmleri

Bakteriyel biyofilm kavramı ilk olarak 1683 yılında Antonie Van Leeuwenhoek tarafından ifade edilmiştir. Araştırmacı, insan dışından kazıdığı plakları kendi ilkel mikroskobunda incelemiş ve bu gözlemlerindeki yapılara animalkuli adını vermiştir.

Biyofilmler bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir. Bu jelsi tabaka, bakteri hücreleri tarafından üretilen nükleik asit, proteinler ve ekzopolisakkaritlerden oluşan hücre dışı matriks yapısından oluşur (Gün ve Ekinci, 2009). Biyofilm, birbirine ya da bir yüzeye yapışık bakterinin organik bir polimer matriks içine gömülmesidir. Costerton ve Donlan (2002) tarafından yeni bir biyofilm tanımı yapılmıştır. Buna göre; ara yüzlere, birbirlerine ya da bir substrata geri dönüşümlü olarak tutunmuş ve ürettikleri hücre dışı polimerik matriksin içine gömülmüş, farklı mikrobiyel gelişme fizyolojileri ve farklı genetik ifade ile ilişkili biçimde değişen bir fenotip sergileyen yapılar, biyofilm olarak adlandırılmıştır.

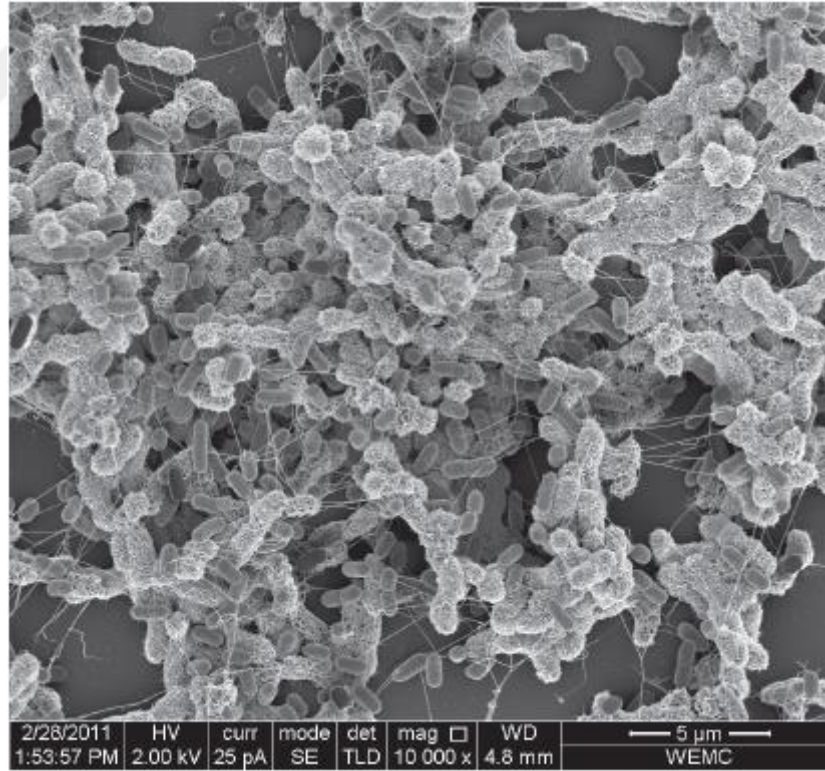
Biyofilm yapılarında en dikkat çekici özelliklerden biri polimerik matriks içerisinde gömülü vaziyette bulunan bakterilerin planktonik yaşam tarzlarından farklı olarak fenotipik ve morfolojik farklılıklar sergilemeleridir. Biyofilm yapısındaki bakteriler ve planktonik bakteriler arasında yaklaşık olarak % 1-10 arasında bakteriyel transkript farkı saptanmıştır. Gen ifade düzeyleri ve metabolizma aynı şekilde biyofilm oluşumunun farklı safhalarında çeşitlilik gösterir. Gram negatif bakterilerde çeşitli çevresel koşullar (örneğin; besin arzı, konakçı metabolitleri, kolonize olunan yüzeylerin fiziksel ve kimyasal nitelikleri, sıcaklık, oksijen gerilimi, tuz konsantrasyonu ve ozmolarite) ve bakterinin kendi ürettiği sinyaller (örneğin; indol, siklik-diguanilat, asetil fosfat ve N-asilhomoserin laktonlar) biyofilm oluşumunda, olgunlaşmasında ve dağılmasında rol oynar. Bu hücre dışı polimerik matriks, ağsı bir tabaka olup, su ve besin maddelerinin dağıtıldığı kılcal damar su kanallarının bulunduğu gözenekli bir yapıdadır.

Mikroorganizmalar tarafından üretilen ekzopolisakkaritler (EPS), mikroorganizmaların gram pozitif veya gram negatif olup olmamasına bağlı olarak da değişir (Gün ve Ekinci, 2009).

Bakteriyel türlerin farklılığına bağlı olarak ekzopolisakkaritlerin tipi ve miktarı çeşitlilik göstermektedir. Bakteriyel ekzopolisakkaritler biyofilm matriksinin en temel ögesidir. Matriks sulu bir tabiata sahip olup birçok türün biyofilminde anyonik bir karakter sergileyerek temel besinlerin ve minerallerin yakalanarak konsantre hale getirilmesine olanak sağlayan bir

sistem oluşturur. Biyofilmler içerisinde yer alan bakteriler için çevresel tehditlere, biyositlere, antikorlara, surfaktanlara, serbest yaşayan amip gibi predatörlere ve beyaz kan hücrelerine karşı koruyucu bir avantaj sağlar. Matriks üç boyutlu bir kuvvet alanı yaratarak bakterileri çevreler ve bakterilerin yüzeylere sıkıca tutunmalarını sağlayarak bakterilere stabilite kazandırır.

Biyofilm kütesinin % 97 gibi büyük bir kısmını su oluşturur. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; % 1-2 ekzopolisakkarit, % 1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, % 1-2 nükleik asit, lipid, fosfolipitlerdir. Ancak bu oranlar mevcut organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine, genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir. Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstraselüler matriks biyofilm hücrelerinin tutunmasını sağlar. Yüzeye sıkıca tutunan bakteri burada çoğalarak önce mikrokolonileri, mikrokolonilerde büyüyerek ve genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur. Ekzopolisakkarit üretimi, organizmanın yüzeye dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir ve bu biyofilm oluşumunun bir göstergesidir (Gün ve Ekinci, 2009).



Resim 1. Elektron mikroskopunda *S. Typhimurium* biyofilm görüntüsü (Greetje, 2013)

Monosakkarit monomerlerinin (1→4) β glikozit bağlarıyla bir araya gelmesiyle oluşan selüloz, birçok bakteriyel matriks kompozisyonunda bulunan önemli bir bileşendir.

Proteinler de biyofilm matrikslerde selüloz gibi önemli bileşenlerdir. Proteinlerin miktarları ve tipleri biyofilm içerisindeki mevcut bakterinin türüne göre değişim gösterir. Biyofilm matriksin kompozisyonuna dahil edilen lektinler bu duruma tipik bir örnek teşkil etmektedir. Lektinler, piluslar ve gram negatif bakteri dış membranı gibi hücre yüzey yapılarıyla ilişkilidir ve bakterilerin hem birbirlerine hem de konakçılara spesifik bir şekilde tutunmalarına olanak sağlar (Starke ve ark, 2004). Fimbriyalar temelde fimbrin adı verilen monomerlerin bir araya gelmesiyle oluşan yapısal elemanlar olup, bakterilerin inert yüzeylerle olan etkileşiminde önemli bir rol oynarlar.

Diğer yandan hücre dışı DNA (eDNA), matriksin yapısallığında önem teşkil eder. Bazı bakterilerin matriks yapısındaki DNA, rasgele bir şekilde kromozomal DNA'dan köken almakta ve bu DNA matriks içerisinde hücre-hücre etkileşimine katkı sağlamaktadır. Hücre dışı DNA'nın biyofilmin erken oluşum safhalarında yapısallığa katkıda bulunan bir fonksiyon sergilediği de bilinmektedir

İnsanlarda görülen mikrobiyal enfeksiyonların % 60-80'inin biyofilm oluşturan bakteriler tarafından meydana getirildiği düşünülmektedir. Tek başına yaşayan mikroorganizmalar stres altında, takım çalışması yaparak bir araya toplanmakta ve biyofilm adı verilen yapı içinde gıda azlığı ya da düşük ısı gibi çevresel faktörlerden (UV radyasyon, farklı pH koşulları, ozmotik basınç, su kaybı, antibiyotik vb.) korunma sağlamaktadırlar. Bu yapı besinlerin alt katmanlara inmesine izin veren ve aynı zamanda atıklarını yüzeye yollayan kanallardan oluşan adeta bir şehir mimarisi sergilemektedir (Dolapçı, 2013). Biyofilmler bakterileri bir arada tutarak eksojen ajanlar ya da stres kaynaklarına duyarlılıklarını değiştirmektedirler. Örneğin *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* ve *Vibrio cholerae*'nin biyofilm yapısı içinde bulunmasının asit ve osmotik toleranslarını değiştirdiği bilinmektedir. Biyofilm yapısı içinde gömülü *Salmonella* izolatlarının klorlamaya, trisodyum fosfata ve kurumaya karşı duyarlılıklarının azaldığı, *Salmonella* türlerinin biyofilm oluşturma kapasitelerinin değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Suşa bağlı biyofilm oluşturma kapasitesindeki değişkenlikler *Salmonella*'ların özellikle düşük pH'ya sahip gıdaları kontamine etmeleri sonucunda gelişen enfeksiyonların önlenmesi açısından önemlidir (Hasegawa ve ark, 2011). Bazı bakteriler biyofilm oluşturmak için yüksek eğilime sahiptir. Bunlardan en yaygınları *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* ve *Bacillus*'dur. Bu mikroorganizmalar besin maddelerinin çok olduğu birçok ekosistemde tüm yüzey tipleri üzerinde biyofilm oluşturabilir (Gün, 2006).

Organik yüzey



Resim 2. Organik yüzeyde *Salmonella* biyofilmlerinin yakından, büyüteç altında ve stereoelektron mikroskop görüntüleri (Yardımcı, 2013)

Çevremizde çeşitli yüzeylerde oluşan biyofilmler ile ilgili çalışmalar son 20-30 yıldır giderek artmaktadır. Biyofilm içerisinde bulunan hücreler, kendi ürettikleri ve dış çevreye karşı kimyasal ve mekanik koruma sağlayan bir matriks içerisine gömülü olarak bulunmakta ve üzerlerinde çok çeşitli bileşiklerin birikmesine neden oldukları için hem endüstriyel hem de tıp alanında büyük sorunların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Biyofilmlerin, aletlerin üzerinde oluşturdukları hasarlar, ürün kontaminasyonları, enerji kayıpları, neden oldukları enfeksiyon hastalıkları çok önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Su borularının iç yüzeylerinde oluşarak korozyona yol açan veya gıda işleme alanlarında oluşarak yüzey temizliğinde sorun yaratan biyofilmler endüstriyel kayba da yol açarlar. Endüstriyel/evsel su sistemlerinde, ısı değiştiricilerde, su ileten borularda, gemi karinalarında, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde “biyofouling” olarak adlandırılan istenmeyen tortu ve tabakalaşmalara yol açarlar. Biyofilm oluşan borularda akışkanlık ve ısı taşınımı azalmakta, biyofilm ürüne kontamine olabilmekte, biyofilm içindeki asit oluşumu nedeniyle borular korozyona uğrayabilmektedir. Bu durum sadece mikrobiyologlar için değil, ekolojistler, çevre mühendisleri ve matematikçiler içinde araştırma alanı yaratmıştır (Gün, 2006). Biyofilmler özellikle gıda endüstrisinde mayalanma, süt ürünleri işleme, kanatlı etleri

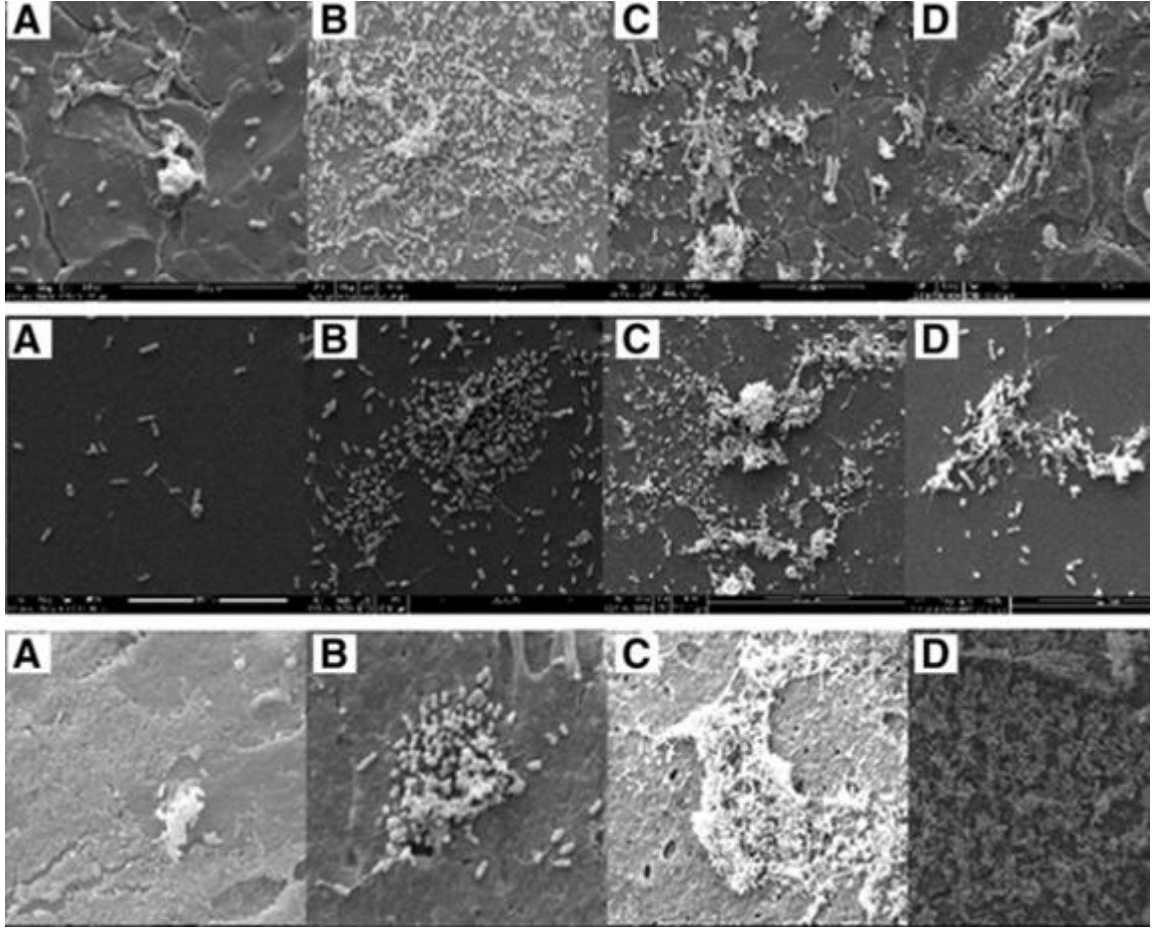
işleme ve kırmızı et işlemede sorun oluşturabilirler. İnsan sağlığı açısından tedavileri güç olan veya sıklıkla tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonları, katater enfeksiyonları, çocukluk çağı orta kulak iltihapları, periodontit, yaygın diş plakları, gingivitler biyofilmlerin yol açtığı patolojilerdir. Ateroskleroz, kronik sinüzit, kronik yaralar, kistik fibrozis, endokardit, iç kulak enfeksiyonları, böbrek taşları, leptospiroz, osteomyelit, periyodontal hastalıklar, eklem protezleri ve protez kalp kapakları ile biyofilm oluşumu arasında ilişki vardır (Dolapçı, 2013a).

Yapılan son çalışmalar; *Salmonella*'nın polimer, çelik ve cam gibi yüzeylerin yanı sıra maydanoz gibi organik yüzeylerde de biyofilm oluşturma yeteneğinde olduğu belirlenmiştir (Moretro, 2009).

Biyofilm içerisindeki bakteriler, birtakım antijenler sentezleyerek antikor üretimini tetikleyebilirler; ancak antikorlar çoğu kez biyofilm içerisindeki bakterileri öldürmek için yeterli etkinliği gösterememektedirler. Bunun sonucunda, biyofilm çevresindeki dokuda immunkompleks hasarı meydana gelmektedir. Yeterli hücrel ve humoral bağışıklığı olan bireylerde dahi biyofilmler, immun sistemce alt edilemeyebilirler. Antibiyotik terapiler, biyofilmlerden açığa çıkan planktonik hücrelerin semptomlarını tersine çevirebilirken, biyofilmlerin yok edilmesinde etkin olamamaktadır. Sürekli antibiyotik terapisine rağmen tekrarlayan semptomların görülmesi sonucunda cerrahi müdahaleyle biyofilmin vücuttan uzaklaştırılması gerekmektedir (Costerton ve ark, 1999).

Biyofilm içerisindeki bakteriler, konakçı immun yanıtına daha güçlü bir şekilde karşı koyabilmekte, planktonik bakterilere oranla antibiyotiklere daha yüksek düzeyde direnç gösterebilmektedirler. Biyofilmler ayrıca kronik enfeksiyonların sürekliliğinde de rol oynamaktadır. Antibiyotik dirençliliğinde biyofilm mekanizmaları farklılık göstermektedir. Bir mekanizma; antimikrobiyel ajanların biyofilmin derinliklerine dek nüfuz edememesiyle ilgilidir. Biyofilmlerde olduğu gibi polimerik matriksler, antibiyotiklerin difüzyonunu engellerler ve genelde antibiyotikler sudaki hallerinden daha yavaş oranlarda biyofilmler içerisinde difüze olurlar. Biyofilmin ve ajanın doğasına göre antibiyotikler biyofilmlerin içine girebilir ya da biyofilmlere zayıf bir şekilde nüfuz eder. Bir bariyerin varlığında antibiyotik ajan, diffüze olabildiği serbest alanda olduğundan çok daha hızlı bir şekilde aktivitesinin kaybedebilmektedir. Bu durum hidrojen peroksit ve hipoklorit gibi reaktif oksidantlar için de geçerlidir. Bu antimikrobiyel oksidantlar fagositik hücrelerin ürünleri olup, biyofilmdeki bakterileri öldürmede yetersizdirler.

Biyofilm içerisinde yavaş gelişme gösteren bakteriler antimikrobiyel ajanlara karşı daha az duyarlıdır. Biyofilmlerdeki bakterilerin farklı gelişme stratejileri göstermeleri bu bakterilerin herhangi bir metabolik saldırıda hayatta kalmaları için zorunludur.



Resim 3. *Salmonella* spp. tarafından üretilmiş biyofilmler; yukarıdan aşağıya paslanmaz çelik, cam ve plastik malzemedeki (A:16°, B:20°, C:28° ve D:35°C’de) (De Oliveira ve ark. 2014).

Günümüzde *Salmonella*’ların meyve ve sebzeler, kümes hayvanları kaynaklı gıdalar, gıda hazırlanan ortamlardaki plastik veya cam yüzeyler, çeşitli tıbbi aletler, insanlarda safra taşları ve solid tümörler gibi biyolojik yüzeyler üzerinde biyofilm oluştururlar. *S.Enteritidis* ve *S.Typhimurium* gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonlarının en sık görülen sebepleridir ve içerisinde plastik, cam ve paslanmaz çeliğin de yer aldığı birçok farklı yüzeyde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip serotiplerdir.

Lahana, marul, fasulye, rezene, kişniş, kavun, pastörize edilmemiş portakal suyu, domates, mango, kereviz, maydanoz gibi birçok sebze ve meyve ile ilişkili salmonelloz

salgınları söz konusu olmuştur. Doğada bir yaprağın üzerindeki bakteri popülasyonunun %30-80'i biyofilm yapısı içindedir (Dolapçı, 2013a).

Sebze ve meyvelerden izole edilen pek çok *Salmonella* türünün biyofilm matriksinin ana bileşenlerini sentezleme yeteneğinde olduğu ortaya konmuştur. Biyofilmler, bakterilerin dezenfektanlar ve diğer kimyasallardan daha az etkilenmelerini sağlamanın yanı sıra UV ışınlarından da korunmalarını da imkan vermektedirler. Kontamine gıdalar üzerindeki biyofilm oluşumları bütün dünyada *Salmonella spp.*'e bağlı gıda kaynaklı enfeksiyonlara büyük katkı sağlamaktadır (Gün, 2009).

Biyofilmler gıda endüstrisinde hijyenik açıdan sorun oluşturmaının yanı sıra gıdaların raf ömrünü azaltması nedeni ile ekonomik kayıplara da neden olmaktadır. Manijeh ve ark.'nın çalışmasında *S.Enteritidis*'in çelik, cam ve polietilen yüzeylere adezyonundan sonra 2., 4., 8., 16. ve 20. saatlerde oluşturduğu biyofilm yapısı incelenmiştir. Mikroorganizmanın her üç yüzeyde de biyofilm yaptığı ancak 2 saat sonra cam ve çelik yüzeylerde oluşturduğu biyofilmin polietilen yüzeye göre daha kuvvteli olduğu izlenmiştir. Çalışma sonuçları biyofilm oluşumunda bakteri hidrofobisitesi yanında yüzey özelliklerinin de önemli olduğunu göstermiştir (Manijeh, 2008).

Salmonella spp. ile kontamine yemler, hayvanlarda ve takibende bu hayvan ürünlerini tüketen insanlarda *Salmonella* enfeksiyonu riski oluşturmaktadır.

Biyofilm içerisindeki bakteriler, konakçı immün yanıtına daha güçlü bir şekilde karşı koyabilmekte, planktonik bakterilere oranla antibiyotiklere daha yüksek düzeyde direnç gösterebilmektedirler. Biyofilmler ayrıca kronik enfeksiyonların sürekliliğinde de rol oynamaktadır. Antibiyotik dirençliliğinde biyofilm mekanizmaları farklılık göstermektedir. Bu mekanizma; antimikrobiyel ajanların biyofilmin derinliklerine nüfuz edememesiyle ilgilidir. Biyofilmlerde olduğu gibi polimerik matriksler, antibiyotiklerin difüzyonunu engellerler ve genelde antibiyotikler sudaki hallerinden daha yavaş oranlarda biyofilmler içerisinde difüze olurlar.

Salmonella'ların insanlarda safra kesesinde asemptomatik taşıyıcılık durumunda kalabildikleri bilinmektedir. Safra taşı olan bireylerin tifo taşıyıcısı olma ihtimallerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda safra taşı olan *S.Typhi* taşıyıcılarında antibiyotik tedavisinde etkisiz kalmaktadır (Prouty ve ark, 2002). Sistemik tifo enfeksiyonları sırasında *S.Typhi* safra kesesine ulaşarak aku aktif enfeksiyon (kolesistit) oluşturabilmektedir. Akut tifo geçiren bireylerin % 2-5'inin dışkılarından yaklaşık bir yıl süre ile *S.Typhi* izole edilebilmektedir. Safra kesesi taşının esas yapısını kolestrol oluştururken safra kanalında oluşan taşlar kalsiyum bilirubin at ağırlıklıdır. Safra taşı olan kronik tifo taşıyıcıları aynı

zamanda safra kesesi karsinomunda içeren hepatobiliyer hastalıklara yakalanma açısından 8,47 kat daha fazla risk taşımaktadırlar. *Salmonella*'ların safra taşları üzerinde oluşturduğu biyofilm yapısı safra kesesi taşıyıcılığında rol oynamaktadır (Prouty ve ark, 2002). Yapılan değişik çalışmalarda safra taşı üzerinde etkili bir biyofilm yapısı, ortamda safra varlığı durumunda gerçekleştiği gösterilmiştir.

2.7.1. Biyofilm İçerisindeki Hayat Döngüsü

2.7.1.1. Tutunma ve Kolonizasyon

Biyofilm oluşumunun ilk aşaması; bakterilerin uygun bir yüzeye tutunmalarıdır. Biyofilm oluşumu ve bakterilerin yüzeylere bağlanma düzeyi, ortamın pH'sı ve sıcaklığı, bakteri türü, bakteri hücre duvarının yapısı (gram pozitif veya gram negatif oluşu) bakteri sayısı, bağlandığı yüzeyin özellikleri, hücre hareketliliği, ortamdaki besin maddelerinin içeriği ve miktarı, iyon konsantrasyonu gibi birçok faktörler ile değişebilmektedir.

Herhangi bir yüzeye etkileşime girecek olan bakteriyel hücreler tutunmadan önce yüzey boyunca hareket ederler. Yüzeye etkileşimden sonra aynı türe dahil bakteriler bir araya gelip mikrokoloniler oluşturabilmek için tek tabakalı hücre hatları oluştururlar. Biyofilmler, aynı türden bakterilerin bir araya gelmeleriyle oluşabileceği gibi, farklı türden bakterilerin bir araya gelmesi halinde daha karmaşık bir yapıda olabilirler. Tutunma aktif bir süreç olup, bakterinin yüzeye ve diğer bakterilere geri dönüşümlü bir biçimde bağlanabilmesi için gerekli olan hücre dışı polimerlerin sentezini gerektirir

Bakterilerin geri dönüşümlü bir biçimde bağlanmalarının ardından bakteriyel hücreler çoğalır ve ekzopolisakkarit (EPS) üretirler (Kumar ve Anand, 1998). Biyofilmler, elastiki davranış sergileyen yüksek derecede esnek yapılardır (Stoodley ve ark, 2002). Bakteriyel türlere bağlı olarak biyofilmler; % 10- 25 bakteri hücrelerinden ve % 75-90 ekzopolisakkarit matriksten oluşur.

Biyofilm oluşumu bakterinin bir yüzeye tutunduktan sonra sümüksü, yapışkan bir madde salgılaması ve bu maddenin metal, plastik, tıbbi implant yüzeyi veya insan, hayvan dokusu gibi canlı veya cansız yüzeyler üzerinde kolonize olmasıyla başlar. Önce yüzeye tutunma Van der Waals bağları gibi geri dönüşümlü, zayıf bağlarla gerçekleşir. Bakteriler bu fazda durulama gibi basit yıkama işlemleri ile kolayca uzaklaştırılabilirler. Bu süreçte, bakteri kolonileri yüzeyden uzaklaştırılmazlarsa, yüzeylerindeki hücresel adhezyon molekülleri ve

proteinleri vasıtasıyla tutunmayı daha kalıcı ve kuvvetli bir hale dönüştürür. Hücre adhezyonu ile diğer hücrelerde bağlanırlar. Bir matriks yapısı oluşturup, bir arada kalacakları biyofilm dokusunu şekillendirirler (Dolapçı, 2013a).

Biyofilm oluşumu esnasında birçok gen aktivitesinde değişiklik gelişir. Genlerin aktivasyonu patojenleri içine hapsederek koruyan hücre dışı matriks yapısının sentezlenebilmesi için gereklidir. Belirgin oranda fazla eksprese edilen genlerin, aminoasit metabolizması, hareket, stres toleransı ile ilgili oldukları gözlemlenmiştir. Mikroorganizmalar organik materyale ilk önce geri dönüşümlü olarak ve daha sonrada kamçı ve fimbriaları vasıtasıyla geri dönüşümsüz olarak bağlanırlar. Mikroorganizmaların çevresindeki besin maddeleri sınırlandığında da alt tabakaya tutunurlar. Biyofilm tabakasında bulunan hücreler eğer besin maddesi yokluğundan ölecek olurlarsa bu takdirde biyofilm tabakası yerinden sökülebilir. Bu durum ortamdaki hücre sayısında azalma sonucunu doğurur.

2.7.1.2. Büyüme ve Gelişme

İlk kolonizasyondan sonra, biyofilm yapısı, hücrelerin bölünmesi ve bir araya toplanması ile büyümeye başlar. Biyofilm şekil ve boyutlarını değiştirerek gelişir. İçeride besin dolaşımını sağlayan kanallar oluşur. Biyofilmler kendi metabolizmalarını geliştirirler. Farklı yönlerde doğru büyürler. Semptomlar oluştururlar (Dolapçı, 2013a). Biyofilm gelişimi taze besiyeri sağlandıkça devam eder. Ancak ortamdaki besin maddeleri tükenince yüzey bağlantıları zayıflar ve planktonik modlarına geri dönerler. Açlık durumu hücrelerin yeni taze besin kaynakları aramalarını, ortamlara daha iyi adapte olmalarını ve yayılmalarını sağlar.

Biyofilmler sıklıkla mantar benzeri yapılar sergilerler. Bu yapının baş kısmında hücresel yoğunluk sap kısmına oranla daha fazladır (Costerton, 1999). Olgun biyofilmlerin üç boyutlu yapılarında bakteriyel kümeler arasında su dolu kanallar bulunmaktadır, bu su dolu kanallar primitif bir dolaşım sistemine analog olacak şekilde metabolik süreçlerde üretilen toksik maddelerin atılmasında ve besinsel öğelerin alınmasında görev yapar.

Tutunmadan sonra mikrokoloniler, biyositlere dirençli ekzopolisakkarit kaplı komüniteler halinde farklılaşırlar. Gram negatif bakterilerde yeter sayı algılama (Quorum Sensing) çalışmaları bakterilerce salınan asilhomoserin lakton sinyallerinin kritik hücresel yoğunlukta, spesifik bazı genlerin ifadesini teşvik ettiğini göstermiştir.

2.7.1.3. Hareket

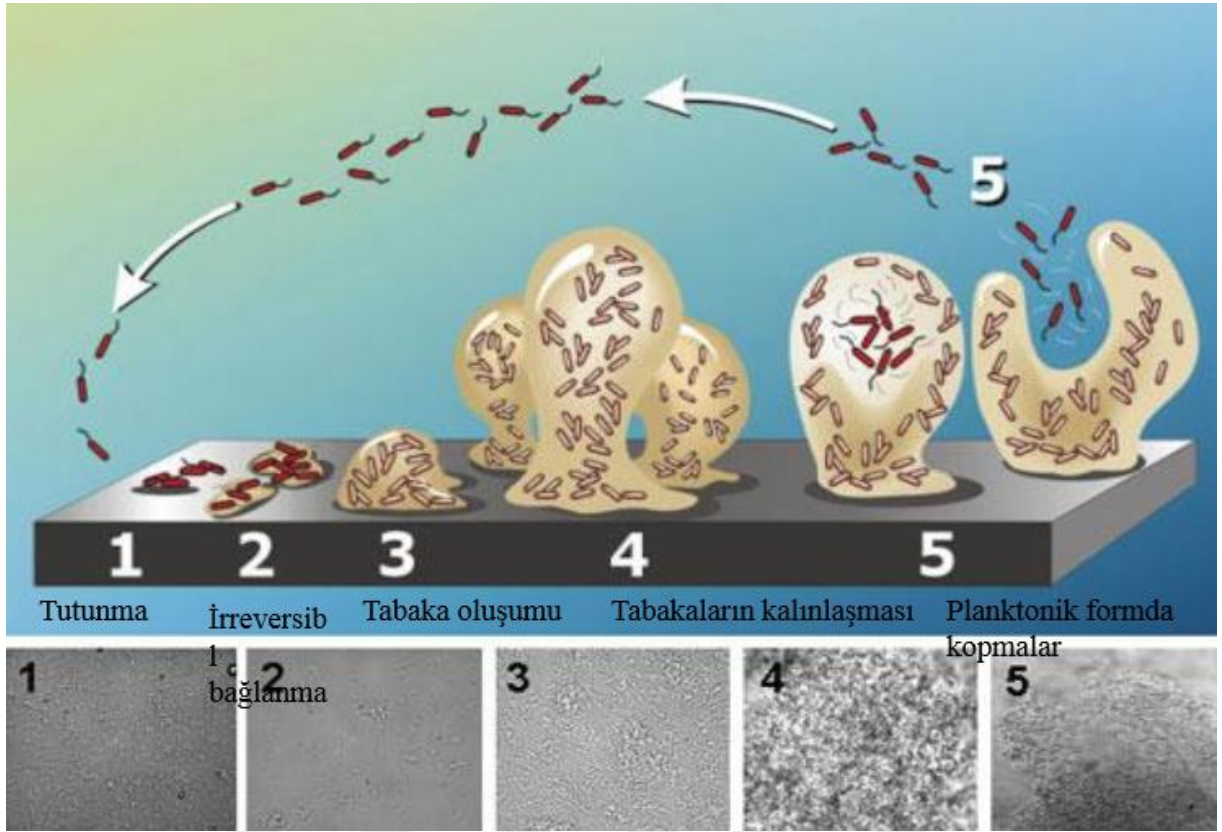
Biyofilm bakterileri; dalgalanma, yuvarlanma hareketleri veya kümeler halinde kopup kayarak yüzey üzerinde topluca hareket edebilirler.

2.7.1.4. Ayrılma ve Eksternal Kolonizasyon

Biyofilm oluştuktan sonra, belli aralıklarla biyofilmden planktonik bakteriler kendi kendilerine ayrılmaya başlarlar. Bu kopan bakteriler, hızla çoğalırlar ve yeni biyofilmler oluşturmak üzere yayılırlar. Biyofilm gelişiminin kopma veya ayrılma evresinde tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum basamağının bir parçası olarak tek bir hücrenin veya çoklu hücrelerin kopmasının bir sonucu olabilir.

Biyofilm içerisindeki bakteriler bir matriks yapısı ile korundukları için, konak bağışık yanıtından kaçmaktadırlar. Biyofilmden düzenli olarak planktonik bakteri salınımı oluyorsa, bağışıklık sistemi bu bakterilerini varlığından haberdardır. Bu durum kronik enfeksiyonların nedenini açıklamaktadır (MPKB, 2015).

Eğer bir bakteri üzerinde yaşadığı konağı öldürürse, kendisininde yaşayacağı yer kalmamaktadır. Dolayısıyla bir enfeksiyonun kronik formu bakterilerin aslında işine gelmektedir.



Şekil 3. Biyofilm oluşma basamakları (Birbirini izleyen 5 evre) (Stoodley ve ark, 2002)

2.7.2. Biyofilmlerin Avantajları

Biyofilm, bakteriyi konak bağışık yanıtından kaçırmanın yanı sıra antimikrobiyal tedaviye karşıda koruyarak, üstünlük kazandırmakta, aynı zamanda üyelerine besin maddelerine kolay ulaşım imkanı sunmaktadır. Bu yolla bakteriler vücudun doğal bağışıklığının bir parçası olan salgılara ve enzimlere de direnç gösterirler. Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarit matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve humoral immun sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur. Antimikrobiyal ajanın biyofilm matriksinden geç penetrasyonu, biyofilm içindeki mikroorganizmaların değişmiş üreme hızları ve dirençli fenotip alt topluluklarının varlığı bu dirençten sorumludur. Biyofilmden dışarı salınan planktonik hücrelerin tekrar hızla antimikrobiyallere duyarlılık kazanmaları, biyofilm içindeki direncin mutasyon veya horizontal gen transferi ile olmadığını göstermektedir (Gün ve Ekinci, 2009).

2.7.3. *Salmonella* 'larda Biyofilm Oluşumu

Salmonella Typhimurium'da ve yakın ilişkili bakterilerde, flagellar hareket, pilus ve kolanik asit, lipopolisakkarit, ortak enterobakteriyel antijen lipid II ve selüloz sentezi ile ilgili yapısal genler, çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumuna katılmaktadırlar (Solanove ark, 2002; Boddicker ve ark, 2003). Ozmolarite ve zar stresini algılayan sensörler tarafından sağlanan hareketlilikle, karbon depolama regülatörleriyle ve polimer matriks senteziyle ilgili düzenleyici proteinler, biyofilmin oluşumu ve dağılımında rol oynarlar (Solanove ark, 2002; Boddicker ve ark, 2003; Gerstel ve ark, 2003). *Salmonella* Typhimurium'un epitel hücrelerinde biyofilm geliştirmesi için şart olan kapsüller, hücre dışı polisakkarit yapısındaki kolanik asitin, cansız yüzeylerde gelişen *Salmonella* biyofilmleri için gerekli değildir.

Salmonella Typhimurium'un *barA/sirA* ortologlarının *E. coli* ve *Pseudomonas*daki etkinliği bilinmekle birlikte *Salmonella*'daki biyofilm oluşumuna katkıları henüz belirlenmemiştir (Teplitski ve ark, 2004). *barA /sirA* önemli bir virulens, hareketlilik ve biyofilm oluşumu regülatörüdür. *Salmonella* Typhimurium ortologları olan *barA/sirA* komponentleri, γ - Proteobacteria grubu bakterilerde biyofilm oluşumu ve virulens özelliğinin gelişimi için önemlidir. *Salmonella* Typhimurium'da *SirA*, karbon depolama regülasyonundan sorumlu RNA'lar olan *crsB* ve *csrC*'yi ve virulens genlerin regülatörleri olan *hilA* ve *hilC*'yi aktive eder. Regülatör RNA'lar virülens genlerinin translasyonuna izin vererek ve flagellar genlerin translasyonunu inhibe ederek etkili olurlar. Bu anlamda *sirA* ve *csr* sistemi aynı zamanda tip I fimbriyayı kodlayan fim operonunu da kontrol etmektedir. Diğer bakteriyel türlerdeki *sirA* ortologlarının ve *Salmonella* Typhimurium'daki fim operonunun biyofilm oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir. *Salmonella* Typhimurium'un tüm üyelerinde *sirA* regülasyonunun biyofilm oluşumu üzerine etkisi in vitro koşullarda belirlenmiştir. *sirA* mutanti, *csrB* ve *csrC* ikili mutantları ve fimI mutantlarının biyofilm oluşturma yeteneklerini kaybettiği belirlenmiştir. *sirA*, biyofilm oluşumunu başlatmak için *csrB*, *csrC* ve fim operonlarını aktive etmektedir. *csrB* ve *csrC*, fim operonunu translasyonunu yönetirken, aynı zamanda biyofilm oluşumunu inhibe eden flagella translasyonunu engellemektedir (Teplitski ve ark, 2006). *sirA* üç parçalı histidin sensör kinaz *barA* tarafından fosforile edilen FixJ ailesinin yanıt regülatörüdür (Teplitski ve ark, 2004; Tomenius ve ark, 2005). *sirA*'nın *barA* tarafından fosforile edilmediği durumda, *sirA* hücrel asetil fosfat havuzundan aktive edilir (Lawhon ve ark, 2002; Tomeniusve ark, 2005). *barA/sirA* sisteminin ortologları *E. coli*'de, *Salmonella*'da, *Pseudomonas*'ta ve *Vibrio spp.*'de, flagellar gen ifadesinin (*flhDC*)

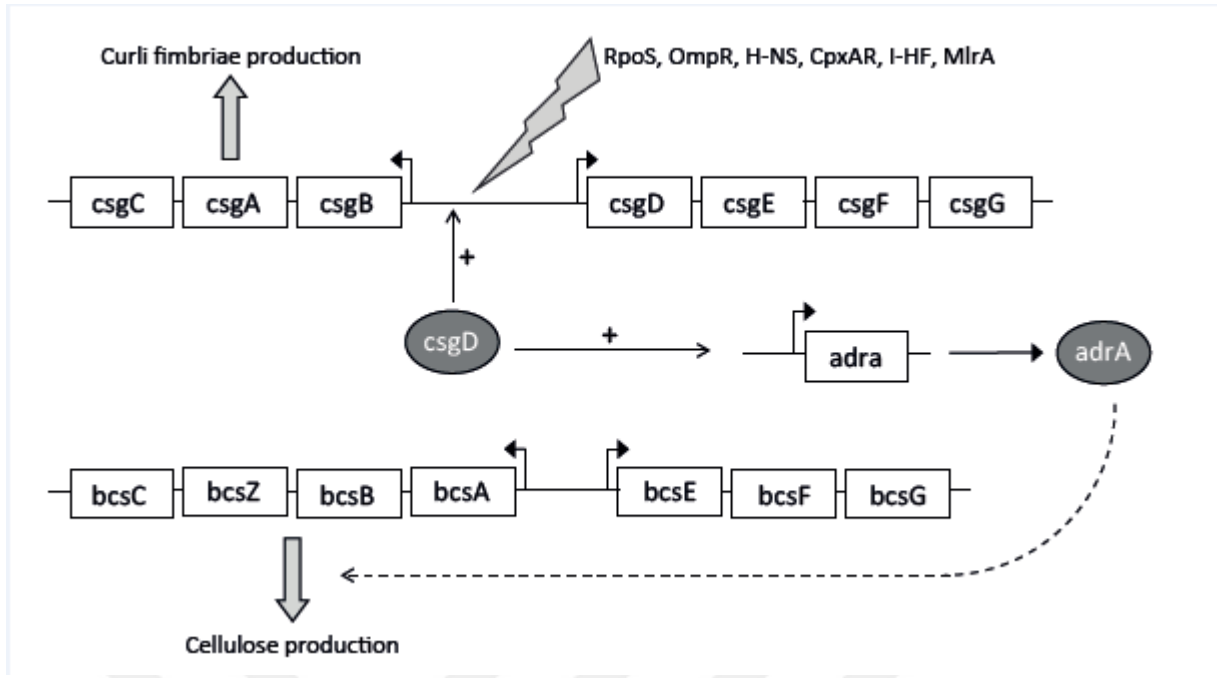
regülasyonuna ve bakteriyel hareketliliğe katkı sağlar. flhDC promotorunun transkripsiyonu, Crp, OmpR, H-NS, HdfR, OseBC, FliA ve LrhA sistemleri ve DNA süpersarmallaşması, sıcaklık, gelişme fazı, hücre döngüsü kriterlerine bağlı olarak regüle edilir. Bu genin ürününün post transkripsiyonel regülasyonu flhDC-Csr sistemi ve ClpXP proteazı tarafından denetlenir. csr sistemi, RNA-bağlanma proteini olan csrA ve küçük regülatör RNA'lar olan *csrB* ve *csrC*'den oluşur. *csrA* dışında *csrB* ve *csrC*'nin transkripsiyonu, *E. coli* ve *Salmonella*'da *barA/sirA* ortologlarının kontrolü altındadır. *csrA*, 61 amino asitlik bir protein olup hedef genlerin mRNA'larına bağlanır. Bu bağlanmayla mesaj ortadan kaldırılabilir, translasyon sürecine dahil olabilir ya da ifadesi engellenir. *E. coli*'de *csrA*, biyofilm oluşumunu ve ekzopolisakkarit sentezini uyarırken, glikojen metabolizmasını ve glukoneogenezisi inhibe eder (Suzuki ve ark, 2002). *csrA* proteinin aktivitesi, küçük düzenleyici *csrB* ve *csrC* RNA'ları tarafından engellenir. *csrB* molekülü, 18 adet *csrA* proteinine bağlanırken; *csrC* 9 adet *csrA* proteinine bağlanır. *csrA*'nın *csr* RNA'ları ile olan etkileşimi *Salmonella Typhimurium*'da tanımlanmamıştır. Ancak *E. coli*'de *csrA*, *csrB* ve *csrC* genlerinin hareket, karbon depolanmasında, virulens ve sekonder metabolizmanın denetlenmesinde önemli rolleri vardır (Fortune ve ark, 2006). Diğer yandan evrimsel olarak korunmuş *csr* genlerinin kontrolünde *Salmonella SirA* regülasyon sistemi, aynı zamanda yatay gen transferiyle kazanılmış virulens genleri de regüle eder. Virulens genlerinin ifadesinin etkilenmesi için fosforile edilmiş *sirA* doğrudan virulens regülatörleri olan *hilA* ve *hilC*'nin kodlandığı *Salmonella* patojenite adasını uyarır (Teplitski ve ark, 2003). *HilA*, 21 SPI-1'in büyük bir regülatörü olup *prgH* ve *invF* operonlarınca kodlanan tip III salgı sistemini doğrudan aktive eder. *invF* kontrollü *sic/sip* operonlarıyla birlikte *sipBCD*, salgılanan efektörleri kodlar ve bu proteinler hedef hücre membranı üzerinde translokaz kompleksi oluşturur. *barA* ve *SirA*'nın tip I fimbriyayı kodlayan *fim* operonunu regüle ettiği gösterilmiştir. Tip I fimbriya *Salmonella* biyofilm oluşumunda önemlidir (Boddicker ve ark, 2002). Bundan dolayı *sirA/barA* regülunun tüm bileşenlerinin *Salmonella*'da biyofilm oluşumundaki etkileri incelenmiştir. *sirA*, *barA*, *csrB*, *csrC* ve tip I fimbriya plastik yüzeylerde biyofilm oluşumu için gereklidir. Flagellayı elimine eden tersine mutasyonlar biyofilm oluşumunu artırır. *sirA-P* doğrudan *fimA* promotoru ile etkileşim içerisindedir (Teplitski ve ark, 2006). *sirA* regülunun genlerindeki mutasyonlar biyofilm oluşumunu etkiler. γ - proteobakteriler için *barA/sirA* ortologları hareket, virulens ve bazı durumlarda biyofilm oluşumu için gerekli genleri kontrol etmektedir (Teplitski ve ark, 2004). Ancak *barA* ve *sirA*'nın *Salmonella Typhimurium*'daki biyofilm oluşumundaki rolleri henüz bilinmemektedir.

Doğal tip *Salmonella* Typhimurium biyofilmleri, kuyuların tabanında ve plağın çeper kısımlarındadır. Doğal tip suş, aynı zamanda plastik yüzeylerin üst kısımlarda kolonize olmakta ve biyofilm oluşturmaktadır; ancak *sirA* mutantlarında biyofilm oluşumunun 3-5 kat azaldığı saptanmıştır. *sirA* mutantları, kuyuların çeper kısımlarında bakteriyel hücrelerden oluşan ince bir halka meydana getirmekte ve kuyunun tabanında saptanabilir bir biyofilm oluşturmamaktadır. *sirA*'nın ifadesinin regülasyonundan sorumlu *barA* geninin delesyonu aynı şekilde biyofilm oluşumunu azaltmaktadır. *sirA* mutantına benzer şekilde, *barA* mutantlarındaki biyofilm oluşumunda da kuyuların menisküs kısmında ince bir hücresel halka oluşumu karakteristiktir. *Salmonella* Typhimurium'da *barA/sirA*, SPI-1, SPI-4 ve SPI-5 üzerinde lokalize olan yatay olarak kazanılmış 22 virulens genlerini, SPI-1 üzerinde lokalize olmuş *hilA* geni aracılığıyla kontrol eder. SPI-4 ya da SPI-5 içindeki herhangi bir mutasyon, biyofilm oluşumunu değiştirmez. Ancak SPI-1 regülatörü olan *hilA* içindeki bir MudJ insersiyonu, biyofilm oluşumunu 1,5-2 kat artırır. Benzer şekilde SPI-1 içerisindeki tip III salgı sistemi genlerinin delesyonu ya da *sipB*'nin ifadesinin ortadan kalkması (tip III translokaz kompleksinin bir parçası) aynı şekilde biyofilm oluşumunu artırır. Bu sonuçlar SPI-1 tarafından kodlanan TTSS'nin, biyofilm oluşumuyla ya da test edilen koşullarda biyofilm oluşumunun azaltılarak regüle edilmesiyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Küçük düzenleyici RNA'lar olan *csrB* ya da *csrC*'nin ifade edilmemesi biyofilm oluşumunu azaltır. Bunun yanında ikili *csrB/csrC* mutanti biyofilm oluşum kabiliyetini önemli ölçüde azaltmaktadır. Benzer şekilde *sirA*'nın plazmid üzerinde düşük kopya sayılı üretimi, *csrB/csrC* ikili mutantlarında biyofilm oluşumunu yenileyememektedir. Bu sonuçlar, hem *sirA* hem de *csrB* ve *csrC*'nin biyofilm oluşumu için gerekli olduğunu gösterir. *sirA* protein aktivasyon için, düzenleyici RNA'lar ise translasyon için gereklidir (Teplitski ve ark,2006). *csrA* proteini, biyofilm oluşumu için gereken proteinlerin translasyonunu önler ya da proteinlerin parçalanmasına yol açar. *csrB* ve *csrC* RNA'larıysa, *csrA*'ya antagonistik etki göstererek bu durumu tersine çevirmektedir. Bununla birlikte *SirA*'nın bir geni aktive edebilmesi için, *csrB* ve *csrC*'nin translasyona izin vermesi gerekmektedir. Bu modelin teşkil ettiği temele göre *csrA* mutantlarında, *sirA* ya da *csrB/csrC* mutantlarına nazaran daha fazla biyofilm oluşumu gözlenir(*flhDC* mutantlarında olduğu gibi). *E. coli*'de *csrA* mutantları iyi bir şekilde gelişirken *Salmonella* Typhimurium'un *csrA* mutantları zayıf bir şekilde gelişmektedir. Ayrıca bu mutantların baskın mutasyonları hızlı bir şekilde biriktirdiği belirlenmiştir (Altier ve ark, 2000). *csrB* ve *csrC*'nin yüksek ifadesi, *csrA* proteininin miktarını dengeleyip bu proteinin fonksiyonunu azalmaktadır. Ancak *csrB* ya da *csrC* genlerinin fazla sayıda kopyasını bulunduran *Salmonella* Typhimurium suşları *csrA*

mutantlarında olduğu gibi çok yavaş çoğalmaktadır. Flagellar regülatörler *Salmonella Typhimurium*'da biyofilm oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Flagellar regülön, *barA/sirA* ve *csr* sistemleriyle düzenlenmektedir. *flhDC* regülatörü, flagellar regülasyon çağlayanının en üst noktasındadır. *flhD* ve *flhC* genlerinde meydana gelen mutasyonlarda biyofilm oluşumunda yaklaşık olarak 5 katlık bir artış meydana gelmektedir. Ayrıca, *sirA* ve *flhD* ya da *sirA/flhC* ikili mutantlarında biyofilm üretimi azalmaktadır. *Salmonella flhD* ve *flhC* mutantlarının tutunma karakteristikleri doğal tiplerdeki farklıdır. Doğal tipin aksine *flhD* ve *flhC* mutantları kuyuların çeper kısmında sıkı şekilde tutunan bakterilerin oluşturduğu halka yapısını ve kuyunun üst kısmında görülebilen bakteri kolonisi oluşturmaz. *flhD* ve *flhC* mutantları kuyuların taban kısmına çok sıkı bir şekilde bağlanırlar. Uzun süreli inkübasyonda (beş günlük) doğal tip bakteriler kuyunun tabanında kalın, gevşek bir biyofilm oluştururken, *flhD* ve *flhC* mutant hücrelerinin çoğu kuyunun duvarlarına bağlanacak şekilde taban kısmında ince bir biyofilm meydana getirirler. *flhDC* fenotipinin ileri analizi için flagellanın varlığında hareket, kemotaksi ya da *flhD*'nin hareketten bağımsız düzenleyici fonksiyonları, biyofilm kontrolü açısından test edilmiştir. Çalışmada kullanılan bütün hareketsiz suşlar (*csrA*, *flhD*, *flhC*, *fliF*, *fliA*, *cheZ*, *motA* ve flagellasız *fliB/fliC* ikili mutantları) doğal tiplerden farklı olarak biyofilm oluşumunda farklı kabiliyetler göstermişlerdir. Bunlardan *csrA*, *E. coli*'deki *flhDC* mRNA'sına doğrudan bağlanmakta ve mRNA'yı regüle ederler (Wei ve ark, 2001). Diğer mutasyonlar (*flhD*, *flhC*, *fliA*, *cheZ* ve *motA*) *flhDC* regülonuyla ilgilidir. Alternatif bir sigma faktörü kodlayan *fliA*'da meydana gelen bir mutasyon *flhD* mutasyonunda olduğu gibi biyofilm miktarını artırır. *fliF*'yi kısıtlayan mutasyon (*fliF* mutantları motor aparata sahip olup, yüzeyde flagella bulundurmaz) aynı şekilde doğal tiptekinden daha fazla biyofilm üretimine yol açmaktadır. Flagellin üretimi kısıtlanmış; fakat flagellar salgı makinesine sahip ikili *fliB/fliC* mutantında biyofilm artışı görülür. *fliF* ve *fliB/fliC* mutantlarının her ikisi de, *flhD* ile *fliA* mutantlarına benzer şekilde, kuyuların çeper kısmında sıkı bir halka yapısı oluşturmadan ya da çeperin yukarı kısımlarında kolonize olmadan tutunur. Paralize flagella bulunduran *motA* mutantının ve flagellalı; fakat kemotaktik olmayan *cheZ* mutantı doğal tiptekinden daha az biyofilm oluşturmaktadır. Bu mutantlar, sadece çeper kısmında ince bir halka oluştururken çeperin aşağı ve yukarı kısımlarında kolonize olamazlar. Bu bulgular flagellanın bakterinin yüzeyinde fonksiyonel olsun ya da olmasın biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini göstermektedir. Flagellanın kaybı, biyofilm oluşumunu artırır. Fonksiyonel olmayan flagellalı mutantların (*motA*) ya da kemotaktik hareket yapamayan mutantların (*cheZ*) fonksiyonel flagellalı doğal tiplere kıyasla daha az biyofilm oluşturmaktadır. Küçük düzenleyici bir RNA olan *csrC*, *Salmonella*'nın hareketlilik ile ilgili genlerini düzenler. *csrC*

post-translasyonel regülasyon sisteminin bir parçası olup SPI-1 üzerindeki virülens genlerinin regülasyonu da ilgilidir (Teplitski ve ark, 2006). *Salmonella Typhimurium*'da *sirA*'nın flagellar genler üzerinde dolaylı bir etkisi vardır ve bu etki *csrA*'nın antagonistiği olan *csrB*'nin aktivasyonu ile ilişkilidir (Teplitski ve ark, 2003). *csrC*'nin fonksiyonu, *csrB*'ye benzer ve *csrC*, *flhDC*'nin ifadesini baskılayarak biyofilm oluşumuna katkıda bulunur. *csrB/csrC* ikili mutantları, *flhDC* fenotipinin ifadesini artırarak biyofilm miktarını artırır. *sirA/flhD* ya da *flhC/sirA* ikili mutantlarında *flhDC* fenotipinden ziyade, *sirA* fenotipi görülmektedir.

Birçok *Salmonella* serovaryetesi hücre dışı matriks bileşenleri olan; selüloz ve kıvrımlı fimbriyalarla karakterize edilmiş çok hücreli bir davranış durumu sergilemektedir (Romling, 2005). Çok hücreli davranış biçimi, *csgD* (ince agregatif alt ünite geni) tarafından pozitif şekilde regüle edilir. *Salmonella* 'da biyofilm bileşeni olarak önemli bir rol sergileyen selüloz, bakteriyel selüloz sentez operonu olan *bcsABZC* ve selüloz biyosentezinin aktivatörü olan *adrA* operonunun ifadeleriyle düzenlenir. *csgD*, selüloz biyosentezini dolaylı bir şekilde *adrA* aracılığıyla yapar. c-di-GMP'nin üretiminin uyarılması *adrA* tarafından gerçekleştirilir ve c-di-GMP *bcsB* alt ünitesine bağlanıp, selüloz üretimini başlatır. Selüloz kompleksi *bcsA* ve *bcsB* tarafından oluşturulurken *bcsZ* selülaz vazifesi görür. *csgD* kıvrımlı fimbriyanın sentezine de katılır ve promotora bağlanarak *csgBAC* operonunun transkripsiyonunu başlatır (Romling, 2005). Hem selüloz hem de ince agregatif fimbriyaların üretimini ayarlayan transkripsiyonel düzenleyici *csgD* proteinin ekspresyonu, besin, oksijen basıncı, ısı, pH, etanol ve ozmolarite gibi çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Bu protein eksprese edilmediği zaman yumuşak ve beyaz koloniler izlenmekte ve bu morfotipteki *Salmonella* 'lar hücre dışı matriks yapısı salgılayamamaktadır. *Salmonella Typhimurium* ve *Salmonella Enteritidis* ile yapılan çalışmalarda suşlarının çoğunun 28°C 'de *rdar* morfotipi gösterdiği ancak, 37°C'de nadiren bu morfotipte bulundukları ortaya konulmuştur.



Şekil 4. *Salmonella* biyofilminin önemli bir parçası olan selülozun biosentezinin aktivatörü *adrA*'nın ve onun üzerinden *csgD*'nin etkileri (Greetje, 2013)

Salmonella Enteritis'in biyofilm oluşturmada gerekli olan bir diğer matriks bileşeni, geniş hücre-yüzey proteini olan *bapA* dır. Bu protein hücre yüzeyine gevşekçe tutunmaktadır.

Salmonella'da selüloz biyosentezi ve ince agregatif fimbriya (Tafi) sentezi sıklıkla birlikte olur. Bu ince agregatif fimriyalar selülozun oluşturduğu elastik ve stabil bağların aksine hücreler arasında katı ve kırılabilir bağlar kurar. Biyofilm yapılarında ince agregatif fimbriya ve selüloz bulunduran bakteriler, sıvı kültürlerde sıvı-hava ara fazının hemen altında, çözülmesi son derece güç biyofilmler oluştururlar. Ekzopolisakkarit olarak yalnızca selüloz sentezleyen bakterilerin sıvı-hava ara fazındaki biyofilmleri gevşek bir yapı gösterir. Bu iki bileşenle birlikte bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerde inert hidrofobik bir matriks meydana gelir. Bu durum *Salmonella*'nın tek hücreli yaşam formundan farklı olarak çok hücreli bir yaşam formu sergilemesine olanak sağlar (Romling, 2002). *Salmonella* Enteritidis'te selülozun biyofilm oluşumundaki kritik rolünün anlaşılması için önemli çalışmalar yapılmıştır. *Salmonella* Enteritidis farklı koşullar altında ve farklı yapıya sahip materyaller üzerinde biyofilm oluşturabilen gıda kaynaklı önemli bir enterik patojendir.

Curli fimbria da denilen, ince, agregasyon (yığılma) yapıcı fimbriyalar ve selüloz, *Salmonella* biyofilmlerinin iki ana matriks bileşenidir. Bu iki bileşen birlikte sentezlendiklerinde Congo Red agar üzerinde karakteristik 'rdar' (red, dry and rough/ kırmızı, kuru ve düzensiz) morfolojideki kolonilerin oluşumuna neden olurlar. Bu ince fimbriyalar ve

selülozun bir arada eksprese edilmeleri durumunda, hücreler sert bir matriks yapısı içinde bir araya toplanarak, yüksek hidrofobik bir ağ oluştururlar ki bu da biyofilm oluşumunu artırır. Selüloz kıvrımlı *Salmonella* Enteritidis izolatları, *Salmonella* Typhimurium'da da gösterildiği gibi çok hücreli ve agregatif bir davranış sergileyebilirler. Bu davranış biçimini karakterize eden koloni morfoloji rdar'dır (kırmızı, kuru ve pürüzlü). Bu morfoloji ilk olarak *Salmonella* Typhimurium'da tanımlanmıştır. Söz konusu morfoloji içeren suşlar, sıvı besiyerlerinde inkübe edildiklerinde sıvı-hava arafazında son derece sıkı bir pelikül yapısı oluştururlar. İnce agregatif fimbriyanın alt ünitesini (*agfA*) kodlayan genin baskılanmasıyla bu suşlarda elde edilen koloni morfoloji pdar olmaktadır (pembe, kuru ve pürüzlü). pdar kolonileri içerisindeki bakteriler elastik bir yapı oluşturarak bir araya gelirler. Ancak sıvı kültürlerde pelikül yapısı oluşturmazlar. Bu sonuçlar ince agregatif fimbriyanın *Salmonella* suşlarının oluşturdukları biyofilmlerde ne kadar önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Diğer yandan insersiyonel mutasyonla inaktif hale getirilen ve muhtemelen bir transmembran proteini kodlayan *adrA* geninde oluşan bir defekti taşıyan suşların oluşturduğu koloniler rdar morfoloji yerine bdar (kahverengi, kuru ve pürüzlü) morfoloji göstermektedir. Bu durumda görevi tam olarak anlaşılamayan ekstraselüler bileşenin yokluğu sıvı kültürlerde görülen pelikül oluşumlarının çok daha kırılgan olmasına yol açmaktadır (Romling, 2002). Çok hücreli davranış durumuyla ilişkili olan ve durağan gelişme fazında ifade olunan ince agregatif fimbriya, *agfD* tarafından pozitif şekilde regüle edilmektedir. *agfD*'nin delesyonu kırmızı, buruşuk, kuru ve yayılan bir koloni morfoloji olan rdar'ı beyaz ve düz bir koloni morfoloji olan saw morfolojisine çevirir. İlave olarak sigma faktör *rpoS* ve *ompR*'nin, *agf* operonlarının transkripsiyonu için gerekli olduğu anlaşılmıştır. *rpoS* aynı zamanda fonksiyonu tam olarak anlaşılamayan bir ekstraselüler maddenin üretimiyle de ilişkilidir.

Salmonella Typhimurium ile ilgili biyofilm çalışmalarının çoğu geleneksel bir metot olan rastgele transpozon insersiyon kütüphaneleri oluşturularak elde edilen mutantların sürdürülmüş genlerinden yola çıkılarak mikrotitre plak deneylerinde mutantların biyofilm oluşturma ve tutunma kapasitelerinin incelenmesine dayanır. Gram negatif bakterilerde yürütülen mutasyonel çalışmalarla elde edilen bu veriler, biyofilm oluşumunun flagellar hareketle, seğirme hareketiyle, ekzopolisakkaritlerin senteziyle, sayı algılama sistemiyle, dış membran adhezinleriyle ve gen ifadelerinin global regülatörleriyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Solano ve ark, 2002).

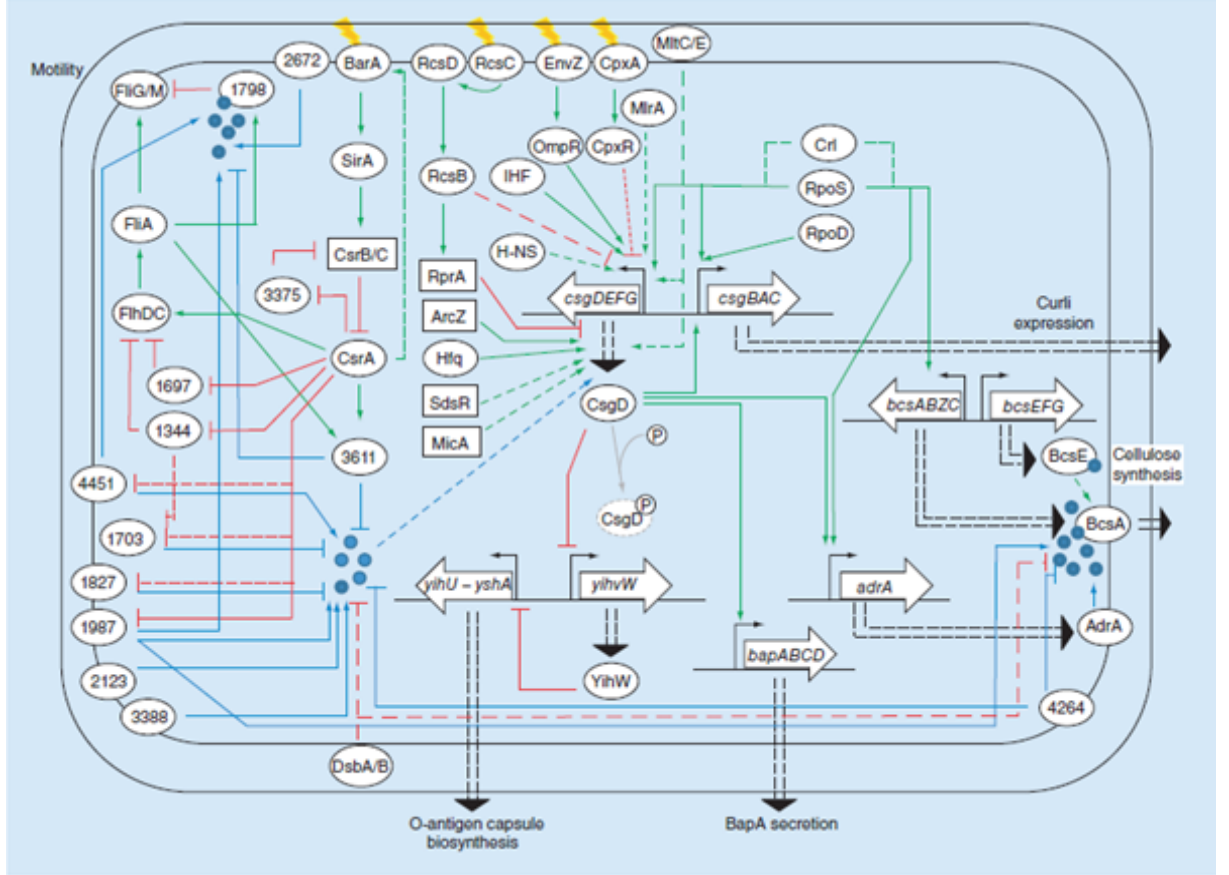
Salmonella Enteritidis'te polisakkarit, lipopolisakkarit, enterobakteriyel yaygın antijen, adhezinler, amino asit ve pirimidin biyosentezi, enerji metabolizması, regülasyon fonksiyonları ve hareketlilikle ilgili çeşitli yollarda meydana gelebilecek bir mutasyon

biyofilm ya da pelikül oluşturma kapasitesini etkilemektedir (Solano ve ark, 2002). Biyofilmlerde hücrel yoğunluk artışına bağlı olarak hücrelerin sinyalizasyonunda görev alan ve hormon benzeri bileşenleri düzenleyen yeter sayı algılama mekanizması, biyofilm süreci için son derece önemlidir. Bakteriler, bu sinyal moleküllerini komünitenin gen ifadelerini düzenlemek için üretir (Miller ve Bassler, 2001).

Yeter sayı algılama sistemi ilk kez *Vibrio fischeri*'de tespit edilmiştir. Bu bakteri bir lüsiferaz enzim kompleksi üretmektedir ve yüksek hücrel yoğunlukta bu kompleks yeter sayı algılama mekanizmasıyla düzenlenerek, bakteri komünitesinin biyoluminesans özellik göstermesine sebep olmaktadır. Yeter sayı algılama mekanizmasının birçok bakteriyel türde biyofilm gelişimiyle ilgili olduğu bilinmektedir. *Salmonella*'da üç tür sayı algılama mekanizması tanımlanmıştır. Bu mekanizmalar: N-asilhomoserin laktonlar (AHL), otoindükleyici-2 (AI-2) ve otoindükleyici-3 (AI-3) sistemleridir (Walters ve ark, 2006). *Salmonella*'da en iyi tanımlanmış sayı algılama mekanizmaları, AI-2 ve AHL sistemleridir. Otoindükleyici-2 (AI-2) yeter sayı algılama sistemi, *luxS* genini içeren bir sistemdir. Bu gen, *Salmonella*'yı da kapsayacak şekilde birçok bakteride tanımlanmıştır. *luxS* geni AI-2 üretimi için sorumlu olan proteini kodlar. Bu sistemin tanımlandığı tüm bakteriler AI-2 üretiminden sorumlu *luxS* genini ve AI-2'nin üretimini elimine eden genleri bulundurmaktadır. Bu sayı algılama sisteminde S-ribozil-homosistein, homosisteine ve 4,5-dihidroksi-2,3-pentandiona (DPD) çevrilir ve reaksiyon *luxS* proteini tarafından katalize edilir. Stabil olmayan DPD molekülü su ile reaksiyona girerek kendiliğinden şekil değişikliği geçirir ve böylelikle farklı AI-2 sinyal molekülleri oluşturulur. *luxS*/AI-2 sistemi çeşitli süreçlerle ilgili genlerin düzenlenmesinde sorumludur (örneğin; virulens, hareket ve biyofilm oluşumu). *Salmonella*'da AI-2 sistemi tarafından regüle edilen genler yalnızca *lrs* operonunu (ABC taşıyıcı sistemi) düzenleyen genlerdir. Bu sistem AI-2'nin alınmasında bir rol oynar (De Keersmaecker vd, 2006). AI-2'nin *Salmonella Typhimurium*'da daha çok rol üstlenmektedir. AI-2,*luxS* mutantlarıyla *Salmonella Typhimurium*'da birçok hücrel sürece dahil olmaktadır (Soni ve ark, 2008). İyi tanımlanan diğer bir yeter sayı algılama sistemi N-asilhomoserin lakton sistemidir (AHL). Bu sayı algılama sistemi *luxI/luxR* sistemi tarafından regüle edilir. N-asilhomoserin laktonlar *luxI*-tip proteini tarafından sentezlenir ve *luxR*-tip proteini tarafından saptanır (Taga ve ark, 2003).

Hedef gen AHL'ler bakteriyel membranlardan serbestçe geçerler ve bakterilerin yüksek hücrel yoğunluklarda bir araya gelmelerini temin ederler. *Salmonella*'nın *sdiA* adı verilen bir *luxR* homologuna sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle *sdiA*, diğer türlerden salınan AHL'leri saptamak için kullanır. *Salmonella*, *luxI* sistemine homolog bir sistem

bulunduramadığından AHL üretemez (Ahmer, 2004). Yeter sayı algılama mekanizması ve hücre dışı matriks bileşenlerinin üretimi arasında da bir bağ vardır. Biyofilm oluşumunun kalınlığının ve şeklinin tesisinde N-(3-oksododekanoil)-L-homoserinin etkileri matrikste önemli değişikliklere yol açar. Yeter sayı algılama etkisiyle sentezlenen rhamnolipid, biyofilm olgunlaşması boyunca su kanallarını açık tutarak biyofilm şeklinin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Branda ve ark, 2005).



Şekil 5. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium'un biyofilm oluşturma regülasyonu (Simm ve ark, 2014)

2.7.4. *Salmonella*'ların Biyofilm Oluşturmasında Etkili Hücresel Elemanları (Yüzey Eklentileri)

2.7.4.1. Flagella

Flagella, biyofilm gelişiminin başlangıç aşaması olan yüzeye bağlanmayı sağlayan hücresel elemandır. Flagellaların biyofilm oluşumundaki rolleri tutunulan yüzeye bağlı olarak değişkenlik gösterir. *Salmonella* Typhimurium'un flagella ekspresyonunun plastik kuyucuklarda ve cam yüzeylerde biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gösterilirken, kolesterol ile kaplı yüzeylerde ise biyofilm gelişimini sağladığı ortaya konulmuştur. Polivinil-klorür (PVC) materyaller üzerinde transpozon mutasyonu uygulamasıyla tip I pilus üretemeyen ya da hareketsiz suşların tutunamaması, hareketin ve pilusların biyofilm başlangıç safhasında önemli olduğunu göstermiştir. Biyofilm oluşumunun başlangıcında hücre-yüzey etkileşiminin gerçekleşebilmesi için tip I piluslara gereksinim duyulmakta, sonrasında biyofilmin yüzey boyunca yayılabilmesi için mikroorganizmanın flagellar hareket kabiliyeti sergilemesi gerekmektedir (Dolapçı, 2013b).

2.7.4.2. Fimbria

Fimbriyalar, çeşitli çevresel şartlarda üretilen ve bakterilerin aktif yüzey tutunmasında rol oynayan saç benzeri yapılardır. Bir ya da daha fazla protein monomerinden oluşan bu yapıların sentez yönü hücre yüzeyinden dışarıya doğrudur. Fimbriyalar ökaryotik hücrelerin yüzeyine, doku matriksine, serum proteinine ya da diğer bakterilere tutunma görevi görürler. Bu tutunma bakterilerin epitel yüzeyinde kolonizasyonu, konak hücreye giriş, konjugasyon ve biyofilm oluşumu süreçleri için mecburidir. (Akçelik ve Akkoç, 2010). *Salmonella*'nın genom dizi analizi sonucunda 13 farklı fimbriyal operon içerdiği belirlenmiştir. Ancak bunlardan yalnız iki adeti (ince agregatif fimbriya, *agf*, ve tip-1 fimbriya, *fim*) invitro koşullarda üretilip tanımlanabilmiştir. İnce agregatif fimbriyanın ana alt ünitesi olan *agfA* proteini fibronektine (epitel doku bağ proteini) spesifik olarak bağlanmakta ve TLR2 tarafından tanınmaktadır. Fim olarak adlandırılan fimbriyanın ana alt ünitesi (*fimH*) ise, eritrositler ve maya hücrelerinin yüzeyinde bulunan glikoproteinlerin içerdiği terminal alfa-D mannoz birimlerine bağlanmaktadır. Plazmid kodlu fimbriyanın *pefA* alt ünitesi(*pef*) Lewis kan grubu antijenine Gal s1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc (trisakkarit) özgül bağlanma göstermektedir. Uzun polar fimbriya'nın ise sadece heterolog konakta ifadesi örneklenmiş ve patojenin konak sistemde kalıcılığı

üzerinde roloynadığı tanımlanmıştır. Diğer dokuz *Salmonella* fimbriyasının invitro koşullarda üretilmemesi nedeni ile tutunma ve kalıcılıkta oynadıkları roller üzerinde bilgi bulunmamaktadır (Akçelik ve Akkoç, 2010).

Fimbriaların birçok mikroorganizmada biyofilmin başlatılması ve olgunlaştırılmaları aşamaları sırasında, mikroorganizmaların yüzeye ve birbirlerine tutunmalarına aracılık ettiği gösterilmiştir. Tip 1 fimbria yapısının aşırı ekspresyonu *Salmonella*'ların kolesterol kaplı yüzeylerde biyofilm oluşturmalarını inhibe ederken cam ya da plastik yüzeylerde oluşan biyofilmler bu durumdan etkilenmemektedir (Dolapçı, 2013a). Transpozon insersiyonu yöntemiyle elde edilmiş yüzeye tutunma yetersizliği gösteren *Pseudomonas fluorescens* suşlarında sad (yüzeye tutunma defekti) mutantları hareketsiz ve sitoplazmik bir proteazla ilişkili Clp yüzey proteinini üretilmediği halde biyofilm oluşturma başarısını göstermektedir. Çevresel sinyallerin değişmesine göre mikroorganizmalar biyofilm oluşumuna yönelebilmek için çok çeşitli stratejiler geliştirebilirler (Dolapçı, 2013a).

Gıda kaynaklı enterik patojen olan *Salmonella* Enteritidis aynı şekilde, biyofilm oluşumu için gereksinim duyulan pilusları bulundurmaktadır. Bu pilus, önceleri ince agregatif fimbria olarak adlandırılmaktaydı (güncel ifadeyle kıvrımlı fimbria) ve bu fimbriyanın ifade edilmediği mutant suşlarda, doğal suşlarda görüldüğü gibi yoğun biyofilm sentezi görülmemektedir.

Salmonella Typhimurium'un LT2 genomu, bazıları in vitro olarak eksprese edilmeyen, 13 fimbrial operonu kodlar (Dolapçı, 2013a).

2.7.5. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Çevresel Faktörler

Biyofilm gelişimi; bakteri hücresi, tutunulan yüzey ve bunları çevreleyen unsurlar olmak üzere üç ana faktöre bağlıdır. Biyofilmin ilk aşaması olan bakteri hücrelerinin yüzeye yapışması, hücre yüzeyinin fizikokimyasal özelliklerinden etkilenmektedir. Bu fizikokimyasal özellikler hücrenin hangi üreme fazında olduğu, kültür koşulları ve suş çeşitliliğini içermektedir. Birçok bakteri hücresinin yüzeyi negatif elektrik yüklüdür ve bu net negatif yük elektrostatik itici güçler nedeniyle bakterinin herhangi bir yüzeye yapışmasını engelleyebilmektedir. Bununla birlikte bakteriler yüzeylerindeki fimbria, flagella ve lipopolisakkarit yapılarına bağlı olarak hidrofobisite gösterirler. Hücre yüzeyi ve tutunulacak tabaka arasındaki hidrofobik etkileşimler, bakteri hücresinin itici güçlerin üstesinden gelmesini sağlar ve tutunma gerçekleşir (Dolapçı, 2013a).

Tutunulan yüzeyin, yüzey pürüzleri, temizliği, ıslanabilirliği gibi özellikleri biyofilm oluşumunu etkileyen diğer önemli faktörlerdir.

Isı, pH, ozmolarite, oksijen düzeyi, besin durumu ve diğer bakterilerin varlığı gibi çevresel hususlar biyofilm yapısının oluşumunda etkili ve önemli olan yüzey ve bakteriden bağımsız faktörlerdir.

2.7.6. Hücreden Hücreye İletişim

Biyofilm oluşumu, bakterilerin sadece bir araya gelerek belirli bir yüzeye tutunduktan sonra oraya yapışması ve o yüzeydeki diğer türlerle birlikte yaşamaya devam ettikleri şeklinde gerçekleşen rasgele bir olay değildir. Birçok organizma aktivitelerini koordine etmek için birbirlerine sinyal verirken küçük yayılabilir molekülleri kullanırlar. Biyofilm oluşumunda önemli bir mekanizma olan ve “Quorum Sensing (QS)” olarak adlandırılan bu işlem ile bakteriler ürettikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissedebilmekte ve bu verileri diğerlerine iletmesine imkân sağlamaktadır. QS ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirler. Bir yüzeye tutunan her bakteri, ortama ‘Ben buradayım’ mesajı veren bir molekül yayar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artar. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılır yani biyofilm içerisindeki bakteriler hücre içi, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla iletişim kurmaktadır (Gün, 2009).

Bakteri hücreleri küçük çözülebilir sinyal molekülleri salgılayarak ve bunları hissederek ,”Quorum Sensing “ olarak bilinen bir işlem çerçevesinde, birbirleri ile iletişim kurarlar. Bu bakterilerin kendi çevrelerindeki otoindükleyici olarak bilinen çözülebilir sinyal moleküllerinin miktarlarını ölçme yoluyla, onlara toplu davranışlarda bulunma imkanı vermektedir. QS moleküllerinin otoendükleyici olarak da ifade edilmelerinin nedeni, üretildikleri hücrenin metabolizması üzerinde düzenleyici etki göstermeleridir. Hücreden hücreye sinyal mekanizmaları aracılığıyla bakteriler hem kendi davranışlarını ayarlamakta hem de diğer türler tarafından üretilen sinyallere cevap geliştirirler (Gün, 2009).

Bakteriler “Quorum Sensing” iletişimini, virulens, hareketlilik, sporlanma, bioluminesans ve antimikrobiyal direnç geliştirme gibi çeşitli fizyolojik ve genetik aktivitelerini düzenlemek için kullanırlar.”Quorum Sensing” pek çok türde biyofilm oluşturmada da görev alır. Biyofilmler tipik olarak yüksek konsantrasyonda hücre içerdikleri

için otoindükleyici aktivite ve “Quorum Sensing” düzenlenmesi, biyofilm fizyolojisinin temel bileşenleri olarak görülürler (Dolapçı, 2013a).

2.8. Patogenez ve Virulens Mekanizmaları

Virulens genleri patojenite adaları denilen kromozom bölgelerinde yer almaktadır. *Salmonella* serotiplerinde řu ana kadar 18 adet patojenite adası belirlenmiştir. Konak hücrelere invazyon, intrasellüler patogenez ve ekstraintestinal yayılım gibi birçok virülans özellikleri mevcuttur. Bazı patojenite adaları *Salmonella* cinsi içinde korunmuş olarak bulunurken bazıları da belirli serotipler için spesifiktir. Bu nedenle *Salmonella* serotipleri arasında enfeksiyon şiddeti açısından farklılıklar vardır.

Bu alışmada *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritis ve *Salmonella* Infantis serotiplerinde biyofilm ve Virulens genlerinin ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. *Salmonella* serotiplerindeki biyofilm ile ilgili *sdiA*, *bapA*, *agfD*, *adrA* ve *invA* gen varlıkları incelenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Metot

3.1.1. Bakteri izolatları

Çalışma kapsamında farklı kaynaklardan izole edilmiş olan ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan 44 adet *Salmonella* izolatı incelendi. İncelenen örneklerin serotiplere göre dağılımı 10 adet *Salmonella* Typhimurium, 10 adet *Salmonella* Enteritidis ve 24 adet *Salmonella* Infantis şeklindedir.

3.1.2. İdentifikasyon

Çalışmada kullanılan izolatlar nutrient ve TSA agarda 37° C'de 24 saat inkübasyona tabi tutularak canlandırıldı. İzolatların fenotipik olarak identifikasyonları için MacConkey agara ve EMB (eozin metilen blue) agara ekimleri gerçekleştirildi.

3.1.3. Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak Belirlenmesi

Slime oluşumu Kongo Red Agar (CRA) yöntemi kullanılarak belirlendi. Slime araştırılacak suşların besiyerlerine ekimi yapıldı. 37° C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucu siyah ve pürüzlü yüzey oluşturan örnekler slime pozitif olarak değerlendirildi. Oluşturmayanlar negatif olarak değerlendirildi.

3.1.4. *Salmonella* serotiplerindeki biyofilm ile ilgili *bapA*, *sdiA*, *invA*, *agfD* ve *adrA* gen varlıklarının PCR ile incelenmesi

PCR çalışmalarında kullanılmak üzere tüm izolatların DNA eldesi için kaynatma yöntemi uygulandı. Bu amaçla stafilocok izolatlarının Trypticase Soy Agar (TSA)'a ekimi yapıp ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İzolatlar üretildikten sonra bir öze dolusu saf koloni alınarak 500 mikrolitrelik DNase-RNase ari ependorf tüplerinde deiyonize su ile süspanse edildi. Süspansiyon 100 derecede 10 dk kaynatıldı ve daha sonra 10 000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı alınarak PCR amplifikasyonlarında hedef DNA olarak kullanıldı (Çiftci ve ark, 2009). DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçüldü ve tüm DNA'lar 50 ng/mikrolitre olacak şekilde eşitlendi. Elde edilen DNA'lar kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

PCR ile *bapA* geninin belirlenmesi için Horton ve ark. (2016)'nın kullandıkları protokolün modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Toplam 25 µl PCR karışımına; 50 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR tamponu, 3mM MgCl₂, 5pm her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 0,5 U *Taq*polimeraz ilave edildi. Amplifikasyon koşulları 94°C'de 2 dk ilk denatürasyon, 25 siklus 94°C'de 1dk, 63°C'de 1dk, 72°C'de 1dk amplifikasyon ve 72°C'de 7 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidiumbromid (2µg/ml) içeren % 1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında 814bp'lik bant görülmesi *bapA* geni için pozitif olarak değerlendirildi.

PCR ile *invA* geninin belirlenmesi için Bhattave ark. (2007)'nin kullandıkları protokolün modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Toplam 25 µl PCR karışımına; 50 ir dNTP, 1 U *Taq*polimeraz ilave edildi. Amplifikasyon koşulları 94°C'de 1dk ilk denatürasyon, 30 siklus 94°C'de 30 sn, 60°C'de 30 sn, 72°C'de 2 dk amplifikasyon ve 72°C'de 10 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidiumbromid (2µg/ml) içeren % 2'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında 244 bp'lik bant görülmesi *invA* geni için pozitif olarak değerlendirildi.

PCR ile *sdiA* geninin belirlenmesi için Halatsive ark. (2006)'nın kullandıkları protokolün modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Toplam 25 µl PCR karışımına; 50 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR tamponu ((NH₄)₂SO₄'lü), 3mM MgCl₂, 25 pm her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 1 U *Taq*polimeraz ilave edildi. Amplifikasyon koşulları 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 94°C'de 30 sn, 52°C'de 40 sn, 72°C'de 30 sn amplifikasyon ve 72°C'de 7 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri

etidumbromid (2µg/ml) içeren % 1,5'lük agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında 274 bp'lik bant görülmesi *sdIA* geni için pozitif olarak değerlendirildi.

PCR ile *adrA* geninin belirlenmesi için De Oliveira ve ark. (2014)'nın kullandıkları protokolün modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Toplam 25 µl PCR karışımına; 50 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR tamponu, 2,5mM MgCl₂, 10 pm her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 1,25 U *Taq*polimeraz ilave edildi. Amplifikasyon koşulları 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon, 35 siklus 94°C'de 30 sn, 60°C'de 30 sn, 72°C'de 30 sn amplifikasyon ve 72°C'de 4 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidumbromid (2µg/ml) içeren % 3'lük agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında 92 bp'lik bant görülmesi *adrA* geni için pozitif olarak değerlendirildi.

PCR ile *agfD* geninin belirlenmesi için De Oliveira ve ark. (2014)'nın kullandıkları protokolün modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Toplam 25 µl PCR karışımına; 50 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR tamponu, 2,5mM MgCl₂, 10 pm her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 1,25 U *Taq*polimeraz ilave edildi. Amplifikasyon koşulları 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon, 35 siklus 94°C'de 30 sn, 60°C'de 30 sn, 72°C'de 30 sn amplifikasyon ve 72°C'de 4 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidumbromid (2µg/ml) içeren % 3'lük agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında 123 bp'lik bant görülmesi *agfD* geni için pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 2 Çalışmada kullanılan oligonükleotid gen dizileri.

Primer	Oligonükleotid dizisi (5'-3')	Bant boyutu	Referans
<i>invAF</i>	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT	244bp	Bhatta ve ark. 2007
<i>invAR</i>	AGACGACTGGTACTGATCGATAAT		
<i>sdiA1</i>	AATATCGCTTCGTACCAC	274bp	Halatsi ve ark. 2006
<i>sdiA2</i>	GTAGGTAAACGAGGAGCAG		
<i>agfDF</i>	TGCGGACTCGGTGCTGTTGT	123	De Oliveira ve ark. 2014
<i>agfDR</i>	CAGGAACACGTGGTCAGCGG		
<i>adrAF</i>	GGGCGGCGAAAGCCCTTGAT	92	De Oliveira ve ark. 2014
<i>adrAR</i>	GCCCATCAGCGCGATCCACA		
<i>bapAF</i>	GCG CCG CAG ATC GTG TCA G	575	Horton ve ark.2016
<i>bapAR</i>	CCG GCA GCG TCC AGG TG		

4. BULGULAR

4.1. Bakteri İzolatları

Çalışma kapsamında farklı kaynaklardan izole edilmiş olan ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan 44 adet salmonella izolatu incelendi. Bu 44 örnek *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Infantis serotiplerine aitti. İncelenen örneklerin serotiplere göre dağılımı ise *Salmonella* Typhimurium 10 adet, *Salmonella* Enteritidis 10 adet, *Salmonella* Infantis 24 adettir.

Bu 44 örneğin 38 inde % 86.36 oranında *bapA* geni, 26 sında % 59 oranında *sdiA* geni, 44 ünde yani tamamında % 100 oranında *invA* geni, 39 unda % 88.64 oranında *agfD* geni ve 35 inde % 79.55 oranında *adrA* geni tespit edilmiştir.

4.2. İdentifikasyon Bulguları

Çalışmada kullanılan izolatlar nutrient agarda 37°C'de 24 saat inkübasyona tabi tutularak canlandırıldı. İzolatların fenotipik olarak identifikasyonları için Mac Conkey agara ve EMB agara ekimleri yapıldı. Herbir örnek bu selektif besi yerlerinde renksiz koloniler oluşturdu.

Fenotipik olarak biyofilm oluşturma durumları Kongo kırmızılı agar ile araştırılmıştır. Kongo kırmızılı agar besiyerine ekilen kültürlerin 37°C'de 24 saat inkübasyonundan sonra kırmızımsı-siyah, pürüzlü ve kuru koloni oluşturanlar biyofilm pozitif, pembemsi-kırmızı ve düz koloni yapanlar gram negatif olarak kabul edildi. Örneklerin hiçbirinde fenotipik olarak biyofilm oluşumu gözlemlenmemiştir.

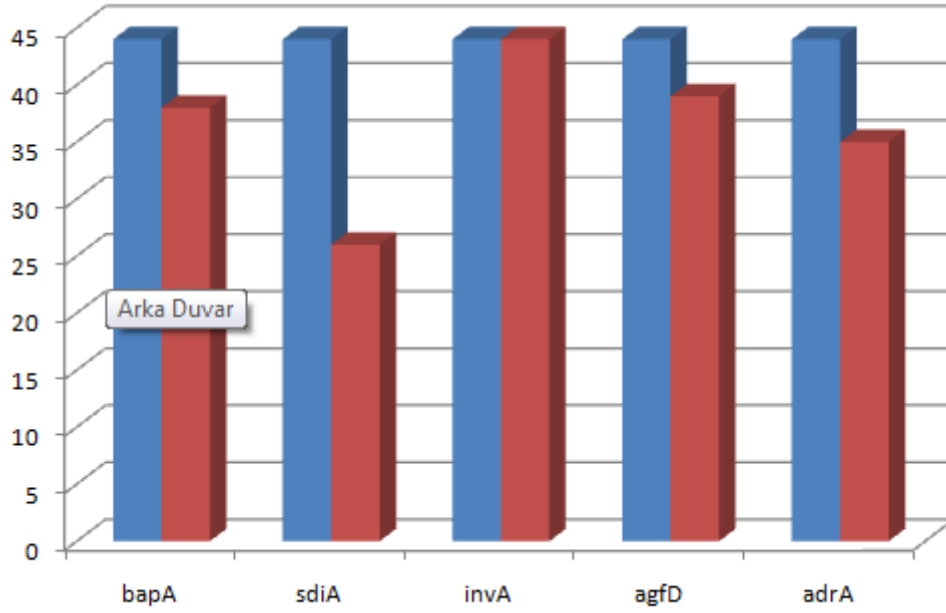
4.3. PCR Bulguları

Salmonella serotiplerindeki biyofilm ile ilgili *bapA*, *sdiA*, *invA*, *agfD* ve *adrA* gen varlıkları incelendi. Bu 44 örneğin 38 inde % 86.36 oranında *bapA* geni, 26 sında % 59

oranında *sdiA* geni, 44 ünde yani tamamında % 100 *invA* geni, 39 unda %88.64 oranında *agfD* geni ve 35 inde %79.55 oranında *adrA* geni tespit edilmiştir.

Tablo 3. *Salmonella* serotiplerindeki *bapA*, *sdiA*, *invA*, *agfD* ve *adrA* gen varlıklarının yüzde (%) dağılımları

	<i>bapA</i>	<i>sdiA</i>	<i>invA</i>	<i>agfD</i>	<i>adrA</i>
<i>Salmonella</i> incelenen toplam örnek sayısı: 44	38 %86.36	26 %59	44 %100	39 %88.64	35 %79.55



Şekil 6. *Salmonella* serotiplerindeki (44 adet) *bapA*, *sdiA*, *invA*, *agfD* ve *adrA* gen varlıklarının dağılımları

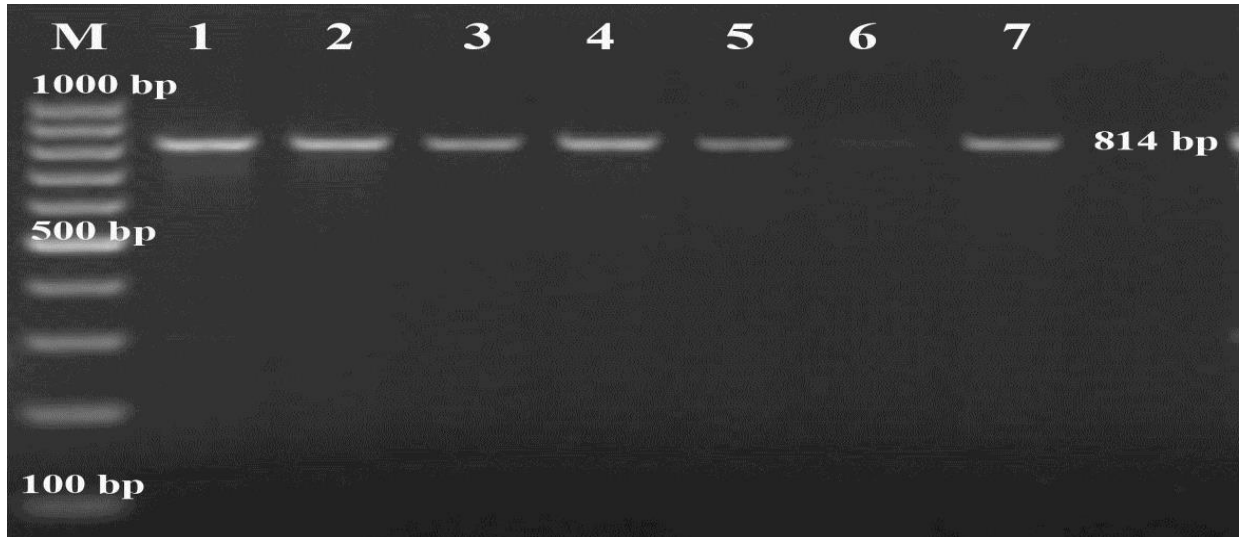
Tablo 4. Tüm *Salmonella* serotiplerindeki (44 örnek) *bapA*, *sdiA*, *invA*, *agfD* ve *adrA* genlerinin varlığı

		<i>bap</i>	<i>sdi</i>	<i>inv</i>	<i>agf</i>	<i>adr</i>
S İNFANTİS 1	1	+	+	+	+	+
S İNFANTİS 2	2	+	+	+	+	+
S İNFANTİS 3	3	+	+	+	+	+
S İNFANTİS 4	4	+	+	+	+	+
S İNFANTİS 5	5	+	+	+	+	+
S İNFANTİS 6	6	+	+	+	+	+

		<i>bap</i>	<i>sdi</i>	<i>inv</i>	<i>agf</i>	<i>adr</i>
S ĪNFANTĪS 7	7		††	††	††	††
S ĪNFANTĪS 8	8	††	††	††	††	††
S ĪNFANTĪS 9	9	††	††	††	††	††
S ĪNFANTĪS 10	10	††	††	††	††	††
S ĪNFANTĪS 11	11	††	††	††	††	††
S ĪNFANTĪS 12	12	††	††	††	††	††
S ĪNFANTĪS 13	13	††	††	††	††	††
S ĪNFANTĪS 14	14	††	††	††	††	††
S ĪNFANTĪS 15	15	††	††	††	††	††
S ĪNFANTĪS 16	16	††	††	††	††	††
S ĪNFANTĪS 17	17	††		††	††	††
S ĪNFANTĪS 18	18	††		††	††	††
S ĪNFANTĪS 19	19	††		††	††	††
S ĪNFANTĪS 20	20	††	††	††	††	††
S ĪNFANTĪS 21	21	††		††	††	††
S ĪNFANTĪS 22	22	††	††	††	††	††
S ĪNFANTĪS 23	23		††	††	††	††
S ĪNFANTĪS 24	24	††	††	††	††	††
S ENTERITIDIS 1	25	††		††	††	††
S. ENTERITIDIS 2	26	††		††	††	††
S. ENTERITIDIS 3	27	††		††	††	††
S. ENTERITIDIS 4	28	††		††		††
S. ENTERITIDIS 5	29	††		††	††	††
S. ENTERITIDIS 6	30	††		††		
S. ENTERITIDIS 7	31	††		††	††	
S. ENTERITIDIS 8	32	††		††		
S. ENTERITIDIS 9	33	††		††		

		<i>bap</i>	<i>sdi</i>	<i>inv</i>	<i>agf</i>	<i>adr</i>
S. ENTERITIDIS 10	34	+	-	+	-	-
S. TYPHIMURIUM 1	35	+	+	+	+	+
S. TYPHIMURIUM 2	36	+	+	+	+	+
S. TYPHIMURIUM 3	37	-	-	+	+	-
S. TYPHIMURIUM 4	38	-	-	+	+	-
S. TYPHIMURIUM 5	39	+	+	+	+	+
S. TYPHIMURIUM 6	40	+	+	+	+	+
S. TYPHIMURIUM 7	41	-	-	+	+	-
S. TYPHIMURIUM 8	42	-	-	+	+	-
S. TYPHIMURIUM 9	43	+	+	+	+	+
S. TYPHIMURIUM 10	44	+	+	+	+	+

PCR ile *bapA* geninin belirlenmesi için Horton ve ark. (2016)'nın kullandıkları protokolün modifikasyonu ile gerçekleştirildi. PCR ile incelenen toplam 44 adet *Salmonella* örneğinde *bapA* geni 38 adet (% 86,36) pozitif olarak bulundu.



Resim 4. İncelenen suşların *bapA* geni spesifik PCR sonucu

PCR ile *sdiA* geninin belirlenmesi için Halatsi ve ark. (2006)'nın kullandıkları protokolün modifikasyonu ile gerçekleştirildi. PCR ile incelenen toplam 44 adet *Salmonella* örneğinin 26'sında % 59 oranında *sdiA* geni pozitif olarak bulundu.



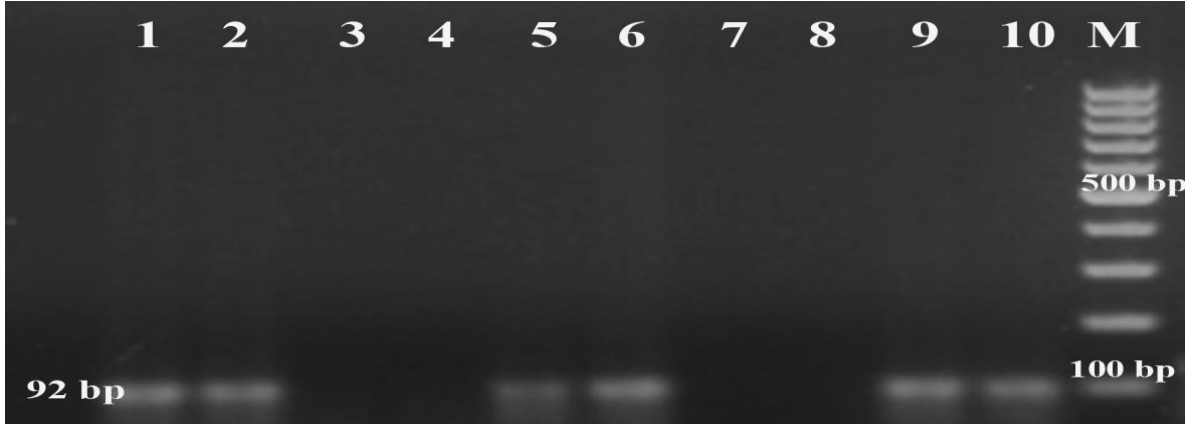
Resim 5. İncelenen suşların *sdiA* geni spesifik PCR sonucu

PCR ile *invA* geninin belirlenmesi için Bhattave ark. (2007)'nin kullandıkları protokolün modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Toplam 44 adet *Salmonella*'nın tamamında % 100 oranında *invA* geni bulundu.



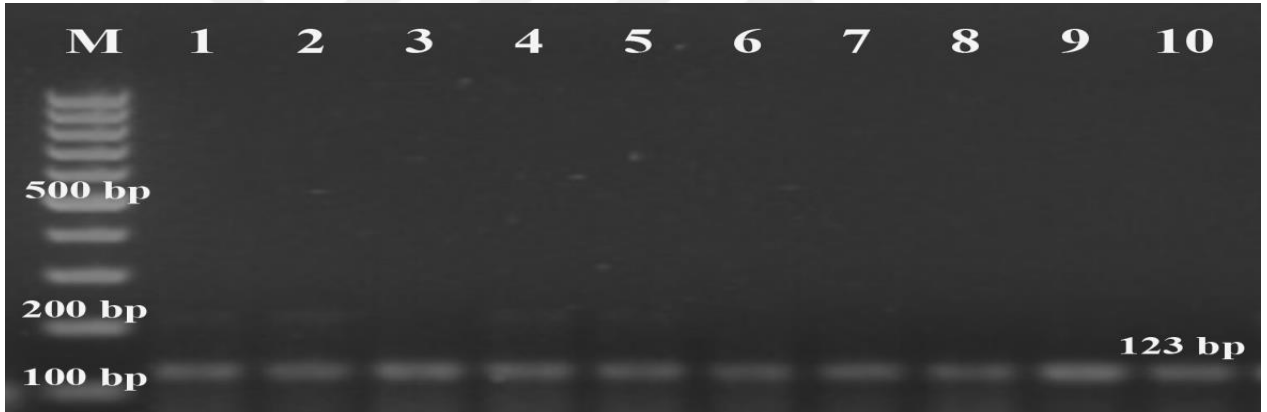
Resim 6. İncelenen suşların *invA* geni spesifik PCR sonucu

PCR ile *adrA* geninin belirlenmesi için De Oliveira ve ark. (2014)'nin kullandıkları protokolün modifikasyonu ile gerçekleştirildi. PCR ile incelenen toplam 44 adet *Salmonella* örneğinin 35'inde % 79.55 oranında *adrA* geni pozitif olarak bulundu.



Resim 7. İncelenen suşların *adrA* geni spesifik PCR sonucu

PCR ile *agfD* geninin belirlenmesi için De Oliveira ve ark. (2014)'nın kullandıkları protokolün modifikasyonu ile gerçekleştirildi. PCR ile incelenen toplam 44 adet *Salmonella* örneğinin 39 unda % 88.64 oranında *agfD* geni pozitif olarak bulundu.



Resim 8.İncelenen suşların *agfD* geni spesifik PCR sonucu

Salmonella Typhimurium serotipine ait 10 örneğin; 6 sında (% 60) *bapA* geni, 6 sında (% 60) *sdiA* geni, 10 unda (% 100) *invA* geni, 10 unda (% 100) *agfD* geni ve 6 sında (% 60) *adrA* geni;

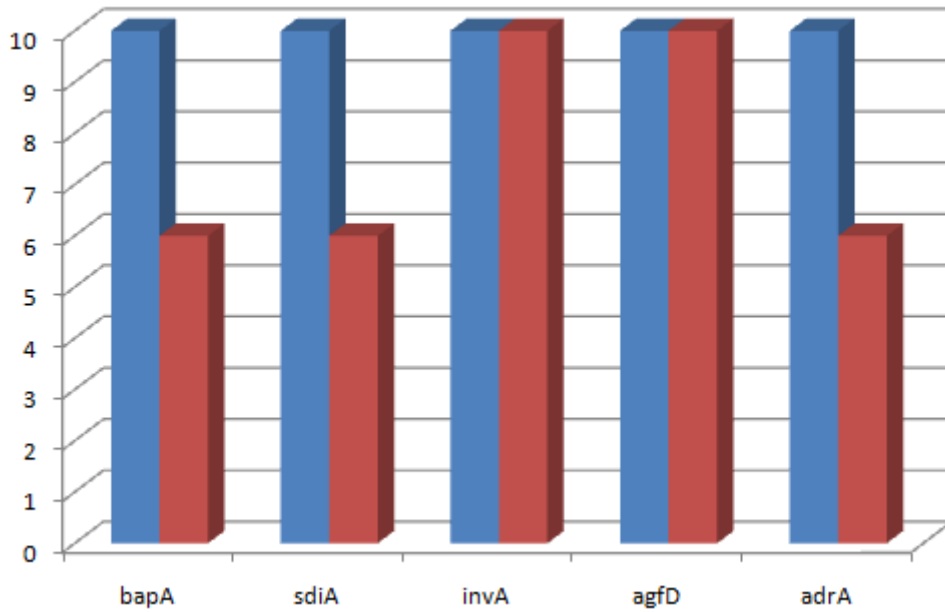
Salmonella Enteritidis serotipine ait 10 örneğin; 10'unda (% 100) *bapA* geni, 0 ında (% 0) geni, 10 unda (% 100) *invA* geni, 5 inde (% 50) *agfD* geni ve 5 inde (% 50) *adrA* geni;

Salmonella Infantis serotipine ait 24 örneğin; 22 sinde (% 91.67) *bapA* geni, 20 sinde (% 83.33) *sdiA* geni, 24 ünde (% 100) *invA* geni, 24 ünde (% 100) *agfD* geni ve 24 ünde (% 100) *adrA* geni tespit edilmiştir.

Tablo 5. Salmonella serotiplerindeki *bapA*, *sdiA*, *invA*, *agfD* ve *adrA* genlerinin herbir serotipteki pozitif sayıları ve yüzdeleri

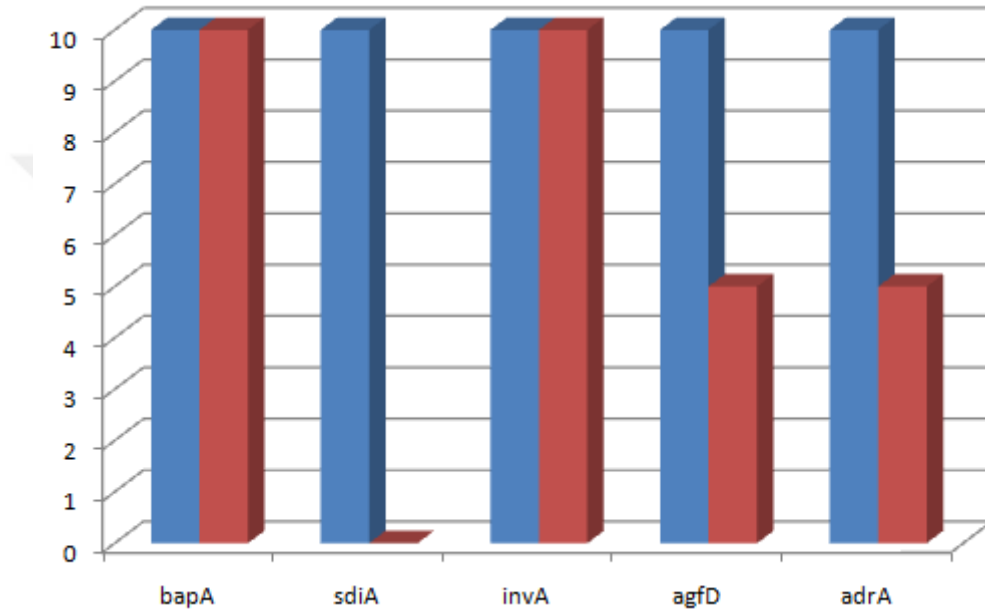
	<u>bapA</u>	<u>sdiA</u>	<u>invA</u>	<u>agfD</u>	<u>adrA</u>
<u>Salmonella Typhimurium</u> incelenen örnek sayısı: 10	6 % 60	6 % 60	10 %100	10 %100	6 % 60
<u>Salmonella Enteritidis</u> incelenen örnek sayısı: 10	10 %10	0 % 0	10 %100	5 % 50	5 % 50
<u>Salmonella infantis</u> incelenen örnek sayısı: 24	22 %91.67	20 % 83.33	24 %100	24 %100	24 %100

Salmonella Typhimurium serotipine ait 10 örnekten elde edilen genler değerlendirildiğinde; bütün örneklerde % 100 oranında *invA* ve *agfD* genleri tespit edilmiştir. Öte yandan *bapA*, *sdiA* ve *adrA* genleri % 60 oranında görülmüştür. Bu çalışmada *Salmonella Typhimurium* örneklerinde *invA* ve *agfD* genlerinin % 100 oranında tespiti, *invA* ve *agfD* genlerinin *Salmonella Typhimurium* serotipinin identifikasyonunda ve virulensinde önemini ortaya koymaktadır.



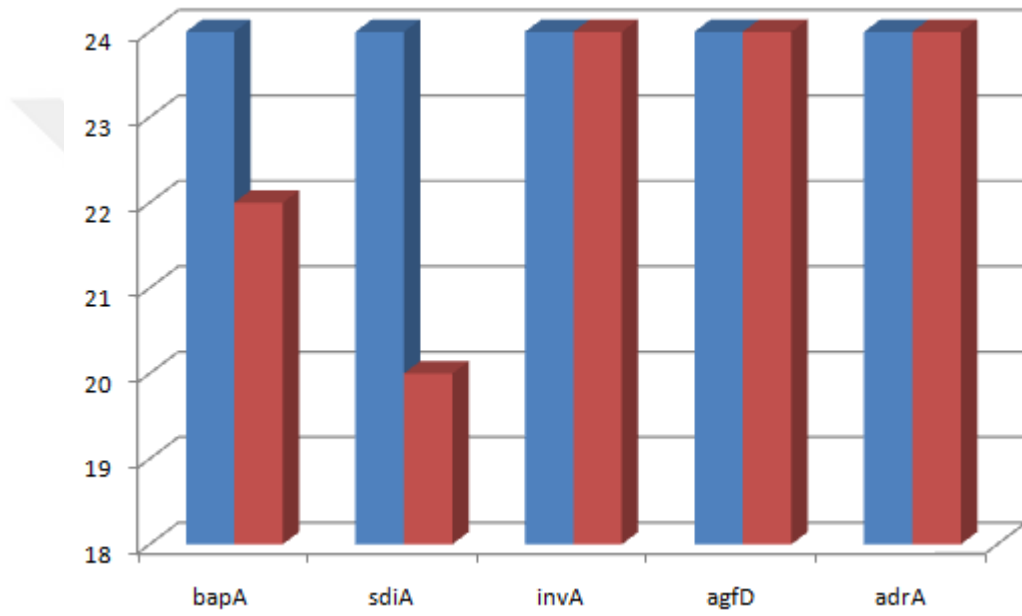
Şekil 7. *Salmonella Typhimurium* serotipine ait 10 örnekten elde edilen genlerin dağılımı

Salmonella Enteritidis serotipine ait 10 örnekten elde edilen genler değerlendirildiğinde; bütün örneklerde % 100 oranında *invA* ve *bapA* genleri tespit edilmiştir. Öte yandan *agfD* ve *adrA* genleri % 50 oranında görülürken, *sdiA* geni tespit edilmemiştir. Bu çalışmadaki *Salmonella* Enteritidis örneklerinde *invA* ve *bapA* genlerinin % 100 oranında tespiti, *invA* ve *bapA* genlerinin *Salmonella* Enteritidis örneklerinin identifikasyonunda ve virulensinde önemli faktörler olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca *sdiA* geninin hiç görülmemiş olması da *Salmonella* Enteritidis'ler için anlamlıdır.



Şekil 8. *Salmonella* Enteritidis serotipine ait 10 örnekten elde edilen genlerin dağılımı

Salmonella İnfantis serotipine ait 24 örnekten elde edilen genler değerlendirildiğinde; bütün örneklerde % 100 oranında *invA*, *adrA* ve *agfD* genleri tespit edilmiştir. Öte yandan *sdi* geni % 83,33 oranında ve *bapA* geni % 91,67 oranında görülmüştür. Bu çalışmada *Salmonella* İnfantis örneklerinde *invA*, *adrA* ve *agfD* genlerinin % 100 oranında tespiti, *invA*, *adrA* ve *agfD* genlerinin *Salmonella* İnfantis serotipinin identifikasyonunda ve virulensinde önemli olduğu anlaşılmıştır. *sdiA* geninin % 83,33 ve *bapA* geninin % 91,67 şeklinde yüksek oranlarda görülmeside *Salmonella* İnfantis serotipinin identifikasyonunda ve virulensinde diğer genler kadar önemli olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 9. *Salmonella* İnfantis serotipine ait 24 örnekten elde edilen genlerin dağılımı

5. TARTIŞMA

Wassenaar ve Gastra (2001)'e göre *Salmonella* infeksiyonlarının sonucunu bakterinin kendisi ve konakçının durumu şekillendirir. Konakçının durumunu çevresel faktörler, genetik faktörler ve yaş belirlerken, bakterilerin durumu virulens faktörleri tarafından belirlenir. Ancak, günümüzde hala virulens faktör veya virulens genlerinin sınırları tam anlamıyla tanımlanamamıştır. Örneğin virulens plazmidlerinin virulans faktör olup olmadığı hakkındaki tartışmalar hala sürmektedir. Bunun sebebi ise, virulens genlerin (virulens faktörler) sadece virulens proteinlerini kodlamaktan sorumlu olmaları, bununla birlikte konakçı ve bakteri arasındaki etkileşime direkt olarak etkilerinin olmayışdır.

Salmonella cinsi bakterilerin virulens faktörlerinin tamamı patojenitelerinin peşinden moleküler anlamda mekanizmasındaki değişiklik ile hastalık yapıcı bilgisini kazanmaya devam ederek gelişmektedir. Örneğin; *Salmonella* vakuollerinden replikasyon ve canlılık proteinlerini içeren effektör proteinler günümüzde virulens faktörler olarak karakterize edilmektedir. Virulens plazmidleri, toksinler, fimbria ve flagella gibi diğer virulens faktörleri son yıllardaki çalışmalarda ortaya konulmuş ve bu nedenle de klasik virulens faktörler olarak açıklanmıştır (Wassenaar ve Gastra, 2001).

Marcus ve ark (2000) göre *Salmonella*'ların virulans genlerinin çoğunluğu *Salmonella* patojenite adaları (SPA) olarak adlandırılan kromozomun üzerindeki bölgelere dağılmış olarak bulunmaktadır (Şekil 1) Bu gen topluluklarının horizontal gen transferi vasıtasıyla *Salmonella* cinsi olmayan diğer cinslerden edinilmiş olduğu düşünülmektedir. Bu hipotez sıklıkla patojenite adalarının uçlarındaki transpozon insersiyon sekansların veya bakteriyofaj kalıntıları gibi rezidüel genomların bu adalarda bulunan farklı GC içeriği ile karışması esasına dayanmaktadır (Marcus ve ark, 2000).

Virulens plazmidlerin, toksinlerin ve fimbriaların dağılımı ve varlığı üzerine yapılmış olan çalışmaların birçoğu; hibridizasyon denemelerine dayanmaktadır. Ancak bu denemelere dayalı belirli virulens faktörlerin varlığını göstermek birbiri ile çelişen sonuçların çıkmasına yol açabilmektedir. Ortaya çıkan bu sonuçlar, genler tarafından kodlanan virulens faktörlerin ekspresyonunun hangi faktörlere bağlı olduğu hakkında yeterli bilgi verememektedir.

Salmonella patojenite adalarının oluşması, söz konusu transfer esnasında *Salmonella*'ların patojenitelerinde ani bir artışa yol açabilmektedir (Ata ve Çetin, 2015).

D'aoust ve Maurer (2007) yaptığı çalışmalarda *Salmonella enterica*'da bulunan gen adalarının (patojenite adaları) çoğu patojenite için esansiyel olan önemli fonksiyonları

kodladığını ve bununda lokuslarda tür ve cinslerde tanımlandığını, *Salmonella*'ların kromozomları üzerinde beş *Salmonella* patojenite adası identifiye edildiğini, patojenite adalarının sentizom 63, 31, 82, 92 ve 25'de lokalize olmalarını, *Salmonella* patojenite adası-1 üzerinde tip III sekresyon sistemini kodlayan DNA'nın 40 kilobase (kb)'lik bölgesi bulunduğunu, tip III bakteriyel transport sisteminin; hücreler tarafından bakterilerin içeri alınmasına yol açan hedef hücre aktinine bağlanan *SopE* ve *SptP* bakteriyel proteinleri kodladığını belirtmektedir.

D'aoust ve Maurer (2007) *Salmonella* spp.'de invazyon lokusunun, invazyon mekanizmasında özel bir role sahip olduğunu, Ca^{+2} 'nin içeri alınması ile konak hücre sitoplazmalarında anatomik yapının yeniden yapılandırılması, M hücreleri ve enterositlerde iki önemli değişikliği tetiklediğini, adheze *Salmonella*'lar aktin polimerizasyonunu etkileyen önemli bir sinyal ile memeli hücreleri içine luminal Ca^{+2} 'nin alınmasını gerçekleştirdiğini, *Salmonella*'ların ökaryotik hücrelere *sip A*, *sipB*, *sipC*, *sptP*, *sopE2* ve *sopB* invazyon proteinlerini gönderdiğini, bu proteinlerin sırasıyla istilacı patojenlerin etrafında mikrofilamentlerin içinde konak hücre aktininin polimerizasyonuna sebep olduklarını belirtmektedirler.

Alphons ve Jaap (2005) göre ikinci tip III sekresyon sistemini 40 kb'lik *Salmonella* patojenite adası-2'deki lokusu kodlamakta ve hem epitelyum hücrelerinde hem de makrofajların içinde bakterilerin canlı kalması için *Salmonella*'lar bu sisteme gereksinim duymaktadır. *Salmonella* patojenite adası-4 makrofajlar içinde canlı kalmayı sağlar. *Salmonella* patojenite adası-5'in diareye sebep olan patojenite yeteneğinden sorumlu olduğu ortaya konulmuştur.

D'aoust ve Maurer (2007) *Salmonella* patojenite adası-1 lokusu *Salmonella*'nın enteropatojenitesinde, toksinlerinin ekspire edildiği bölge olması nedeniyle önemli bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır.

Alphons ve Jaap (2005)'a göre flagella, birçok *Salmonella*'da bulunan ve motilite özelliğini kazandıran bir organeldir. *Salmonella*'nın flagellar gen sistemi tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Ancak flagellasız serotiplerin flagellasının ve hareketinin bulunmayışı sınırlı moleküler bilgiyle açıklanabilmektedir. Flagellaya sahip olan *Salmonella*'ların çoğunun faydalandığı flagellin varyasyonu, konakçı savunma sisteminden kaçmayla ilgidir. *Salmonella* spp.'den kaynaklanan infeksiyonlarda, flagellanın rotasyon yönüyle ve flagella vasıtasıyla sağlanan hareketteki flagellanın rolü, *Salmonella* spp.'lerin patogeneğinde, ökaryot hücrelere invazyonda ve onların adhezyonunda varsayılan rolleri hakkında, farklı sonuçlara yol açtığını ileri süren birçok çalışma bulunmaktadır.

Sunar ve ark (2010) yaptıkları çalışmada spesifik *Salmonella* uyumu nedeniyle *invA* genini primer gen olarak seçmişlerdir. *InvA* genleri ve *Salmonella* spp. DNA'ları için PCR güçlendirmesi önemli ve yararlı sonuçlar çıkarmıştır. Dolayısıyla, ileriki araştırmalar için patojenin tanımlanmasında standart geleneksel tekniklerin yanında moleküler tekniklerin kullanılmasının uygun olduğu sonucuna varılmıştır. *invA* geni *Salmonella* spp. de PCR teknikleri kullanarak kolayca tanınmıştır. *InvA* geni özgün dizilimler taşımaktadır ve bu primerler *Salmonella* ve diğer organizmaları birbirinden ayırt etmeye yarar. *invA* geni taşıyan *Salmonella* spp. tiplendirilmesinde moleküler tekniklere daha fazla başvurulması gerektiğini ifade etmişlerdir.

Halatsi ve ark (2006) yaptıkları çalışmada farklı *Salmonella* serotiplerini *sdiA* geni varlığı için incelemişlerdir. Burada her *Salmonella* türü PCR testlerinde pozitif sinyal vermiştir. Farklı ortamlardan izole edilen *Salmonella* serotipindeki 18 tür *sdiA1* ve *sdiA2* primerleriyle elde edilmiştir.

Bakteriyel patojenitenin ve özellikle *Salmonella*'nın bağırsak virülansının çok önemli bir regülâtörü Quorum Sensing'tir. Kesin mekanizma birden fazla karakterden sorumlu olunması nedeniyle henüz detaylarıyla bilinmiyor. *sdiA* diğer mikrobiyal türlerin AHL sinyallerini tespit eden bakteriyel reseptörün ilk örneğidir. *sdiA* geni *Salmonella* kromozomunun sentisome 42 bölgesinde bulunur(dengesiz sentisome 63 bölgesinden yeterince uzakta) , *uvrC* ve *sirA*'nın hemen üstündedir. *sdiA* *Salmonella*'nın virülansla alakalı tip 3 salgı sistemini regüle etmez. Dolayısıyla, *sirA* *Salmonella*'nın bağırsak virülansı için majör regülâtörken; *sdiA* bağırsakta hayatta kalmaya veya kolonizasyona katkıda bulunan yardımcı faktörleri ve fonksiyonu bilinmeyen diğer genleri regüle eder. *sirA* geni ayrıca *Salmonella*'nın PC'la tespiti için kullanılır. Ancak *Salmonella* olmayan türler için özgün olmayan bantlar üretir. Genel olarak *sdiA*'nın sadece tek bir bakterinin konak dokuya yapışmasına yardımcı olduğu bilinmektedir. Gen transkripsiyonunun cevap regülâtörü olarak *sdiA* oldukça sınırlı alana sahiptir. Quorum Sensing sistemindeki her eleman, sistem fonksiyonunun tümüne zarar vermeden daha büyük karmaşıklığa veya özgünlüğe evrilebilmektedir. Bu karakteristikler Quorum Sensing genlerinin primer tasarımı için çok uygundur.

Gibson ve ark (2006)'e göre *Salmonella* hücre dışı matiksle bağlantılı bir O-Ag kapsülü üretir. Yapısal analizler *Salmonella* serovar Enteritidis LPS O-Ag ile benzer tekrarlayan bir oligosakkarit birimini göstermiştir. *yih* operonlarının kapsül üretimi ve translokasyonu için önemli olduğu gösterilmiştir. *yihVW* operonu, *agfD* varlığında baskılanan,

yihU transkripsiyonunun varsayımsal represörünü kodlar. Kapsül üretimi ve translokasyonu hücre dışı matriksin bir parçası olarak Tafi(Curli) ve selülozla birlikte regüle edilir.

Kapsül oluşumu hücre dışı matriksle birlikte *agfD* tarafından Tafi operonundan regüle edilir. *yihV* oluşumu *agfD* varlığında baskılanır, bu durum *yihU* aktivasyonu ile uyumludur. *agfD* nin çok hücreli patern oluşumu, *Salmonella* için önemli bir fizyolojik durumdur ve hücre dışı matriks genlerinin oluşumunu kontrol eder. *yih* operonlarının da ayrıca *Salmonella* boyunca tutulduğu tespit edilmiştir. Bu O-Ag kapsülünün *Salmonella* hayat döngüsündeki önemli yerini göstermektedir.

Gibson ve ark (2006)'nın çalışmalarına göre hücre dışı matriks *Salmonella* için kurumaya karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Bunun araştırılmasında uzun dönem hayatta kalabilmeyi sağlayan önemli bakteriyel bileşenler için basit ve verimli bir test olan liyofilizasyon'u kullanmışlardır. Sonuçlar plastik üzerinde 9 ay kalabilen kolonilerde O-Ag kapsülünün, kurumaya karşı dayanıklılıktan sorumlu olduğunu göstermişlerdir. Buradan yola çıkarak, O-Ag kapsülünün ana rolünün, olumsuz şartlarda hücreleri kurumaya karşı korumak olabileceği hipotezini kurmuşlardır. O-Ag kapsülünün çevresel olumsuz etkilere karşı direnci oluşturan *Salmonella* hücre dışı matriksi için önemli bir bileşen olduğunu göstermişlerdir.

Salmonella Typhimurium'daki *spiA* geni, SPI-2 tip 3 salgı sisteminin dış zar bileşenini kodlayan gendir ve konak hücrelerindeki virulens için gereklidir. Dong ve ark (2011) bu durumun biyofilm oluşumuyla ilgili olarak *spiA* geninin transpozon mutagenesi ile ayrıca gösterildiğini ifade etmişlerdir. *spiA* geninin *Salmonella* Enteritidis tarafından biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini görebilmek için bir *spiA* mutantı oluşturulmuş ve biyolojik karakteristikleri karşılaştırılmıştır. Biyofilm oluşumunda fonksiyonel bir *spiA* geninin yokluğunun etkisini araştırmak için *spiA*'nın biyofilmle ilgili biyolojik aktivitesi test edilmiştir. Biyofilm oluşumunun elektron mikroskobu taraması *spiA*'nın daha az bakteriyle gevşek ve ince bir yapı ürettiği tespit edilmiştir. *Salmonella* biyofilmleri başlıca selüloz ve curli'den oluşur. *spiA*'nın insan epitel hücresine yapışma ve invazyonunu test etmek için eksponansiyel ve biyofilmin büyüme fazındaki bakteriler kullanılmıştır. Biyofilm fazındaki *spiA* yapışma ve invazyon yüzdesi eksponansiyel büyüme fazındaki bakteriye göre daha yüksek bulunmuştur. *spiA* geninin yokluğu yapışma (adherence) ve invazyonda azalma oluşturmamıştır.

Hidalgo ve ark (2016) koruma altındaki vahşi hayvanlardan izole edilen 17 farklı serovardan 83 farklı suşa ait *bapA* tespit etmişlerdir. Buna göre *bapA*, *Salmonella* 'larda yüksek derecede korunan bir gendir ve bu organizmanın gen bazlı identifikasyonlarında kullanılabilir. *bapA* pozitif çıkan birçok hayvanın asemptomatik olarak taşıyıcı olduğu

belirlenmiştir. Bu sağlık alanında çalışanlara bir sorun yaratmaktadır. Çünkü *Salmonella*'nın farklı ortamlarda hayatta kalma kapasitesinin gelecekte yayılmaya devam edeceğini göstermektedir.

Farklı serotiplerin içinde ve arasında *bapA* yüksek benzerlikle (% 99) oldukça korunan bir genidir. Bu nedenle *bapA*'nın varlığı farklı ortamlarda *Salmonella* identifikasyonunda kullanılabilir.

bapA çeşitli yüzeylere bakteri yapışmasını ve biyofilm olgunlaşmasını sağlayan büyük yüzey proteinleri ailesindendir. Eskiden Stm2689 olarak adlandırılan protein, fare modelinde bağırsak kolonizasyonu ve diğer organlara bakteriyel yayılmada önemli rol oynar. Bağırsak kolonizasyonu kısmi olarak *bapA* geninin varlığıyla alakalıdır. Hidalgo ve ark (2016)'nın bu çalışmasında *Salmonella*'lar mide ve bağırsak rahatsızlığı olmayan vahşi hayvanların dışkılarından izole edilmiştir. Daha önce yapılan araştırmalardaki *Salmonella* türlerinin *bapA*'lı veya *bapA*'sız bağırsak kolonizasyonu eğilimleri ile bu çalışmadaki sonuçlar karşılaştırıldığında mutasyona uğrayan türlerde, vahşi tipli *bapA*'lı türlere göre daha az kolonizasyon oranları tespit edilmiştir.

bapA, biyofilm olgunlaşmasını sağlayan, bakterinin yüzeylere ilk yapışmasını ve hücreden hücreye etkileşim sürecine dahil olan büyük yüzey proteinleri ailesine aittir. Proteinler, *bapA* geni tarafında kodlanır. Biswas ve ark (2011)'inca sunulan çalışmada 34 serotipten alınan 67 izolatın *bapA* içerdiğini gösteriyor. Bu çalışma farklı *Salmonella* serotiplerinin *bapA* içeriği açısından incelendiği ilk çalışmadır. Veri tabanında yer alan farklı çoklu dizilim ve yerleşimlere göre *bapA* geni farklı *Salmonella spp.* lerde korunmakta ve % 99 oranında yüksek benzerlik içermektedir. Dolayısıyla, *bapA* geni *Salmonella*'nın PCR tabanlı identifikasyonu için iyi bir yoldur.

Turki ve ark (2014) yaptıkları çalışmada, virulensle ilgili genler için, *invA* ve *spvC* primerleri kullanarak *Salmonella* izolatlarını PCR ile tiplendirmişlerdir. Kromozomal *invA* geni epitelyal hücre invazyonları için gerekli olmasına rağmen Anatum, Enteridis ve Amsterdam serotiplerine ait 3 *Salmonella* izolatı bu gen için negatif olarak tespit edilmiştir. Başka serotipler için başka çalışmalarda benzer sonuçlar gözlenmiştir (Malorny ve ark, 2003; Turki ve ark, 2012).

Sharma ve Das (2016)'a göre *Salmonella*'ya özgü primerlerin *Salmonella* türlerini hızlıca ve isabetli şekilde tespit etme yeteneği, özellikle *invA* geninden seçilen primer dizilimlerinden kaynaklanıyor. *invA* geni bakterinin iç çeperindeki proteini kodlar, bu protein epitel hücrelerine invazyon için gereklidir.

Salmonella'nın biyofilm oluşumu için *csgD* etkinliği üzerinden *bapA* gereklidir. Wang ve ark (2016) *bapA*'nın biyofilm oluşumuna direkt olarak etki etmediğini göstermişlerdir. Wang ve ark (2016)'na göre *adrA* varlığı biyofilm için gereklidir. Yapılan bazı çalışmalarda *adrA*'nın selüloz üretimi ve biyofilm oluşumuyla ilgili olduğunu ifade edilmesine rağmen, bazı çalışmalarda ise *adrA* varlığının biyofilm oluşumu için gerekli olmadığı belirlenmiştir.

Salmonella'nın biyofilm üretme yeteneği sıcaklık ve yüzey materyaline bağlıdır. Cam yüzeylerde, sıcaklıktan bağımsız olarak biyofilm kolonizasyon kapasitesi düşüktür. Paslanmaz çelik yüzeylerde biyofilm oluşumu 28°C' de, PVC yüzeylerde 20°C' de engellenmektedir. Paslanmaz çelik yüzeylerde 16°C' de biyofilm oluşturan suşların sıklığı endişe vericidir, Çünkü *Salmonella*'nın bu yüzeylerde kalıcılığı kümes kontaminasyonunun ve gıdaya dayalı hastalıkların kaynağı olabilir.

De Oliveira ve ark (2014)'nın çalışmasının sonuçları, *Salmonella*'nın hidrofobik materyallere, daha hidrofobik olan paslanmaz çelikten daha kolay yapıştığını tespit eden birçok çalışmaya zıttır. PVC üzerinde paslanmaz çelikten daha fazla *Salmonella spp.* oluşumu gözlemlenmiştir. *agfD* ve *adrA* genleri bu cinste genişçe yayılmıştır ve biyofilm oluşturma yeteneğiyle güçlü şekilde ilişkilidir. Bütün izolatların her iki incelenen gene sahip olmasına rağmen biyofilm oluşumu bakteri kolonisinin *rdar* morfolojisine bağlı değildir. Bazı biyofilm oluşturmayan türler olduğu için başka genlerin de bu sürece dahil olduğunu öne sürmektedirler.

6. SONUÇ

Salmonella Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Infantis serotiplerinde biyofilm ve virulens ilişkisinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada aşağıda belirtilen sonuçlara varılmıştır. *Salmonella* serotiplerindeki biyofilm ile ilgili *sdiA*, *bapA*, *agfD*, *adrA* ve *invA* gen varlıkları incelendi. Araştırma için farklı kaynaklardan izole edilmiş olan ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan 44 adet *Salmonella* izolatının 10'u *Salmonella* Typhimurium, 10'u *Salmonella* Enteritidis ve 24'ü *Salmonella* Infantis'tir. İncelenen 44 serotipin, 38' inde (% 86.36) *bapA* geni, 26 sında(% 59) *sdiA* geni, 44 ünde yani tamamında (% 100) oranında *invA* geni, 39 unda (%88.64) *agfD* geni ve 35 inde (%79.55) oranında *adrA* geni tespit edilmiştir.

İncelenen çeşitli virulens özelliklerin saptanmasında fenotipik yöntem ile PCR tekniği uyumluluk göstermesine karşın, bazı özelliklerde PCR tekniği ile saptanan sonuçların fenotipik sonuçlara kıyasla yüksek bulunması moleküler çalışmaların çok sayıda gen ile ilişkili bir özelliğin ayrıntılı olarak incelenmesinde yarar sağladığını ve her iki yöntemin bir arada kullanılmasının daha güvenilir bir sonuç elde etmede önemli olduğunu ortaya koydu.

Bu çalışma ile Salmonellanın insanlar için patojen olduğu ve dünyada letal etkili bir çok salgına yol açtığı göz önüne alınırsa gıda üretim yerlerinde, hammaddeden son ürüne kadar genel hijyenik kuralların uygulanmasının ve kros kontaminasyonu engelleyici önlemlerin alınmasının gerekliliği ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

- Ağca H.** *Salmonella* Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı: *Salmonella* Enfeksiyonlarında Özgül Tanı. Türkiye Klinikleri *Salmonella* Özel Sayısı 2013;6(2):29-34
- Ahmer BM.** Cell-to-Cell Signaling in *Echerichia coli* and *Salmonella* Enterica. *Molecular Microbiology*.2004,Vol. 52;933-945
- Akçelik M, Akkoç N.** *Salmonella* Patojenitesinin Molekuler Mekanizmaları *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*.2010;30(1):312-22
- Alphons JAM, Jaap E.** Distribution of “classic“ virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*.2005,44: 251-259.
- Altier C, Suyemoto M, Lawhon SD.** Regulation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Invasion Genes by csrA . *Infection and Immunity*, 2000,Vol. 68; 6790–6797.
- Ata Z, Çetin E.** *Salmonella* Türlerinin Klasik Virulans Faktörleri.*Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*.34 (2015), 1,2: 35-40
- Bhatta DR, Bangtrakulnonth A, Tishyadhigama P, Saroj SD, Bandekar JR , Hendriksen RS, Kapadnis BP.** Serotyping, PCR, Phage-typing and Antibiotic Sensitivitytesting of *Salmonella* Serovars Isolated From Urban Drinkingwater Supply Systems of Nepal. *Letters in Applied Microbiology*.2007,44;588–594
- Bishop AL, Dougan G, Baker S.** The *Salmonella* Genom; A Global View, *Salmonella* Infections Clinical, Immunological and Molecular Aspects. New York, USA: Cambridge Univrsity Press,2006:117-145.
- Biswas R, Agarwal RK, Bhilegaonkar KN, Kumar A, Nambiar P, Rawat S, Singh M.**Cloning and sequencing of biyofilm-associated protein (*bapA*) gene and its occurrence in different serotypes of *Salmonella*. *Letters in Applied Microbiology* . 2011;52(2):138-143
- Boddicker J.D, Knosp B,** Transcription of the *Salmonella* Invasion Gene Activator, *hilA*, Requires HilD Activation in the Absence of Negative Regulators. *Journal of Bacteriology*, 2003,Vol. 185; 525-533.
- Boddicker JD, Ledeboer NA, Jagnow J, Jones BD, Cleg S.** Differential Binding to and Biyofilm Formation on, HEp-2 Cells by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium is Dependent Upon Allelic Variation in the *fimH* Gene of the *fim* Gene Cluster. *Molecular Microbiology*, 2002,Vol. 45(5);1255-1265.
- Branda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R.** Biyofilms: the Matrix Revisited. *Trends in Microbiology*, 2005,Vol. 13; pp. 20-26.

Çiftci A, Fındık A, Onuk EE, Savasan S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009; 40: 254–261.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.

D'aoust, JY, Maurer JJ. *Salmonella* species. In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Ed: Doyle, M.P, Beuchat, L.R. Asm press, 2007: 187-236.

De Keersmaecker SCJ, Sonck K. Vanderleyden J. Let LuxA Speak up in AI-2 Signalling. *Trends in Microbiology*, 2006, Vol. 14;114-119.

De OliveiraDCV, Fernandes JA, Kaneno R, Silva MG, Araújo JJP, Silva NCC, Rall VLM. Ability of *Salmonella* spp. to Produce Biofilm Is Dependent on Temperature and Surface Material. *Foodborne Pathogens and Disease*.2014,11(6):478-483.

Dolapçı İ. *Salmonella* Biyofilmleri, *Salmonella*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.59,2013;144-160.

Dolapçı İ. Moleküler Tiplendirim Yöntemleri, *Salmonella*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.59,2013;97-126.

Dolapçı İ, Erdem B. Sınıflandırmada Yeni Yaklaşımlar, *Salmonella*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.59, 2013,33-51.

Dong H, Peng D, Jiao X, Zhang X, Geng S , LiuX. Roles of the *spiA* gene from *Salmonella* Enteritidis in biofilm formation and virulence. *Microbiology*. 2011.157(6): 1798–1805.

Fortune DR, Suyemoto M, Altier C. Identification of CsrC and Characterization of its Role in Epithelial Cell Invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, 2006, Vol. 74;331-339.

Gedikoğlu S. Antijen Yapısı, *Salmonella*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.59,2013,65-72

Gedikoğlu S. *Salmonella* Türlerinin Mikrobiyolojisi, *Türkiye Klinikleri Enfeksiyon Hastalıkları Özel Sayısı*, 2013,6(2),1-6

Gibson DL, White AP, Snyder SD. *Salmonella* Produces an O-antigen Capsule Regulated by *agfD* and Important for Environmental Persistence. *Journal of Bacteriology*,2006(188):7722-7730.

Greetje AA. Castelijns. *Salmonella* Biofilms, PhDthesis, Wageningen University. Wageningen NL,2013,177

- Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M.** The White-Kauffmann-Le Minor scheme, *Research in Microbiology*, 2010, 161(1), 26-29
- Gülmez D.** Morfoloji, Kültür ve Biyokimyasal Özellikler, *Salmonella*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.59, 2013, 52-64.
- Gün İ. Ekinci FY.** Biyofilmler: Yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda Bülteni*, 2009; 34(3): 165-173
- Halatsi K, Oikonomou I, Lambiri M, Mandilara G, Vatopoulos A, Kyriacou A.** PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdiA*. *Microbiology Letters*, 2006. 259 (2); 201–207
- Hasegawa A, Hara-Kudo Y, Kumaga S.** Survival of *Salmonella* Strains Differing in Their Biofilm Formation Capability Upon Exposure to Hydrochloric and Acetic Acid and To High Salt. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2011(73): 1163-1168.
- Heffron F, Niermann G, Yoon H, Kidwai A, Brown RNE, McDermott JD, Smith R, Adkins J.** *Salmonella*, Secreted Virulence Factors, *Salmonella* From Genome to Function. Norfolk, UK: Caister Academic Press. 2011: 187-223.
- Hensel M.** Pathogenicity Islands and Virulence Of *Salmonella enterica*, *Salmonella* Infections Clinical, Immunological And Molecular Aspects. 1st ed. Cambridge University Press, 2006: 146-206.
- Herrera-León S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garaizar J, Echeita MA.** Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of *Salmonella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004(42): 2581-2586.
- Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A.** The *Salmonella* Invasin SipB Induces Macrophage Apoptosis by Binding to Caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 1999(96): 2396-2401
- Hidalgo GS, Valenzuela ML, Aréchiga NC, Guajardo SC, Salazar ML, Vázquez EM.** Identification of *bapA* in Strains of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* Isolated from Wild Animals Kept in Captivity in Sinaloa, Mexico, *Veterinary Medicine International* 2016, 6; 1-4
- Horton RA, Card RR, Randall R, Teale CJ.** Differentiation of UK endemic strains of *Salmonella enterica* serovar Newport from epidemic North American strains by PCR detection of a truncated *bapA* chromosomal gene. *Research in Veterinary Science*. 2016. 104; 113-116
- Jacobsen A, Hendriksen RS, Aarestrup FM, Ussery DW, Friis C.** The *Salmonella enterica* pangenome. *Microbial Ecology*, 2011, 62(3), 487-504

- Kumar CG , Anand SK.** Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*.1998 ;42(1-2):9-27.
- Lawhon SD, Maurer R, Suyemoto M, Craig A.**Intestinal Short-Chain Fatty Acids Alter *Salmonella* Typhimurium Invasion Gene Expression and Virulence Through BarA/SirA. *Molecular Microbiology*, 2002 Vol. 46(5);1451-1464.
- Malorny B, Hauser E, Dieckmann R.**New Approaches in Subspecies-level *Salmonella* Classification, *Salmonella* From Genome to Function. Norfolk, UK, Caister Academic Press,2011:1-25.
- Manijeh M, Muhammad J, Roha KK.** Biyofilm Formation by *Salmonella* Enteritidis on Food Contact Surfaces. *Journal of Biological Sciences*, 2008(8);502-505
- Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB.** *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection*, 2000. 2: 145–156.
- Miller MB, Bassler BL.** Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*,2001, Vol. 55;5733-5742.
- Minor LL, Kreig NL, Holt JG.** Bergey's Manual Systematic Bacteriology.2nd ed.Williams and Wilkins; Baltimore,1984:427-458
- Monark DM.**The İnflammasome: Akey Player in The İnflammation Triggered in Reponse to Bacterial Pathogenes. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*,2008;46(Suppl 1): 1-4.
- Moretro T, Vestby LK, Nesse LL, Storheim SE, Kotlarz K, Langsrud S.** Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology* 2009 Mar;106(3):1005-1012.
- Öngen B, Töreci K, Erdem B.** Türkiye’de İzolasyonu Bildirilen *Salmonella* Serovarları. *Salmonella*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.59,2013,19-32.
- Patrick AD,** Grimont and François-Xavier Weill. World Health Organization. Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Antigenic Formulae of the *Salmonella* 2007 9th ed.
- Perçin D,** Serotiplendirme, *Salmonella*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.59,2013,73-83.
- Prouty AM, Schwesinger WH, Gunn JS.** Biyofilm Formation and Interaction With the Surfaces of Galistones by *Salmonella* spp. *Infection and Immunity*,2002(70):2640-2649
- Riley LW.** Molecular Epidemiology of Infectious Diseases Principles and Practices. Washington, USA: ASM Press,2004.

- Römbling U.** Characterization of the rdar Morphotype, a Multicellular Behaviour in Enterobacteriaceae. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, Vol. 62(11);1234-1246.
- Römbling U.** Molecular Biology of Cellulose Production in Bacteria, *Research in Microbiology* 2002, Vol. 153;205-212.
- Sharma İ, Das K.** Detection of invA Gene in Isolated *Salmonella* from Marketed Poultry Meat by PCR Assay. *Journal of Food Processing and Technology*. 2016, 7,3;1-4
- Sırıken B.** *Salmonella* Patojenite Adaları. *Mikrobiyoloji Bülteni*.2013; 47(1): 181-188
- Solano C. García B. Valle J. Berasain C. Ghigo J.** Genetic Analysis of *Salmonella* Enteritidis Biofilm Formation: Critical Role of Cellulose. *Molecular Microbiology*,2002,Vol. 43(3);793-808.
- Soni KA, Jesudhasan PR, Cepeda M, Williams, B, Hume. M, Russell, WK, Jayaraman A, Pillai SD.** Autoinducer AI-2 is Involved in Regulating a Variety of Cellular Processes in *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease*,2008,Vol. 5;147-153.
- Starkey M, Gray KA, Chang SI, Parsek M.** The EPS Matrix of Bacterial Biofilms, ASM Pres.2004;174-191.
- Stoodley P, Cargo R, Rupp CJ, Wilson S, Klapper I.** Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002;29; 361-367.
- Sunar NM, Stentiford E I, Stewart D I, Fletcher L A.** Molecular techniques to characterize the invA genes of *Salmonella* spp. for pathogen inactivation study in composting. *Orbit*.2010;1-10
- Suzuki K, Wang X, Weilbacher T, Pernestig AK, Melefors O, Georgellis D, Babitzke P. Romeo T.** Regulatory Circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY Systems of Escherichia Coli. *Journal of Bacteriology*, 2002, Vol. 184;5130-5140.
- Taga ME, Miller ST, Bassler BL.** Lsr-Mediated Transport and Processing of AI-2 in *Salmonella* Typhimurium, *Molecular Microbiology*, 2003, Vol. 50;1411-1427.
- Tekeli A.** Faj Tiplendirimi ve Profajlar. *Salmonella*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.59,2013,84-96.
- Teplitski M, Ahmer BM.** The control of secondary metabolism, motility, and virulence by the two-component regulatory system BarA/SirA of *Salmonella* and other c-proteobacteria. In *Global Regulatory Networks in Enteric Bacteria*,2004;107-133
- Teplitski M, Goodier RI. Ahmer BM.** Catabolite Repression of the SirA Regulatory Cascade in *Salmonella* Enterica. *Journal of Medicinal Microbiology*,2006,Vol. 296; 446-466.

- Teplitski M, Goodier RI, Ahmer BM.** Pathways leading from BarA/SirA to Motility and Virulence Gene Expression in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 2003 Vol. 185; 7257-7265.
- Threlfall EJ.** *Salmonella*. İn: Borriello P, Murray PR, Funke G, Microbiology and Microbial Infections. Bacteriology vol.3.10th ed. London, 2005; 1398-1399
- Tomenius H, Pernestig AK, Méndez-Catalá CF, Georgellis D, Normark S, Melefors Ö.** Genetic and Functional Characterization of the *Escherichia coli* BarA-UvrY Two-Component System: Point Mutations in the HAMP Linker of the BarA Sensor Give a Dominant-Negative Phenotype. *Journal of Bacteriology*, 2005, Vol. 187(21); 7317-7324.
- Töreci K.** Tarihçe, Sınıflandırma ve İsimlendirme, *Salmonella*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.59, 2013; 1-18
- Töreci K, Erdem B, Öngen B.** Türkiye’de İzolasyonu Bildirilen *Salmonella* Serovarları. *Salmonella*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.59, 2013, 19-32
- Turki Y, Mehr I, Ouzari H, Khessairi A, Hassen A.** Molecular typing, antibiotic resistance, virulence gene and biofilm formation of different *Salmonella* Enterica serotypes. *The Journal of General and Applied Microbiology* 2014; 60(4): 123-30.
- Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu.** Ulusal Mikrobiyoloji Standartları *Salmonella* Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı. 2015; 14
- Us E.** *Salmonella* Virülens Faktörleri. *Salmonella*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.59, 2013, 97-126.
- Walters M.** Sperandio V. Quorum Sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2006, Vol. 296; 125-131.
- Wang H, Dong Y, Wang G, Xu X, Zhou G.** Effect of growth media on gene expression levels in *Salmonella* Typhimurium biofilm formed on stainless steel surface. *Food Control*. 2016, 59; 546-552
- Wassenaar TM, Gastra W.** Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 201: 1–7.
- Wattiau P, Boland C, Bertrand S.** Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. Enterica subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and Environmental Microbiology* 2011(77): 7877-7885

Wei BL, Brun-Zinkernagel AM, Simecka JW, Pruss BM, Babitzke P, Romeo T.Positive Regulation of Motility and flhDC Expression by the RNA-Binding Protein CsrA of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2001,Vol. 40;245-256.

Wick MJ. Monocyte and Dendritic Cell Recruitment and Activation During Oral *Salmonella* Infection. *Immunology Letters*,2007(112);68-74.

Winokur PL. Molecular Epidemiological Techniques for *Salmonella* Strain Discrimination. *Frontiers in Bioscience*, 2003(8):14-24

York M,Rodrigues-Wong P.Fecal Culture for Aerobic Pathogens of Gastroenteritis, Clinical Microbiology Procedures Handbook, Washington DC: ASM Press,2004:3.8.1.1-8.1.21.

WEB_1.(2015). **MPKB.**Autoimmunity Research Foundation.

[http://mpkb.org/home/pathogenesis/microbiota/Biyofilm.2\(21.08.2017\)](http://mpkb.org/home/pathogenesis/microbiota/Biyofilm.2(21.08.2017))

WEB_2.(2013). **Yardımcı H.** <http://docplayer.biz.tr/12.551.479-Salmonella-kontaminasyonunda-biyofilmin-onemi.html>.2013

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı: DOYURAN ,Eyüp Salih

Uyruk: T.C

Doğum yeri ve tarihi: Aydın 04.06.1961

Telefon: 0 506 5829227

E-mail: eyupsd@gmail.com

Yabancı Dil: Fransızca ve İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2013
Lisans	EÜ Tıp Fakültesi	1988
Lise	Aydın Lisesi	1978

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
1988	Sağlık Bakanlığı	Doktor