

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**TÜRKİYE’DE PATOJENİK *Yersinia enterocolitica*
İZOLASYONU VE *In Vivo* KOŞULLARDAKİ
LİPOPOLİSAKKARİT GENLERİNİN
EKSPRESYONU**

Elif BOZÇAL

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ataç UZEL

2. Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mikael SKURNİK

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.01.04

Sunuş Tarihi: 26.05.2015

Bornova-İzmir

2015

Elif BOZÇAL tarafından DOKTORA TEZİ olarak sunulan “Türkiye’de patojenik *Yersinia enterocolitica* izolasyonu ve *in vivo* koşullardaki lipopolisakkarit genlerinin ekspresyonu” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 26.05.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında adayoybirliği..... ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Ataç UZEL

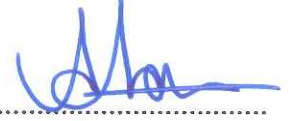
Raportör Üye : Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

Üye : Doç. Dr.E.Esin HAMEŞ

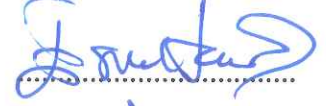
Üye : Doç. Dr. Halil BIYIK

Üye : Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN

İmza











EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi/Doktora Tezi olarak sunduğum “**Türkiye’de patojenik *Yersinia enterocolitica* izolasyonu ve in vivo koşullardaki lipopolisakkarit genlerinin ekspresyonu**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

26 /05/ 2015

İmzası

Adı-Soyadı

Elif BOZÇAL

ÖZET

**TÜRKİYE’DE PATOJENİK *Yersinia enterocolitica* İZOLASYONU
VE *In Vivo* KOŞULLARDAKİ LİPOLİSAKKARİT
GENLERİNİN EKSPRESYONU**

BOZÇAL, Elif

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Ataç UZEL

2. Danışman: Prof. Dr. Mikael SKURNİK

Mayıs 2015, 138 sayfa

Yersinia enterocolitica Türkiye’de çok nadiren karşılaşılan gıda kaynaklı bir patojendir. Bu çalışmada Türkiye’nin İzmir bölgesinden toplanan çeşitli insan, domuz ve çevresel örnekler farklı kültürasyon ve zenginleştirme metotları kullanılarak *Y. enterocolitica* varlığı açısından test edilmiştir. Toplam olarak dokuz adet patojenik *Y. enterocolitica* suşu izole edilmiştir; 5 suş domuz dışkı ve gübre örneklerinden, 4 suş ise atık su örneklerinden saptanabilmiştir. Diğer taraftan, diyare teşhisi konulmuş 102 hastanın dışkı örneklerinden ve körfez, kanal, belediye havuz ve çeşme suyu olmak üzere 12 örnekte *Y. enterocolitica* suşları izole edilememiştir. Dokuz adet *Y. enterocolitica* suşunun biyokimyasal ve serolojik karakterizasyonu sonucu suşların üç farklı biyoserotipe ait olduğu ortaya konulmuştur: 4/O:3, 2/O:9 ve 2/O:5,27. Saptanan *Y. enterocolitica* suşları; *ystA*, *ystB*, *yadA*, *virF/lcrF* ve *ail* virülens faktörlerine özgü PCR ve fenotipik patojenite analizlerine dayandırılarak patojen olarak belirlenmişlerdir. İzmir bölgesinden; domuz ve atık su örneklerinde, patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının tespit edilmesi *Y. enterocolitica* suşlarının halk sağlığı için potansiyel risk olduğunu göstermektedir.

Lipopolisakkarit *Y. enterocolitica* suşları için en önemli virülens belirteçlerinden biridir. Sıcaklık *Y. enterocolitica* suşlarının çoğu serotipinde olmasa bile birçok virülens faktör genlerinin regülasyonunu sağlamaktadır. Dolayısı ile lipopolisakkarit genlerinin *in vivo* koşullardaki regülasyonunu anlamak; konak ve patojen arasındaki etkileşimin çözülmesine yardımcı olacaktır. Reporter genler,

ilgili promotorların kontrolü altında analiz edilecek bir proteini kodlayan genlerin transkripsiyonunu indirekt olarak anlamak için kullanılmaktadır. Bu kapsamda, *Y. enterocolitica* O:3 serotipine ait lusiferaz reporter suşları dizayn edilmiştir. Öncelikle lusiferaz substrat biyosentezini yöneten *luxCDE* genlerini içeren YeO3-LuxCDE suşu oluşturulmuştur. Daha sonra lusiferaz kodlayan *luxAB* kasedi YeO3-LuxCDE genomuna, O-antijen ve outer core gen bölgelerinin promotorlarının akışaşağı bölgesine yerleşecek şekilde eklenmiştir. *In vitro* koşullarda, outer core reporter suşu, oda sıcaklığına göre 37°C’de daha fazla ifade olurken, O-antijen reporter suşunun ise oda sıcaklığında daha fazla ifade edilmektedir. Balb/c fare modelleri bu reporter suşlar ile outer core ve O-antijen genlerinin enfeksiyon sırasında hangi dokularda ifade olduğunu belirlemek için enfekte edilmişlerdir. Ölçümler IVIS spektrum cihazı ile yapılmış ve enfeksiyonun 5. güne kadar indirekt mRNA ifadesi gözlemlenmiştir. Enfeksiyon sonrasında outer core ve o-antijenin özellikle sindirim sisteminde aktif olarak ifadesinin gerçekleştiği ve 5. gün sonrasında reporter suşlarının kemik iliğine kadar yayıldıkları gözlenmiş ve LPS’in patogenezdaki önemi vurgulanmıştır.

Anahtar sözcükler: *Yersinia enterocolitica*, domuz çiftliği, atık su, LPS, diyare, PCR, LuxCDABE, IVIS spektrum, Outer core, O-antijen, *in vivo* gen ifadesi

ABSTRACT**ISOLATION OF PATHOGENIC *Yersinia enterocolitica* IN TURKEY
AND EXPRESSION OF LIPOPOLYSACCHARIDE GENES *In Vivo***

BOZCAL, Elif

PhD Thesis, Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Atac UZEL

Co-Supervisor: Prof. Dr. Mikael SKURNIK

May 2015, 138 pages

Yersinia enterocolitica is a food-borne pathogen that is very rarely encountered in Turkey. In this work, several human, porcine and environmental samples collected from Izmir region in Turkey were examined for the presence of *Y. enterocolitica* using different cultivation and enrichment methods. A total of nine pathogenic *Y. enterocolitica* strains were isolated; five strains from pig stool and manure samples and four strains from waste water samples. On the other hand, no *Y. enterocolitica* was isolated from human diarrheal stool samples (n=102) and from 12 gulf, canal, municipal pool and well water samples. Biochemical and serological characterization of the 9 *Y. enterocolitica* strains revealed that they belonged to three different bioserotypes: 4/O:3, 2/O:9, and 2/O:5,27. All the strains were deemed pathogenic based on based on *ystA*, *ystB*, *yadA*, *virF/lcrF* and *ail* virulence factors specific PCR and phenotypic pathogenicity analysis. Detection of pathogenic *Y. enterocolitica* strains from the pig and waste water samples from the Izmir region indicates that *Y. enterocolitica* is a potential risk for public health.

Lipopolisaccharide is one of the most significant virulence determinants of *Y. enterocolitica* strains. Temperature regulates most if not all virulence factor genes of *Y. enterocolitica* including lipopolysaccharide and working of the expression of LPS genes *in vivo* during infection is essential to get understanding and solving on the interactions between a bacterium and host. Reporter genes are used to monitor transcription indirectly by inserting genes that encode an assayable protein under the control of promoters of interest. In our project, we constructed

luciferase reporter strains of *Y. enterocolitica* serotype O:3. We first constructed a strain YeO3-LuxCDE where the *luxCDE* genes direct the biosynthesis of luciferase substrate. Then the luciferase-encoding *luxAB* cassette was introduced into the YeO3-LuxCDE genome fused downstream of the O-antigen and outer core gene cluster promoters. While the outer core reporter strain was expressed at 37°C than at room temperature, the O-antigen reporter strain was expressed at room temperature than 37°C. Balb/c mice were infected by these reporter strains to determine in which tissues the *luxAB* genes were expressed during infection. The measurements were done by IVIS spectrum and indirect mRNA expression was screened until 5. days of post-infections. The outer core and O-antigen were expressed in intestinal system especially followed by the infection and it was observed that the reporter strains spread even bone marrow after 5. days-post infection and the importance of LPS was emphasized in pathogenesis.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, pig farm, wastewater, LPS, diarrhea, PCR, LuxCDABE, IVIS spectrum, Outer core, O-antigen, *in vivo* gene expression

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisansa başladığım günden itibaren bana destek olan, tüm çalışmalarında beni yönlendiren, hiçbir zaman yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Değerli Hocam ve Danışmanım Sayın Prof. Dr. Ataç UZEL'e ve doktora eğitimim sırasında bana uluslararası eğitimimin kapılarını aralayan 2. Danışmanım, Helsinki Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Mikael SKURNİK'e teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üye'lerinden Sayın Prof. Dr. Şöhret AYDEMİR'e, tezime yapmış olduğu katkılardan dolayı ve doktora projemizin fare denemelerini gerçekleştirdiğimiz Ege Üniversitesi, ARGEFAR, Faz Öncesi Araştırmaları Birimine ayrıca teşekkürlerimi sunuyorum. Tüm Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki hocalarıma ve arkadaşlarıma da teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca, yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen **Aileme** minnet ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fon Saymanlığı (13/Fen/002), Finlandiya Hükümeti Doktora Araştırma Fonu (CIMO) ve Avrupa Mikrobiyoloji Toplulukları (FEMS) Doktora Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1. <i>Yersinia enterocolitica</i>	5
2.1.1. Tarihçe	5
2.1.2. Taksonomi	6
2.1.3. Mikrobiyolojisi ve sınıflandırılması	6
2.1.4. İzolasyonu ve tanılanması	8
2.1.5. Epidemiyolojisi ve Rezervuarı	11
2.1.6. Patogenez	12
2.1.7. Virülens faktörler	14
2.1.8. Neden olduğu hastalıklar	20
2.1.9. Antimikrobiyal tedavi	20
2.2. <i>In Vivo</i> Koşullarda Bakteriyel Gen İfadesinin ölçülmesi	21
2.2.1. <i>In vivo</i> koşullarda bakteriyel mRNA seviyesinin indirekt olarak izlenmesi için reporter sistemler	21
2.3. <i>In Vivo</i> Moleküler Görüntüleme	23
2.3.1. Optik görüntüleme	23
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Materyal	27
3.1.1. İzolasyon Kaynakları	27
3.1.2. Bakteriyel suşlar ve plazmitler	27
3.1.3. Besiyerleri	31
3.1.4. Çözelti, tampon ve enzimler	42
3.1.5. Primerler	48

İÇİNDEKİLER (Devam)

3.2. Metot	52
3.2.1. İnsan dışkı örneklerinden <i>Y. enterocolitica</i> izolasyonu	52
3.2.2. Domuz dışkısı ve domuz gübresinden <i>Y. enterocolitica</i> izolasyonu	53
3.2.3. Su kaynaklarından <i>Y. enterocolitica</i> izolasyonu	54
3.2.4. Atık su arıtma tesislerinden <i>Y. enterocolitica</i> izolasyonu	56
3.2.5. <i>Y. enterocolitica</i> suşlarının tanılanması	57
3.2.6. <i>Y. enterocolitica</i> suşlarının biyotiplendirilmesi ve fenotipik patojenite Testleri	58
3.2.7. DNA izolasyonu ve PCR	60
3.2.8. <i>Y. enterocolitica</i> suşlarının serotiplendirilmesi	62
3.2.9. <i>Y. enterocolitica</i> suşlarının lipopolisakkarit (LPS) profillerinin belirlenmesi	63
3.2.10. <i>Y. enterocolitica</i> O:3 Suşu Kullanılarak luxCDABE Reporter Sisteminin Oluşturulması	64
3.2.11. Suicide vektörlerin Konjugasyon ile Mobilizasyonu ve Mutant Suşların İzlenmesi	70
3.2.12. Sükroz seleksiyonu	70
3.2.13. <i>İn-Vitro</i> Biyoluminesens Ölçümleri	72
3.2.14. <i>İn-Vivo</i> Biyoluminesens Ölçümü	73
4. BULGULAR	76
4.1. İnsan Dışkı Örneklerinden patojenik <i>Y. enterocolitica</i> İzolasyonu	76
4.2. Domuz Dışkı ve Domuz Gübre Örneklerinden <i>Y. enterocolitica</i> İzolasyonu	85
4.3. Su Kaynaklarından <i>Y. enterocolitica</i> İzolasyonu ve Tanınması	89
4.4. Atık Su Arıtma Tesislerinden <i>Y. enterocolitica</i> İzolasyonu	90
4.5. <i>Y. enterocolitica</i> Suşlarının Fenotipik ve Genotipik Tanınması	93
4.6. <i>Y. enterocolitica</i> Suşlarının Biyotiplendirilmesi ve Fenotipik Patojenite Testleri	94
4.7. <i>Y. enterocolitica</i> Suşlarının Serotiplendirilmesi	95
4.8. <i>Y. enterocolitica</i> Suşlarının Genotipik Olarak Serotiplendirilmesi	94
4.9. Kromozom ve Plazmit Aracılı Virülens Genlerinin Saptanması	96

İÇİNDEKİLER (Devam)

4.10. <i>Y. enterocolitica</i> suşlarının LPS Profillerinin Belirlenmesi	100
4.11. <i>In Vitro</i> Koşullarda Lusiferaz Reporter Suşların (lux_{poc} ve lux_{pop1}) Biyolüminesens Analizi	101
4.11.1. Lusiferaz reporter suşlarının (lux_{poc} ve lux_{pop1}) biyolüminesens (RLU) arasındaki korelasyonu ve büyüme eğrisi	101
4.11.2. Lusiferaz reporter suşlar (lux_{poc} ve lux_{pop1}) ile Doğal Tip <i>Y. enterocolitica</i> O: 3 suşunun korelasyonu.....	102
4.12. <i>In Vivo</i> Biyolüminesens Analizi	104
4.4.1. IVIS Spektrum	104
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	113
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	126
ÖZGEÇMİŞ	138

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. CR-MOX besiyerinde oluşan <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 (24 saat, 37°C).....	10
2.2. <i>Y. enterocolitica</i> patojenite mekanizması	14
2.3. <i>Yersinia</i> Tip 3 sekresyon sisteminin (Ysc T3SS) yapısal organizasyonu.....	16
2.4. Optik görüntüleme kullanılarak gen ifadesinin izlenmesi için promotor-reporter gen inşası ve optik görüntüleme.....	24
3.1. İnsan dışkı örneklerinden <i>Y. enterocolitica</i> izolasyon akış şeması.....	53
3.2. Domuz dışkısı ve domuz gübresinden <i>Y. enterocolitica</i> izolasyon akış şeması.....	54
3.3. Su kaynaklarından <i>Y. enterocolitica</i> izolasyon akış şeması.....	55
3.4. Atık su arıtma tesislerinden <i>Y. enterocolitica</i> izolasyonu.....	56
3.5. MALDI-TOF/VITEK®MS.....	57
3.6. luxAB reporter sisteminin oluşturulması (A).....	66
3.7. luxCDE reporter sisteminin oluşturulması (B).....	67
3.8. luxCDABE reporter sisteminin oluşturulması (C).....	68
3.9. luxCDABE reporter sisteminin oluşturulması (D).....	69
3.10. Sükroz seleksiyonu.....	71
3.11. IVIS Spektrum.....	75
4. 1. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastane'sine kayıtlı diyare teşhisi koyulmuş 102 hastanın departmanı ve cinsiyetine göre dağılımı.....	76
4.2. A2-22 No'lu <i>Y. enterocolitica</i> izolatının CIN agar besiyerindeki saf kültür morfolojisi ve Gram reaksiyonu	93
4.3. <i>Y. enterocolitica</i> izolatlarının ail (bağlanma ve iznvazyon lokusu) ve 16S rRNA bölgelerinin dubleks PCR ile amplifikasyonu	94
4.4. A1-1 ve AS-11-47 No'lu <i>Y. enterocolitica</i> izolatlarının, <i>Y. enterocolitica</i> suşlarına spesifik fajlar ile fenotipik olarak serotiplendirilmesi.....	95
4.5. <i>Y. enterocolitica</i> suşlarının genotipik olarak serotiplendirilmesi	96
4.6. <i>Y. enterocolitica</i> transkripsiyonel aktivatör.....	97
4.7. <i>Y. enterocolitica</i> izolatlarında plazmit aracılı kodlanan <i>yadA</i> gen.....	97
4.8. <i>Y. enterocolitica</i> sıcaklık stabil <i>ystA</i> enterotoksin geni.....	98
4.9. Bu çalışmada izole edilmiş olan <i>Y. enterocolitica</i> suşlarının LPS profilleri.....	100

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.10. İn vitro koşullar altında luxpoc ve luxpop1 reporter suşlarının zamana ve sıcaklığa bağlı olarak büyüme ve biyoluminesens korelasyonu	102
4. 11. İn vitro koşullar altında lux _{poc} ve lux _{pop1} reporter suşlarının oda sıcaklığı (A) (25°C) ve 37 °C'deki (B) büyüme koşullarındaki <i>Y. enterocolitica</i> O:3 WT suşu ile korelasyonu.....	103
4.12. İn-vitro koşullarda 1,1x10 ⁵ cfu/ml'deki reporter suşunun luminesens renk skalası ve IVIS Min renk Skalası.....	105
4.13. lux _{poc} reporter suşunda desferal ve salin grubu olarak enfeksiyonun 1. saati, IVIS spektrum ile biyoluminesens ölçümü (p/sec/cm ² /sr)	105
4.14. lux _{pop1} reporter suşunda desferal ve salin grubu olarak enfeksiyonun 1. saati, IVIS spektrum ile biyoluminesens ölçümü (p/sec/cm ² /sr)	106
4.15. lux _{pop1} ve lux _{poc} reporter suşlarında desferal ve salin grubu olarak enfeksiyonun 1. günü, IVIS spektrum ile biyoluminesens ölçümü (p/sec/cm ² /sr)	107
4.16. lux _{pop1} ve lux _{poc} reporter suşlarında desferal ve salin grubu olarak enfeksiyonun 5. günü, IVIS spektrum ile biyoluminesens ölçümü (p/sec/cm ² /sr)	108
4.17. lux _{poc} reporter suşunun desferal ve salin grubu olarak enfeksiyonun 5. günü; lenf nodu, karaciğer, dalak, peyer plakları ve sindirim sisteminin IVIS spektrum ile biyoluminesens ölçümü (p/sec/cm ² /sr)	109
4.18. lux _{pop1} reporter suşunun desferal ve salin grubu olarak enfeksiyonun 5. günü; lenf nodu, karaciğer, dalak, peyer plakları ve sindirim sisteminin IVIS spektrum ile biyoluminesens ölçümü (p/sec/cm ² /sr)	110
4.19. lux _{poc} reporter suşunun enfeksiyon sonrası sindirim sistemi ve dalakta doku homojenizasyonu sonrası bakteriyel yükün belirlenmesi için CIN agar besiyerine inokülasyonu	111
4.20. lux _{poc} ve lux _{pop1} reporter suşlarının 5. gün enfeksiyon sonrası; sindirim sistemi, mezenterik lenf nodu, peyer plakları, dalak ve karaciğerdeki bakteriyel yükün belirlenmesi	112

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

2.1. Biyokimyasal reaksiyonlara göre <i>Y. enterocolitica</i> suşlarının sınıflandırılması.....	11
3. 1. İzolasyon kaynakları ve örnek sayısı	27
3.2. Lusiferaz reporter sisteminin dizaynı sırasında kullanılan bakteriyel suşlar ve plazmitler.....	28
3.3. Kromozom ve plazmit aracılı kodlanan virülens genlerini ve o-antijen spesifik genleri kodlayan primerler	49
3. 4. Lusiferaz reporter sistem için kullanılan primerler	50
3.5. Fenotipik biyotiplendirme referans tablosu	58
4.1. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi diyare hastalarına ait dışkı örneklerinden <i>Y. enterocolitica</i> izlasyonu ve fenotipik tanılama analizleri.....	77
4.2. Domuz dışkı ve domuz gübre örneklerinden patojenik <i>Y. enterocolitica</i> izolasyonu ve fenotipik tanılama analizleri	86
4.3.Su kaynaklarından patojenik <i>Y. enterocolitica</i> izolasyonu ve fenotipik tanılama analizleri.....	89
4.4. Atık su arıtma tesislerinden <i>Y. enterocolitica</i> izolasyonu ve tanılanması.....	90
4. 5. Fenotipik ve genotipik yöntemler ile tanılanan <i>Y. enterocolitica</i> suşlarının izolasyon kaynağı, örnekleme zamanı ve materyal sayısı ve izolasyon yüzdeleri	94
4. 6. <i>Y. enterocolitica</i> suşlarının biyoserotiperi, izolasyon kaynakları, izolasyon metotları ve virülens belirteçleri.....	98
4.7. Biyokimyasal testler ve MALDI-TOF [®] MS ile tanılanan <i>Yersinia</i> -benzeri suşların izolasyon materyali ve kaynağına göre dağılımları.....	99

1. GİRİŞ

Gram negatif bir bakteri olan *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia* genusuna ait ve oldukça geniş bir dağılım gösteren zoonotik ve önemli patojendir. *Enterobacteriaceae* familyasına dahildir ve insan için önemli *Y. enterocolitica* dışında iki türü daha bulunmaktadır: bunlar, veba etkeni olan *Yersinia pestis* ve tüberküloz etkeni *Yersinia pseudotuberculosis*'dir. Ayrıca, patojen olmayan birçok türü de bulunmaktadır (Efsa, 2007; Valentin-Weigand et al., 2014). İnsan patojeni olan türleri genellikle lenfoid dokuları tercih etmektedir fakat farklı rezervuarları kullanarak insanlarda farklı klinik semptomlara neden olmaktadır (Handley et al., 2004).

1960'lı yılların başından beri *Y. enterocolitica*, gelişmekte olan ülkelerde önemli bir yersiniosis etkeni olarak tanımlanmıştır. Yersinyozis dünyanın birçok bölgesinden rapor edilmiştir ve *Y. enterocolitica* en sık gözlenen (%91,0) *Yersinia* türü olarak belirlenmiştir (Efsa, 2012). Kampilobakteriyozis ve salmonellosisden sonra Avrupa'da en sık gözlenen üçüncü gıda kaynaklı enteritidis etkeni olarak bilinmektedir (Fredriksson-Ahomaa and Korkeala, 2003). Yersinyozis sonuçları ise akut enfeksiyon, yalancı apandisit, reaktif arterit gibi oldukça ciddi sağlık problemleri oluşturur ve bu durum finansal problemlerin yanı sıra halk sağlığını da riske atmaktadır (Nesbakken, 2013). Bu yüzden *Y. enterocolitica* suşlarının enfeksiyonunun önlenmesi için, gıda zinciri gibi bulaşma yollarına dikkat edilmesi ve olası rezervuar kaynaklarının izlenmesi gerekmektedir.

Y. enterocolitica ve ilişkili türlerin 70'den fazla serotipi, lipopolisakkarit (LPS) tabakasının O-antijen yapısına göre gruplandırılmıştır. Patojenik *Y. enterocolitica* suşları genellikle O:3, O:8, O:5,27 ve O:9 serotipleri ve 1B, 2, 3, 4 ve 5 biyotipleri olarak gruplandırılmaktadır. Biyotip 1A grubu genellikle patojen değildir ve doğada sucul ve hayvansal rezervuarlarda sıklıkla saptanmaktadır fakat *Y. enterocolitica* suşlarının bazı 1A biyotiplerinin insanlarda klinik hastalığa sebep oldukları rapor edilmiştir (Drummond et al., 2012). Ayrıca, *Y. enterocolitica* 1A suşları farklı patojenik suşlar ile iki farklı filogenetik ilişki göstermektedir ve insan komplement serumuna direnç göstermektedir (Sihvonen et al., 2012).

Patojenik *Y. enterocolitica* suşları insanlara fekal-oral yol ile bulaşmaktadır. Sığır, koyun, kümes hayvanları, balık, geyik, küçük kemiriciler, kediler ve köpekler gibi diğer hayvan türlerinden patojenik suşlar saptanmışsa da, insanlarda enfeksiyona neden olan patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının temel rezervuarını domuzlar oluşturmaktadır (Denis et al., 2011). Domuzlar patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının sağlıklı taşıyıcılarıdır özellikle 4/O:3, 2/O:5,27, 2/O:9 ve 1B/O:8 biyoserotipleri sıklıkla domuzların ağız boşluğu, dil, dışkı ve bademciklerinden izole edilebilmektedir. *Y. enterocolitica* ayrıca sucul ve hayvansal rezervuarlarda oldukça yaygın olduğundan dolayı su kaynaklarının genel kontaminasyon sebebidir (Bottone, 1997). *Y. enterocolitica* aynı zamanda göl ve dere gibi doğal su kaynaklarından vahşi veya evcil hayvanların fekal kontaminasyonu sonucu da saptanabilmektedir (Nesbakken, 2013; Steven L. Percival and Williams, 2014). Türkiye’de patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının çeşitli kaynaklardan izolasyon çalışması daha önce gerçekleştirilmiş ancak patojenik suşların insan, gıda ve çevresel kaynaklardan rutin analizi yapılmamıştır. Gıda kaynaklı *Y. enterocolitica* suşlarının izolasyonu amaçlı Türkiye’de gerçekleştirilen iki çalışma bulunmaktadır. Bunlardan ilki; çiğ süt ve peynir örneklerinden *Y. enterocolitica* suşlarının saptanmasıdır (Yucel ve Ulusoy, 2006). Diğer ise Ankara’da satışa sunulan tavuk eti örneklerinden kültürel ve immunomanyetik yöntemler kullanılarak *Y. enterocolitica* suşlarının saptanmasına yönelik çalışmadır (Mercanoglu ve Aytaç, 2006).

Klinik olarak; yersiniosis etkeni olan *Y. enterocolitica* İstanbul’da tip I diyabet hastasından izole edilerek olgu sunumu olarak rapor edilmiştir (Mert vd., 2011). Akdeniz ve arkadaşları, Van ve yöresinde dışkı kültüründen *Y. enterocolitica* saptayabilmişlerdir (Hayrettin Akdeniz ve Demiröz, 2001). Ayrıca Elazığ’da, Özden ve arkadaşları periton diyaliz tedavisi gören bir hastada *Y. enterocolitica* suşu izole etmişlerdir (Özden vd., 2012).

Avrupa, Amerika ve Çin ile karşılaştırdığımızda domuz çiftçiliği ve domuz eti üretimi Türkiye’de birkaç domuz çiftliği dışında yoktur. Türkiye Gıda ve Tarım Bakanlığı raporuna göre, şu anda kayıtlı 3 adet domuz çiftliği bulunmaktadır, bunlardan iki tanesi Antalya’da ve bir tanesi ise İzmir’dedir. Türkiye’de çeşitli kaynaklardan patojenik *Y. enterocolitica* insidansının saptanmasına yönelik çalışmaların yetersizliğinden dolayı, Türkiye’deki yersiniosis riski belirsiz bir

durumdur. Bu bilgiler ışında araştırmamızın birinci amacı; yersiniosis risk potansiyelini saptamak için İzmir'deki diyare hastalarının dışkı örneklerinden, domuz çiftliğindeki domuz dışkısı ve gübresinden ayrıca; körfez, kanal, havuz ve atık su örneklerinden patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının izolasyonu, tanılanması ve moleküler karakterizasyonudur.

pYV plazmidi *Y. enterocolitica* suşlarının virulansında oldukça önemlidir. Tip III sekresyon sistemi, adezyon ve YadA gibi virülens belirteçlerinin ifadesi ise pYV plazmidi aracılığı ile gerçekleşmektedir. Kromozom aracılı kodlanan virülens belirteçleri ise bağlanma ve invazyon lokusu, invazin, Myf antijeni, YstA ve YstB enterotoksini, lipopolisakkarit ve üreazdır (Biedzka-Sarek et al., 2005; Rakin et al., 2015). Lipopolisakkarit (LPS), Gram negatif bakterilerde dış membran bileşenini oluşturmaktadır ve üç ana kısımdan oluşmaktadır: lipid A, outer-core ve O-antijen. O-antijen, bakterinin hücre yüzeyinde bulunan kompleks polisakkarit yapısıdır ve suştan suşa farklılık göstermektedir (Beczala et al., 2012; Chaput et al., 2013). Lipid A; hekza-asetilenmiş disakkarit; outer-core bileşeni ise oligosakkarit yapısından oluşmaktadır. Lipid A, en etkili bağışıklık reseptörü olan Toll-like Receptor (TLR4) ile etkileşime girmektedir. Bakteriyel enfeksiyon sırasında TLR4 aracılı LPS tanıma sistemi konak hücrenin antimikrobiyal savunmasının aktifleşmesini sağlamaktadır. O-antijen bakteriyel serotiplendirmenin temelini oluşturmaktadır ve sistemik enfeksiyon sırasında serum komplement sisteminin aktivasyonunda direnç göstermektedir (Duerr et al., 2009). Outer core bileşeni enfeksiyon sırasında patojen bakterinin epitel hücreye girişinde etkilidir (Hoare et al., 2006).

Moleküler görüntüleme aracılığı ile *in vivo* koşullardaki endirekt mRNA seviyesi noninvasif ve tekrarlanabilir bir şekilde ölçülebilmektedir. Bu amaçla belirli bir promotor kontrolü altında hedef genin uygun bir vektöre aktarılması ifadesinin izlenmesi amacıyla lusiferaz, yeşil floresan protein ve β -galaktosidaz reporter genleri kullanılmaktadır. Ayrıca reporter genler ile transkripsiyonel regülasyon yol izleri ve çeşitli biyolojik süreçler de araştırılmaktadır (Gross and Piwnicka-Worms, 2005). Biyoluminesans görüntüleme teknolojisi ise özellikle hücre içi ve hücre dışı patojenlerin enfeksiyon sırasında endirekt olarak takip edilmesini kolaylaştırmaktadır. Bunun için ateşböceği, *Renilla reniformis* ya da bakteri orijinli (*Photobacterium*

luminescens) lusiferaz enzimi kullanılarak lusiferaz reporter sistemler dizayn edilmektedir (Massey et al., 2011) .

Y. enterocolitica suşlarında LPS regülasyonu sıcaklığa bağlı olarak değişkenlik göstermektedir ve *in vivo* koşullar altında LPS gen ifadesinin anlaşılabilmesi konak patojen arasındaki etkileşimleri anlamamıza yardımcı olacaktır. LPS'in önemli bileşenlerinden O-antijen ve outer core yapılarının sıcaklık aracılı regülasyon mekanizması ve patojenezdeki rolü çok iyi anlaşılamadığından LPS'in enfeksiyon sırasındaki biyolojik aktivitesinin araştırılması gerekmektedir. Bu amaçla araştırmamızın ikinci amacı olarak *Y. enterocolitica* O:3 suşunun genomuna entegre edilmiş lusiferaz reporter gen kaseti ile *in vivo* ve *in vitro* koşullar altında LPS'in regülasyon mekanizmasının aydınlatılmasını sağlamak ve IVIS spektrum aracılığı ile LPS'in patojenitede önemli iki kısmı olan outer core ve O-antijen genlerinin, mRNA ifadesinin enfeksiyon süresince endirekt olarak izlenmesi amaçlanlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. *Yersinia enterocolitica*

2.1.1. Tarihçe

Yersinia ilk olarak Fransız/İsviçreli bakteriyolog Alexandre Yersin tarafından Hong Kong'da 1894 yılında izole edilerek tanılanmıştır. *Yersinia*, Amerika'da 1923 yılına kadar saptanamamıştır ancak 1963 yılından sonra insanlarda hastalığa neden olduğu anlaşılabilmiş ve 1963 yılından günümüze kadar Amerika'nın bir kısmındaki ve Avrupa'da akut gastroenteritis olgularının %1'inden sorumlu olarak gösterilmiştir. *Yersinia* genusu ilk olarak *Pasteurella* genusuna dahil edilmiş ancak günümüzde *Yersinia* genusu *Enterobacteriaceae* ailesine dahildir ve insan için önemli olan ise patojenik türleri; *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* ve *Y. enterocolitica*'dır. *Y. ruckeri* ise balık patojeni olarak bilinmektedir. Ayrıca çevresel kaynaklı ve patojen olmayan türleri ise *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. rohdei* ve *Y. aldovae*'dir (Percival and Williams, 2014).

Bottone'ye göre (1997), *Y. enterocolitica* ise Gram negatif bir kokobasil olarak, 1934 yılında Amerika'da McIver ve Pike tarafından rapor edilmiştir. McIver ve Pike, Gram negatif bir kokobasil olan izolatu; 53 yaşındaki bir çiftçinin yüz apsesinden izole ederek, ilk olarak *Flavobacterium psudomallei* olarak tanılamışlardır (Bottone, 1997). İlk olarak 1939 yılında, *Bacterium enterocoliticum* olarak, daha sonra *Pasteurella pseudotuberculosis reodentium* ve *Pasteurella X* ve en son olarak da 1964 yılında *Y. enterocolitica* olarak tanılanmıştır (Percival and Williams, 2014).

2.1.2. Taksonomi

Y. enterocolitica suşlarının *Y. enterocolitica*-benzeri izolatlardan farklılıkları ilk olarak 1944 yılında, moleküler biyolojik teknikler ile Van Longhem tarafından belirtilmiştir (Bottone, 1997). Taksonomik olarak sınıflandırılması ilk kez 1964 yılında Frederiksen tarafından yapılmış ve “enterocoliticum” terimi; *Enterobacteriaceae* ailesi içerisine dahil edilmiş *Y. enterocolitica* olarak tanılanmıştır. 1976 yılında Brenner ve arkadaşları tarafından yapılan klasik biyokimyasal ve DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sonrasında Brenner ve arkadaşları 1980 yılında dört *Yersinia* türü tanılanmıştır; *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* ve *Y. kristestensinii*. Bu dört *Yersinia* türü; sakkaroz, L-ramnoz, rafinoz ve melibiyoz fermentasyonuna göre sınıflandırılmıştır. 1988 yılında Wauters ve arkadaşları, *Y. mollarareti* 3A ve *Y. bercovieri* 3B grubunu tanılamışlar ve bu grubun *Y. enterocolitica*’dan biyokimyasal ve antijenik yapıları açısından farklılık gösterdiği anlaşılmıştır (Bottone, 1997).

2.1.3. Mikrobiyolojisi ve sınıflandırılması

Y. enterocolitica fakültatif anaerob, spor oluşturmayan çubuk ya da kokobasil morfolojisinde (0,5-2 µm) Gram-negatif bir bakteridir. Optimum büyüme sıcaklığı 22-26°C’dir fakat büyüme sıcaklık aralığı oldukça geniştir ve farklılık göstermektedir (0-45°C ve -1 ve 40°C). Tüm *Y. enterocolitica* suşları sükroz, glikoz gibi şekerleri ve üreyi gaz oluşturmada yıkıma uğratar. Oksidaz reaksiyonu negatiftir ve laktozu parçalayamazlar, sitrat reaksiyonu pozitif, H₂S ve asetoin üretmezler. Patojenik suşları eskulin ve pyrazimanidazı parçalayamaz ve 37°C’de kalsiyum bağımlı büyüme göstermektedirler (Nesbakken, 2013).

Y. enterocolitica suşları sıcaklığa bağlı olarak farklı fenotipik karakteristikler gösterirler. Çoğu *Y. enterocolitica* suşu 37 °C’de hareketsizdir fakat 30 °C’nin altındaki sıcaklıklarda peritrik flajella ile hareketli duruma gelirler. Psikotrofik mikroorganizma olmalarından dolayı, düşük sıcaklıklar büyümelerini engellememektedir (Goverde et al.,1998). Ancak başka bir gıda kökenli psikotrofik patojen olan *Listeria monocytogenes*’den daha yavaş büyürler (Zadernowska et al., 2014).

Y. enterocolitica suşları biyokimyasal özellikler açısından oldukça farklılık göstermektedir. Bu farklılıklara dayanarak 6 farklı biyotip tanımlanmıştır: 1A, 1B, 2, 3,4 ve 5. Bu sınıflandırma da *Y. enterocolitica* suşlarının patojenite özelliklerini belirlemektedir. Biyotip 1B ve 2-5; enterotoksin, Myf antijeni, Inv invazini ve Ail adezini gibi virülens faktörleri taşıdıklarından dolayı patojen grup olarak tanımlanmıştır. Biyotip 1B insanlarda hastalık yapan en önemli grubu oluşturmaktadır ve diğer biyotip gruplarından farklı olarak yüksek patojenite adası (HPI) olarak bilinen virülens faktörü içermektedir. Patojenik suşlar özellikle 70,000 bp büyüklüğünde virülens plazmidi (pYV) taşımaktadır. pYV plazmidi kalsiyum bağımlı büyüme, Congo-Red boyasını içine almaktadır. Bu plazmit tarafından kodlanan önemli bir virülens faktörü ise konak hücrelere adezyonu sağlayan YadA'dır. (Zadernowska et al., 2014).

Serotiplendirme ilk kez, 1926 yılından itibaren *Salmonella* izolatlarının sınıflandırılmasında kullanılmıştır ve Kauffmann-White şeması olarak bilinmektedir ve bu şemadaki birincil antijenler ise hücre yüzey antijenleri (O-antijen) ve flajel proteinleridir (H-antijen). O- antijen epitopları ise; yüzey antijenlerini oluşturan şeker kalıntılarının tipi ve düzenlenmesi ile belirlenmektedir. Şu anda *Y. pseudotuberculosis* için 21 serotip belirlenmiştir oysa *Y. pestis* suşları serolojik olarak gruplandırılmamaktadır çünkü LPS yapılarında O- antijen bulunmamaktadır (Skurnik, 2011; Skurnik and Toivonen, 2011). *Y. enterocolitica* suşlarının 76 adet serotipi bulunmaktadır (Zadernowska et al., 2014). Virülens plazmidi taşıyan patojenik *Y. enterocolitica* suşları olan O:3 ve O:9 serotipleri genellikle İskandinavya ülkeleri Avrupa, Kanada, Japonya ve Güney Afrika'da O:8 serotipi ise Amerika'da yaygındır. Daha az rastlanılan patojenik serotiple ise O:4,32, O:5,27 ve O:13a,18'dir (Skurnik, 2011).

2.1.4. İzolasyonu ve tanılanması

2.1.4.1. İzolasyonu

Y. enterocolitica suşlarının asemptomatik taşıyıcılardan, gıda ve çevresel örneklerden saptanması; dışkı, organ apsesi ve enfekte olmuş kişilere nazaran oldukça zordur. Birçok kültürel metotlar *Y. enterocolitica* suşlarının izolasyonu için önerilse de tek bir izolasyon metodu patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının saptanması için yeterli değildir (Laukkanen et al., 2010).

Enteropatojenik *Y. enterocolitica* suşlarının hayvan, gıda ve çevresel kaynaklardan izolasyonu oldukça zordur çünkü patojenik *Y. enterocolitica* suşları oldukça düşük sayıdadır ve izolasyonda kullanılacak materyal aynı zamanda rekabetçi flora da içermektedir. Bu örneklerde *Y. enterocolitica* sayısını arttırmak için seçici ayırt edici besiyerine inokülasyondan önce sıvı besiyerinde zenginleştirilme gerekmektedir (Fredriksson-Ahomaa, 2010).

+4°C’de soğuk zenginleştirme ile belirli inkübasyon sürelerinde ve farklı zenginleştirme besiyeri ortamları *Y. enterocolitica* suşlarının psikrotrofik bakteri olma özelliklerinden dolayı sıklıkla kullanılmaktadır. Düşük sıcaklıklarda zenginleştirme işlemi sırasında patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının sayısı artmaktadır. Fakat soğukta zenginleştirme işleminin dezavantajlarından birisi de zenginleştirme sırasında diğer psikotrofik bakterilerin de sayısının artmasıdır. Ancak ön zenginleştirme sonrası potasyum hidroksit (KOH) çözeltisinin uygulanması, *Y. enterocolitica* suşları dışındaki rekabetçi florayı inhibe etmektedir. Eğer materyalde yüksek sayıda *Y. enterocolitica* bekleniyorsa, ön zenginleştirme işlemi uygulanmadan da direk olarak seçici ayırt edici besiyerine materyal inokülasyonu gerçekleştirilebilir (Van Damme et al., 2013).

Y. enterocolitica suşlarının doğal olarak kontamine olmuş örneklerden izolasyonu için birçok seçici besiyeri ortamları tasarlanmıştır. *MacConkey* (MAC) agar enterik bakteriler için kullanılan besiyerlerinden biridir. *Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin* (CIN) ve *Salmonella-Shigella deoxycholate calcium chloride* (SSDC) agar ise patojenik *Y. enterocolitica* 4/O:3 biyoserotiplerinin izolasyonunda en sık

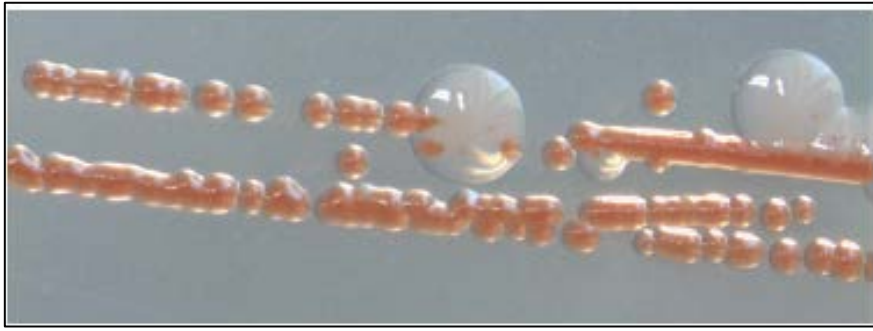
kullanılan seçici ayırt edici besiyeridir (Fredriksson-Ahomaa and Korkeala, 2003; Laukkanen et al., 2009).CIN agar doğal olarak kontamine olmuş materyallerden *Y. enterocolitica* izolasyonunda yüksek doğrulama oranına sahip olması ve seçici ayırt edici ortam olmasından dolayı sıklıkla kullanılmaktadır (El Qouqa et al., 2011) Fakat CIN besiyeri ortamında inkübasyon sonucu *Yersinia* suşlarına benzer koloni morfolojisi oluşturan diğer bakteri grupları da üremektedir: *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella* spp., *Pantotea* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp. ve *Stenotrophomonas* spp.(Fredriksson-Ahomaa and Korkeala, 2003).

En sık kullanılan ve özellikle patojenik biyoserotip 4/O:3'ün izolasyonunu sağlayan ön zenginleştirme sıvı besiyeri ise *irgasan-ticarcillin-potassium cholorate* (ITC), ve modified Rappaport broth (MRB)'dur (Fredriksson-Ahomaa, 2010). Avrupa'da özellikle gıdalarda patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının saptanmasında kullanılan standardize edilmiş izolasyon metotlarından birisi International Standard Organisation Method (ISO 10273:2003; ISO 2003)'dur. Bu metot iki izolasyon prosedürünün aynı anda uygulanmasını kapsamaktadır: i) pepton-sorbitol- safra tuzu (PSB) sıvı besi ortamında KOH uygulaması yapılmadan CIN besiyeri ortamına inokülasyonu, ii) ITC sıvı besiyeri ortamında ön zenginleştirme işleminden sonra SSDC besiyeri ortamına inokülasyonunu kapsamaktadır. İkinci standardize edilmiş metot ise Nordic Committee on Food Analysis (NCFA 117:1996)'dır. Bu metot 3 aşamadan oluşmaktadır: i) CIN besiyerine direkt olarak izolasyon materyalinin inokülasyonu, ii) MRB ve PSB zenginleştirici sıvı besiyerine ön zenginleştirme ve iii) 21 gün süre ile PSB sıvı besiyerinde soğuk zenginleştirmedir (Fredriksson-Ahomaa, 2010).

2.1.4.2. Tanılanması

Y. enterocolitica suşlarının fenotipik olarak tanınması geleneksel olarak çeşitli substratların metabolize edebilme yeteneklerine göre yapılmaktadır. (**Çizelge 2.1**) (Wauters et al., 1987). Api20 E, Api Rapid 32 IDE ve Micronaut E gibi ticari tanılama sistemleri de mevcuttur. Ticari ürünler arasında API 20 E düşük maliyetli ve tür seviyesinde *Y. enterocolitica* tayini sağladığından dolayı en çok tercih edilen tanılama sistemidir (Neumayer et al., 2004). Ayrıca VITEK GNI ve Vitek 2 cihazları

da *Yersinia* suşlarının tanımlanmasında kullanılmaktadır. Son zamanlarda matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF); her bir bakteriyel suşu protein profillerine göre tanımlama sistemine sahiptir, sıklıkla kullanılmaktadır ve mikrobiyoloji alanında oldukça popüler olmaya başlamıştır. MALDI-TOF *Y. enterocolitica* suşlarının hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasında kullanılmaktadır (Ayyadurai et al., 2010; Lasch et al., 2010; Stephan et al., 2011). pYV virülens plazmidi taşıyan patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının fenotipik virülens testi; Congo-red magnezyum oksalat besiyeri (CR-MOX) kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Congo-red'in üç boyutlu yapısı hemine benzemektedir ve pYV pozitif olan suşlar kırmızı küçük koloniler oluşturmaktadır. pYV virülens plazmidi taşımayan suşlar ise beyaz büyük koloniler oluşturmaktadır (**Şekil 2.1**) (Sihvonen, 2014).



Şekil 2.1. CR-MOX besiyerinde oluşan *Y. enterocolitica* 4/O:3 (24 saat, 37°C) (Sihvonen, 2014).

Y. enterocolitica suşlarının genotipik olarak tanımlanması için; gıda ve domuz eti kaynaklarından kromozom aracılığı ile kodlanan *ail* geninin amplifikasyonunu sağlayan Real-time PCR kullanılmaktadır. Ayrıca çeşitli virülens genlerinin multipleks PCR ile saptanması ile genotipik doğrulama yapılmaktadır (Messelhauser et al., 2011; Wesley et al., 2008).

Çizelge 2.1. Biyokimyasal reaksiyonlara göre *Y. enterocolitica* suşlarının sınıflandırılması (Efsa, 2007; Wauters et al., 1987).

TEST	1A	1B	2	3	4	5
Eskulin hidrolizi	D	-	-	-	-	-
Salisin	+	-	-	-	-	-
β -D-glukosidaz	+	-	-	-	-	-
Pyrazinamidaz	+	-	-	-	-	-
Lipaz	+	+	-	-	-	-
İndol üretimi	+	+	(+)	-	-	-
D-Ksiloz	+	+	+	+	-	D
Trehaloz	+	+	+	+	+	-
Voges-proskuer	+	+	+	+	-	(+)

+: pozitif, -: negatif, (+): geç reaksiyon, D: farklılık göstermektedir.

2.1.5. Epidemiyolojisi ve Rezervuarı

Y. enterocolitica suşları farklı iklim koşullarına sahip birçok bölgeden rapor edilmişse de, yıllarca biyotip ve serolojik grupların izolasyonu belirli coğrafik alanlara bağlı olarak dağılım göstermiştir (Fondrevez et al., 2014; Sanno et al., 2014; Tan et al., 2014). *Y. enterocolitica* suşlarının izolasyonu üzerine 1980 yılından itibaren gerçekleştirilen araştırmalarda *Y. enterocolitica* O:3 ve O:9 genellikle Avrupa'dan ve O:8 serotipi ise Amerika'dan rapor edilmiştir. *Y. enterocolitica* O:8 serotipinin neden olduğu ilk gıda zehirlenmesi raporu ilk olarak 2004 yılında Japonya'dan verilmiştir. O:8 serotipi ilk olarak Almanya'dan rapor edilmiştir ve izolasyon kaynağı 4 yaşındaki bir çocuğun klinik materyalidir (Schubert et al., 2003).

Y. enterocolitica suşları *Enterobacteriaceae* ailesine dahil olduğundan kedi ve köpek gibi evcil hayvanlarda, kemiriciler, kuş, yaban domuzları, koyun ve keçi gibi çiftlik hayvanlarında bulunduklarından dolayı çevresel örneklerden sıklıkla saptanabilmektedirler. Havyan dışkılarının çevreye karışmasından sonra *Y. enterocolitica* suşları elverişsiz koşullara dayanıklı olduklarından dolayı uzun süre canlılıklarını korumaktadır ve genel anlamda domuzlar *Y. enterocolitica* suşlarının sağlıklı taşıyıcıları oldukları için patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının insanlara

bulaşmasında en önemli rezervuarı oluşturmaktadır ve genellikle domuzların dilinden ve sindirim sisteminden izolasyonu yapılmaktadır. Fransa’da 16 domuz kesim çiftliğinde 3120 domuzda *Y. enterocolitica* suşları araştırılmış ve %74 oranında patojenik *Y. enterocolitica* suşu saptanmıştır (Fondrevez et al., 2014). Malezya’da yapılan bir araştırmada 21 domuz etinden 5 adet (% 23,8) *Y. enterocolitica* suşu saptanmıştır. Belçika’da ise domuz karkasından saptanan patojenik *Y. enterocolitica* 4/O:3 serotipi saptama oranı %11,0 olarak belirtilmiştir (Van Damme et al., 2013). Ayrıca İsveç’de yaban domuzlarının dışkı ve bademciklerinden yapılan araştırmada %20 oranında *Y. enterocolitica* saptanmıştır (Sanno et al., 2014).

Kümes hayvanlarının et ve et ürünleri besinsel değerinden dolayı genellikle dünya genelinde her ülke tarafından tüketilmektedir ve patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının potansiyel kaynağı olarak belirtilmektedir (Sharifi Yazdi M. K. et al., 2011; Zadernowska et al., 2014). Sharifi et al. tarafından 190 adet tavuk eti ve 189 adet sığır etini *Y. enterocolitica* varlığı açısından incelenmeleri sonucu, 42 adet tavuk eti pozitif iken, sığır etinden ise 18 adet patojenik *Y. enterocolitica* saptanmıştır. İsveçte yapılan diğer bir araştırmada ise koyunların rezervuar kaynağı olabileceği düşünülerek *Y. enterocolitica* suşları araştırılmıştır ancak yüksek sayıda örnekleme yapılmasına rağmen 1A biyotipi hariç patojenik *Y. enterocolitica* suşları saptanamamıştır (Soderqvist et al., 2012).

Avrupa Birliği’ne bağlı olan ülkelerde, yersiniosis insidansı son on yıldır azalmaktadır ve 2010 yılında kayıtlı yersiniosis sayısı 6776’dır. Bu veri 2009 yılına göre %10 daha düşük bir oran olarak kaydedilmiştir (Efsa, 2012). İran, İsrail, Brezilya ve Nijerya gibi ılıman iklime sahip ülkelerde *Y. enterocolitica* suşları saptanabilmiştir ve insan sağlığı açısından önemli bir patojen olarak belirtilmiştir (Falcao et al., 2006).

2.1.6. Patogeneze

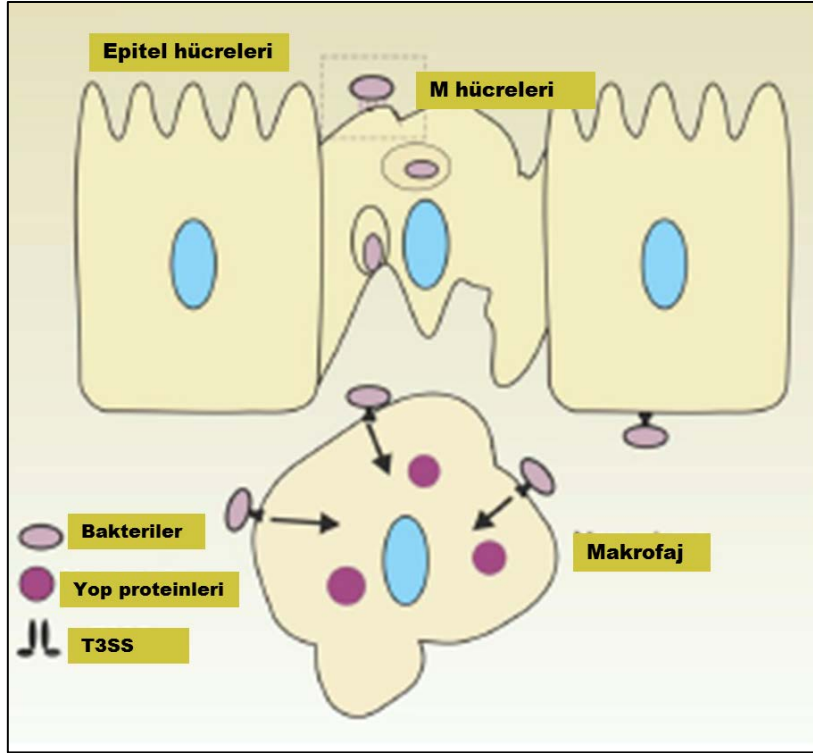
Mikroorganizmalar enfekte edeceği dokuya adezyonu ve penetrasyonu için farklı mekanizmalara sahiptir. Bazı mikroorganizmalar konak hücre içerisine bir vektör aracılığı ile penetrasyon gerçekleştirirken, bazı mikroorganizmalar ise daha

önceden zarar görmüş bir doku aracılığı ile konak hücre yüzeyine tutunurlar. Öncelikle enfeksiyonun başlatılabilmesi için yeterli sayıda mikroorganizmanın hücre içerisine alınması gerekmektedir. Enfeksiyonun başlaması için gerekli olan patojen sayısı türden türe farklılık göstermektedir ve patojen hücre içerisine alındıktan sonra konakçı içerisinde belirli bir inkübasyon süresinin geçmesi ve hastalık belirtilerinin başlaması için patojenin belirli bir sayıya ulaşması gerekmektedir. Bu durumda ilk basamak patojenin epitel hücre yüzeyine bağlanmasıdır. Adezyon sonucu bazı mikroorganizmalar alt epitel dokusuna geçmektedirler bu aşamada konak hücrenin savunma mekanizmaları ile karşılaşmaktadırlar ve bu durumda patojen mikroorganizmanın virülens faktörlerine bağlı olarak konakçının bağışıklık sistemi arasında bir denge kurulmaktadır (Cotter and Miller, 1998).

Kontamine olmuş gıda veya su aracılığı ile oral yol ile insana bulaşan *Y. enterocolitica*'nın midede sindirim aşamaları şu şekildedir: *Y. enterocolitica* özellikle termal ileum ve proksimal kalın bağırsak olmak üzere ince bağırsakta kolonize olmaktadır. İnce bağırsak mukus bariyerlerine bağlanması ve penetrasyonundan sonra, mukozal epitel hücrelerini kaplamaktadır daha sonra *Yersinia* ince bağırsak bariyerlerini; M hücreleri ve peyer plaklarına (PP) bağlanarak geçmektedir. Bu süreçte etkili bağlanma ve penetrasyon; invasin- β 1 integrin etkileşimi ile desteklenmektedir. *Yersinia* M hücreleri tarafından içselleştirildiğinde, aktin-kılıflı vakuol tarafından çevrelenir ve çoğalmadan yaşamını vakuol içerisinde sürdürür (**Şekil 2. 2**). Vakuol daha sonra bakteriyi serbest bırakıp dentritik hücrelere (DC), makrofajlar ve lenfositlere maruz kaldığı yer olan M hücresinin apikal bazolateral tarafına taşınır (**Şekil 2.2**). *Yersinia*, fagosit integrinleri ile etkileşime girdiğinde (*Yersinia* tip 3 salgı sistemi) Ysc T3SS aktifleştirilir ve efektör proteinler, fagosit sitoplazmasına salgılanırlar (Rakin et al., 2015).

Mezenterik lenf nodüllerine bakteriyel taşınma; fagosit sirkülasyonu aracılığı ile gerçekleşmemektedir. Bu nedenle, fagosit sirkülasyonu abdominal ağrıyı tetikleyen inflamatuvar yanıtı neden olmaktadır. Dalak ve karaciğere yayılımın ise kan dolaşımı ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Sistemik yayılım; enfeksiyonun başlangıcından itibaren 24-48 saat içerisinde gözlenmektedir. Bu süreç,

fagositlerin sirkülasyonu aracılığı ile karaciğer ve dalağa taşınması ve bu dokularda mikroapselerin oluşumunu kapsamaktadır. Bu lezyonlar içerisinde bakteri makrofajlar ve nötrofiller aracılığı ile fagositoya direnç göstermektedir (Rakin et al., 2015).



Şekil 2.2. *Y. enterocolitica* patojenite mekanizması. *Y. enterocolitica* öncelikle invasin aracılığı ile β -integrinler ile etkileşime giren M hücrelerine bağlanır. Adezin ve integrinler arasındaki etkileşim *Y. enterocolitica*'nın yerleşmesini sağlamaktadır. Vakuol ile çevrelenmiş bakteri; M hücrelerinin bazolateral tarafına taşınmaktadır ve T3SS aktifleştirilir ve Yop efektör proteinler fagositin sitoplazmasına aktarılır (Rakin et al., 2015).

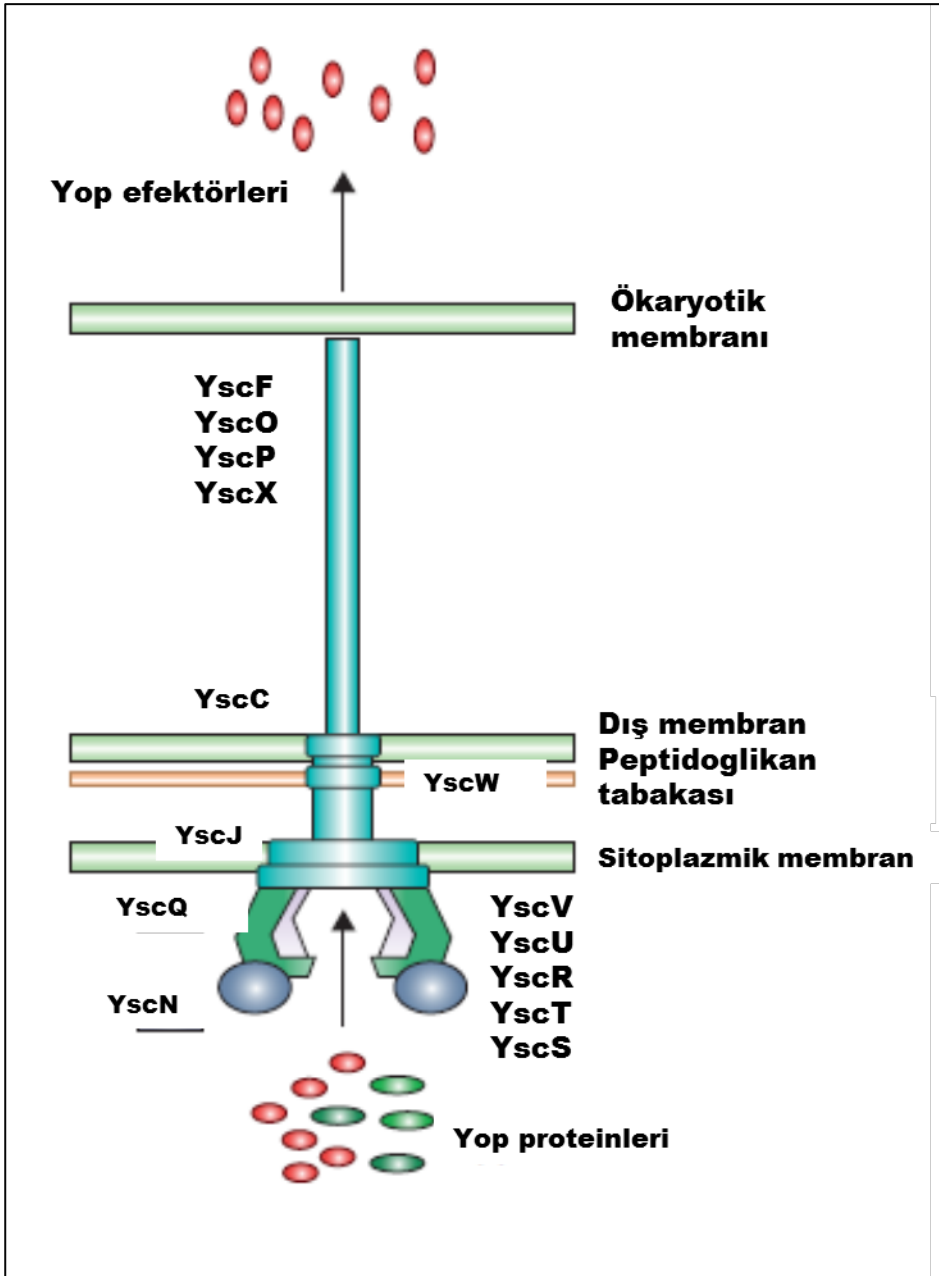
2.1.7. Virülens faktörleri

2.1.7.1. Plazmit aracılı kodlanan virülens faktörler

Ysc T3SS

Y. enterocolitica hücre dışı olarak konak canlıının lenfoid dokularında çoğalmaktadır. Konak immün sistem savunmasını engellemek için, patojen olan *Y. enterocolitica* sitotoksik efektör proteinlerini konak canlıının hücre sıvısına Ysc

T3SS'ni kullanarak enjekte etmektedir. *Y. enterocolitica* Ysc T3SS yapısı; bazal body yapısına bağlanan ucunda iğne olan bir şırıngaya benzemektedir. Yop effektör ve sitotoksik proteinler direkt olarak konak hücre içerisine enjeksiyonu sırasında; LcrV, YopB ve YopD proteinleri devreye girerek Yop effektör ve sitotoksik proteinlerin sitoplazmik membrandan geçişini kolaylaştırmaktadır. *In vitro* koşullarda Sıcaklık 26°C'den 37°C'ye yükseldiğinde ve düşük kalsiyum seviyesinde; *Y. enterocolitica* T3SS regülону aktifleşir fakat *in vivo* koşullarda hücre T3SS tetikleyicileri ile etkileşime girerek Yop translokasyonu sağlanır (**Şekil 2. 3**) (Neumayer et al., 2004; Rakin et al., 2015).



Şekil 2.3. *Yersinia* Tip 3 sekresyon sisteminin (Ysc T3SS) yapısal organizasyonu (Rakin et al., 2015).

Yops; bakterilerin konak immün sistemin saldırısına karşı hayatta kalmasını sağlamaktadır. Örneğin aktin hücre iskeletinin rahatsız edilmesi, makrofajların ölümüne ve Toll-like reseptör (TLRs) gibi immün reseptör sinyalinin engellenmesi ile fagositlerin aktivitesi kısıtlanmasına yol açmaktadır. Konak hücrenin sitozolüne aktarılan en az 7 adet Yop efektör proteini saptanmıştır: YopH, YopE, YopT, YpkA/YopO, YopP/YopJ, YopQ/YopK ve YopM (Leibiger et al., 2008; Rakin et al., 2015).

YadA

Bir adezin olan YadA; patojenik *Yersinae* türlerinin sahip olduğu pYV plazmidi üzerinde bulunan *yadA* geni tarafından kodlanan ve yaklaşık 45- Kilodalton (kDa) ve 1775 bp büyüklüğünde bir proteindir. *Y. enterocolitica* suşlarında konak hücrede tutunma ve invazyonda önemli bir rolü bulunmaktadır. YadA hücresel fibronectin, kollajen I, II ve IV ve laminin gibi hücre dışı matriks proteinlerine bağlanır. Kollajen proteinlerinin YadA ile etkileşimi sonucu reaktif artrit gibi immünolojik reaksiyonlara yol açmaktadır. Hücresel adezyona katkıda bulunmasının yanı sıra; defensinler ve serum kompleman lizizi gibi hümmoral doğal bağışıklık sistemine karşı patojeni korumaktadır. $\beta 1$ integrinine endirekt olarak bağlanması ise fibronectin- $\beta 1$ integrin köprüsü aracılığı ile oluşmaktadır ve IL-8 üretimi sağlanarak *Yersinia*'nın lokalizasyonuna neden olmaktadır. YadA ayrıca kompleman regülatörü olan C4b-bağlanma proteinine bağlanarak alternatif kompleman yol izini engellemektedir (Rakin et al., 2015). *yadA* virülens faktörü transkripsiyonu iki düzenleyici ile kontrol edilmektedir; i) aynı zamanda Yop ifade regülasyonunda da görev alan plazmit aracılı *virF*; ii) 37 °C'nin altında *virF* transkripsiyonunu engelleyen ve histon benzeri inhibitör olan ve kromozom aracılığı ile kodlanan YmoA'dır. Ayrıca ozmolarite, pH, Fe^{+3} iyon konsantrasyonu da *yadA* ifadesinde oldukça önemlidir (Bialas et al., 2012).

2.1.7.2. Kromozom ile kodlanan virülens faktörler

Invazin (Inv)

92-kDa ve 3665bp büyüklüğünde bir protein olan invazin bir hücre yüzey adezinidir ve peyer plaklarında M hücrelerinin invazyonu için gereklidir. Inv, direct olarak $\beta 1$ integrinleri ile etkileşime geçerek bakterinin endosom veziküllerine geçişini kolaylaştırmaktadır. Inv ayrıca makrofajlarda otofagositozu tetiklemektedir. Inv sentezi sıcaklık, pH ve büyüme faktörü bağımlıdır (Rakin et al., 2015). Invazin ifadesi ayrıca *Y. enterocolitica* suşlarının serotiplerine göre farklılık göstermektedir. Temel adezyon faktörü olan invazin *Y. enterocolitica* O:3 serotipinin domuzlarda kolonizasyonu sağlayarak bu serotipin intestinal sisteme yerleşmesine katkıda bulunmaktadır (Schaake et al., 2014) İnvazin özellikle 23 °C'de ifadesi gerçekleşmektedir ancak invazinin 37 °C'de ve düşük pH'da da üretilildiği de

saptanmıştır ve özellikle enfeksiyon sırasında peyer plaklarında ifadesi gerçekleştiği rapor edilmiştir (Trcek et al., 2010).

Ail (Attachment and Invasion Locus)

Bağlanma ve invazyon lokusu olan adezin 17-kDa'luk 537 bp'lik bir yüzey proteinidir ve özellikle 37°C'de oksijen ve pH'a bağlı olarak sentezlenmektedir (Biedzka-Sarek et al., 2008). Ail özellikle diğer patojenik suşlar dışında 1A biyotiplerinde de saptanmaktadır (Liang et al., 2014; Sihvonen et al., 2011). İnvazyon virülens belirtecine benzer bir şekilde ail de enfeksiyon sırasında epitel hücrelere bağlanma ve invazyonda görev almaktadır. Küçük bir protein olan ail; genellikle lipopolisakkarit yapısının O-antijen zincirleri tarafından maskelenmektedir ve bu yüzden enfeksiyon sırasında patojenezde çok önemli bir rol üstlenmemiştir ancak enfeksiyon sırasında insan serum komplement sistemine direnç göstermektedir ve bu direnci gösterirken YadA ile birlikte görev almaktadır (Skurnik, 2011).

Lipopolisakkarit (LPS)

Yersinia genusunun da dahil olduğu tüm Gram negatif bakteriler dış membrana sahiptirler ve dış membran yapısı ile çevrelenmiştir. LPS iki biyosentetik gruptan oluşmaktadır: Lipid A-core olisakkarit ve O-antijen olarak da bilinen O-spesifik polisakkarittir. O-antijen yapısı oldukça değişkendir ve *Yersinia* suşlarının serotiplendirilmesinin temelini oluşturmaktadır (Biedzka-Sarek et al., 2005).

LPS biyosentezi; her bir LPS bileşeni için spesifik olan enzimleri gerektirmektedir bu yüzden bir çok Gram negatif bakteride bulunan ve kromozom aracılı kodlanan en az 50 gen görev almaktadır. Lipid A biyosentezi için gerekli olan genler genellikle genom içerisinde dağınık halde bulunmaktadır ve core ve O-antijen biyosentezinde gen takımları halinde ifade edilmektedirler (Skurnik, 2011).

Yersinia LPS'in endotoksik aktivitesi birçok çalışmada belirtilmiştir (Alexander and Rietschel, 2001). Ancak *Yersinia* suşlarının LPS yapısının patogenezdaki önemi çok az ilgi çekmiştir. LPS tabakası katyonik antimikrobiyal peptitlerine karşı direnç sağlamada önemlidir ve O- antijen immün sistemde komplement

aktivitesine karşı da direnç sağlamaktadır. Ayrıca LPS; O- antijene karşı antikor üretimi için pasif immünizasyonda da kullanılmaktadır (Skurnik, 2011).

Myf Antijeni

Mukoid *Yersinia* faktör (Myf)'ün ifadesi, asidik koşullar altında ve 37°C'de gerçekleşmektedir. 21 kD'luk Myf antijeni (4400 bp), *myf A*, *Myf B*, *myf C*, *myf E*, *myfF* olmak üzere 5 farklı gen takımı halinde ifade edilmektedir: *myfA* proteini bir proteaz tarafından dış membrandan sitoplazmaya taşınması sırasında parçalanmaktadır. MyfA proteini Psa proteini ile yüksek oranda homoloji göstermektedir. *Y. pseudotuberculosis*'in hemagglütinasyonunda rol oynadığı bilinmektedir. *Y. enterocolitica* suşlarında myf antijeninin patojenez'deki rolü henüz belirlenememiştir (Rakin et al., 2015).

YstA Enterotoksini

Y. enterocolitica antijenik özelliği bulunan ve *Yersinia* sıcaklık kararlı toksini Yst olarak isimlendirilen ve 30 amino asitten (216 bp) oluşan enterotoxin üretmektedirler. YstA; özellikle *Y. enterocolitica* suşlarının patojenik serotiplerinde bulunmaktadır ve diyarenin tetiklenmesine neden olmaktadır. YstB (319 bp) ise patojenik olmayan biyotip 1A suşlarında bulunmaktadır (Saha et al., 2009).

Üreaz

Üreaz; *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis* ve *Brucella abortus* gibi birçok bakteride patojenezde önemli bir role sahiptir. Üreaz, ürenin amonyak ve karbondioksite hidrolizini gerçekleştiren sitosolik bir enzimdir. *Y. pestis* dışında tüm *Yersinia* türleri üreaz gen kompleksini taşımaktadır ve bu gen kompleksi yedi farklı geni kapsamaktadır (6,618 bp): üre A, B, C, E, F, G ve D'dir. Üreaz optik olarak asidik pH'da aktiftir ve üreaz gen takımının optimum ifadesi gerçekleşir. Üreaz, *Y. enterocolitica* suşlarında mide boyunca sindirim sitemine geçişte mide asidine karşı korumaktadır (Bhagat and Viridi, 2009).

2.1.8. Neden olduğu hastalıklar

Y. enterocolitica insanlarda çeşitli sindirim sistemi rahatsızlıkları yansıra çeşitli akut gastroenteritidis, enterokolitis ve mezenterik lymphadenitis'ne neden olmaktadır. Klinik tablo genellikle apentisit ya da bölgesel enteritidis'e benzetilmektedir (Crohn's hastalığı). İnsanlar için ortalama infektif doz 10^4 veya 10^6 bakteri'dir ve bu doz konak hücreye ve *Y. enterocolitica* suşlarının serotiplerine göre değişkenlik göstermektedir. Hastalık belirtileri genellikle 24-48 saat içerisinde başlamaktadır fakat aynı zamanda 11 güne kadar bu süreç uzamaktadır. Klinik belirtileri abdominal ağrı, ateş, diyare ve kusmadır. Abdominal ağrı ve ateş ise en önemli belirtisidir. Hastalığın ilerlemesi daha çok hastanın bağışıklık sistemine ve *Y. enterocolitica* suşlarına bağlıdır. Yaşlı ve bağışıklığı baskılanmış kişiler yersiniosis'e daha duyarlıdır (Rakin et al., 2015)

Y. enterocolitica, sindirim sistemi rahatsızlıkları dışında eritema nodozum gibi enfeksiyon başlangıcından 7-30 gün sonra belirti gösteren klinik bir belirtiyeye neden olmaktadır. Enfeksiyon vücudun herhangi bir bölgesinde oluşmaktadır fakat mikroorganizma kültüre edilemez ancak *Y. enterocolitica* eklem sıvısı ya da dokudan teşhis edilmektedir. Asimetrikal oligoartrit olarak bilinen klinik bir tablo da sergilemektedir (Sihvonen et al., 2012).

2.1.9. Antimikrobiyal tedavi

Y. enterocolitica suşlarının neden olduğu gastroenteritidis, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda görüldüğünden dolayı antimikrobiyal tedavi tavsiye edilmemektedir ancak antimikrobiyal tedavi daha çok sepsisemi hastalarına uygulanmaktadır. Çoğu *Y. enterocolitica* suşu; aminoglikozitlere, 3. kuşak grubu antibiyotik olan sefalosporinlere ve florokinolonlar, tetrasiklin, kloramfenikole duyarlıdır. Ancak, *Y. enterocolitica* suşları β -laktam grubu antibiyotikler olan pensilin, ampisilin ve 1. nesil sefalosporinlere karşı dirençlidir (Rakin et al., 2015). *Y. enterocolitica* izolatlarında *blaA* ve *blaB* olmak üzere kromozom aracılığı ile kodlanan β -laktamaz geni bulunmaktadır. Üçüncü nesil sefalosporinler ve florokinolonlar *Y. enterocolitica* enfeksiyonlarına karşı tercih edilmektedir. Aynı zamanda *in vitro* koşullardaki aktivitesi ve iyi bir doku penetrasyonu nedeni ile siprofloksasin de tedavide ilk olarak tercih edilmektedir (Rakin et al., 2015).

2.2. *In Vivo* Koşullarda Bakteriyel Gen ifadesinin ölçülmesi

Enfeksiyon sırasında bakteriyel gen ifadesi oldukça karmaşıktır ve *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen denemelerin sonuçları ile korelasyon göstermemektedir. Enfekte olmuş konak, oldukça kompleks ve dinamik bir çevreden oluşmaktadır ve enfeksiyon sırasında bu çevre patojen ile etkileşimine dayanarak değişiklik göstermektedir. Enfeksiyon sırasında konak tarafından indüklenen genler organ spesifik midir yoksa hücresel midir? Enfeksiyon süresince patojen mikroorganizma tarafından hangi genlerin ifadesi gerçekleşmektedir? Bu soruların cevaplarının verilmesi için günümüzde bir çok teknik geliştirilmiştir: bu teknikler *in vivo* koşullarda bakteriyel mRNA seviyesinin endirekt olarak izlenmesi için reporter sistemler, *in vivo* koşullarda gen ifadesini ölçmek için analitik sistemler ve *in vivo* koşullarda indüklenen genlerin saptanması ve proteomik temelli yaklaşımlarıdır (Hautefort and Hinton, 2000).

2.2.1. *In vivo* koşullarda bakteriyel mRNA seviyesinin endirekt olarak izlenmesi için reporter sistemler

Bakteriyel gen ifadesi direkt veya endirekt olarak mRNA düzeyinde ölçülebilmektedir. Reporter genler, belirli bir promotorun kontrolü altında ifadesi gerçekleşecek olan genleri endirekt olarak izlemek için kullanılan genetik markerlardır ve kolay saptanabilir bir protein kodlarlar yada işaretlenmiş bir prob ile metabolizmaya dahil olmaktadır. Bu reporter genler, spesifik promotorların aktivitelerini belirlemede ya da promotor/enhancer dizilerinin faktörlerini belirlemek için kullanılmaktadır (Youn and Hong, 2012). Günümüze birçok reporter gen ürünleri kullanılmaktadır ve bu ürünlerin genel ortak özellikleri ise ifade olacak gene bağlı olarak ışıma ya da floresan vermeleridir.

2.2.1.1. β - Galaktosidaz

β -galaktosidaz, reporter sistemi çeşitli çevresel koşullara karşı gen ifadesini ölçmek için geniş ölçüde kullanılmaktadır. *In vitro* koşullarda büyütülen kültür lerde β -galaktosidaz aktivitesinin basit ve doğru bir şekilde ölçülmesi için substrat olarak nitrofenil- β -D-galaktopiranosid kullanılmaktadır. Ayrıca, β -galaktosidaz *in vivo* koşullarda gen ifadesi analizlerinde kullanılmaya başlanmıştır (Hautefort and Hinton,

2000). Örneğin; *Salmonella typhimurium*'a ait bir virülens geni olan *spvB* ifadesi non-fagositik hücrelerde ve makrofaj hücre sisteminde β -galaktosidaz kullanılarak *spvB* geninin ifadesi izlenmiştir (Fierer et al., 1993). β -galaktosidaz reporter sisteminin dezavantajlarından birisi; hedeflenen bakteriyel hücrelere geçirgen olması önemlidir. Ancak geçirgenlikte farklılıklar olması, bireysel bakteriyel hücrelerinin gen ifadesinde doğru sonuçlar alınmasını engellemektedir (Fierer et al., 1993).

2.2.1.2. Lusiferazlar

Lusiferazların ateşböceğinden ya da biyoluminesan bakterilerden (*Vibrio spp.*) izolasyonu yapılmaktadır. Lusiferazlar Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerden, maya ve bitki hücrelerine kadar uzanan birçok organizma grubunda gen ifadesinin izlenmesi için geniş ölçüde kullanılmaktadır (Hautefort and Hinton, 2000). Bakteriyel lusiferazlar; uzun zincirli yağ aldehitlerinin oksidasyonunu ve flavin mononükleotidin (FMN/FMNH₂) indirgenmesini sağlayarak 490 nm dalga boyunda ışımaya sağlamaktadırlar (Stewart and Williams, 1992).

Lusiferaz reporter sistemi kullanılarak birçok araştırma gerçekleştirilmiştir: *Mycobacterium* patojenine karşı kullanılacak olan aşı ilaç etkinliğinin değerlendirilmesinde, antimikrobiyal ajanların etkinliklerinin araştırılmasında ve biyosensör çalışmalarında araç olarak kullanılmaktadır (Shaw et al., 1992; Zhang et al., 2012)

2.2.1.3. Yeşil floresan protein

Gen ifadesinin eş-zamanlı yada *in situ* koşullarda gerçekleştiği analizlerde floresan ışımaya veren reporter sistemler, yüksek hassaslığa sahip olduklarından dolayı büyük ölçüde kullanılmaktadırlar. Bunun için *Aequoria jellyfish*'den elde edilmiş olan ve doğal olarak mavi ışığın eksitasyonu sonucu yeşil ışımaya veren yeşil floresan protein (GFP) kullanılmaktadır.

In vivo koşullarda gerçekleştirilen gen ifadesi çalışmalarının invazif olmamaları gerekmektedir ve dolayısı ile GFP temel alınarak yapılan araştırmaların β -galaktosidaz ve lusiferaza göre avantajları bulunmaktadır; GFP analiz sırasında herhangi bir

substrat ya da kofaktör eklenmesini gerektirmemektedir. Küçük bir protein olduğundan dolayı ilgilenilen protein ile birleştirildiğinde protein translokasyon çalışmalarında oldukça idealdir. Doku kültür modellerinde bakteriyel gen ifadesinin saptanması ve sayımına olanak sağlamaktadır. Ancak dezavantajlarından birisi de; zayıf floresan yoğunluğu bulunmaktadır ve inklüzyon cisimciklerinin oluşması yüksek seviyede ışımaya neden olmaktadır (Hautefort and Hinton, 2000).

2.3. *In Vivo* Moleküler Görüntüleme

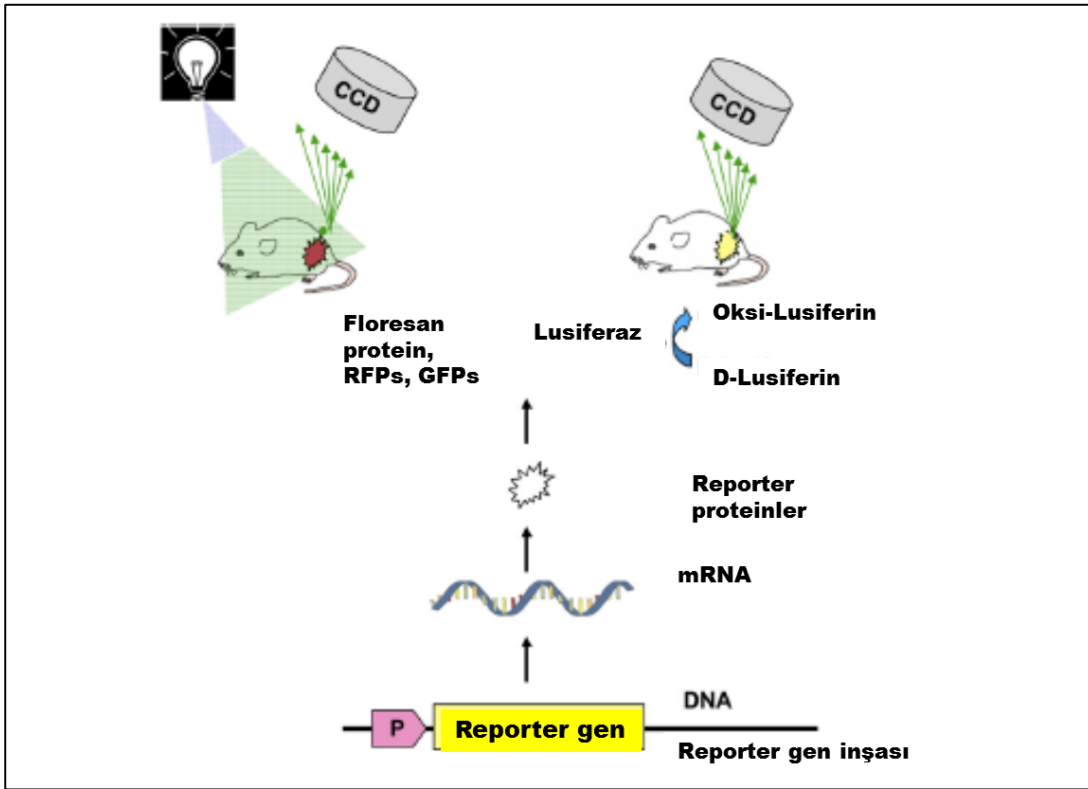
Moleküler görüntülemedeki son ilerlemeler, hücre dışı ve hücre içi mekanizmaları yaşayan canlı sistemler kullanarak moleküler seviyede incelememize olanak sağlamaktadır (Blasberg, 2003). Moleküler görüntüleme; moleküler biyoloji ve biyomedikal görüntüleme sistemini kombinasyonu ile hücresel prosesleri izlememizi sağlayan sistemdir ve farmokoloji, kimya, fizik, mühendislik ve tıp alanında birçok uygulaması bulunmaktadır. Özellikle, gen ifade vektör sistemlerinin geliştirilmesi ve görüntüleme için çeşitli reporter gen sistemlerinin kullanılması moleküler görüntüleme sistemini vazgeçilmez hale getirmiştir. Görüntüleme için özellikle belirli promotor kontrolü altında ifade edilecek hedef gen içeren kullanılan reporter gen sistemleri ise kloramfenikol asetiltransferaz, β -galaktosidaz, lusiferazlar ve floresan proteinlerdir (Youn and Hong, 2012). Fakat direkt olarak bu sistemler canlı deney hayvanları üzerinde kullanılamazlar çünkü reporter proteinlerin ışık yoğunlukları farklıdır ve optimizasyonu gerekmektedir.

Görüntüleme sistemlerinde günümüzde micro-computed tomography (CT), Micro-single photon emission computed tomography (SPECT), micro positron emission tomography (PET), micro-magnetic resonance imaging (MRI) ve floresan ve biyolüminesan ile optik görüntülemeyi içeren *in vivo* imaging system (IVIS) ve diğer çeşitli görüntüleme teknolojileri kullanılmaktadır (Iyer et al., 2005).

2.3.1. Optik görüntüleme

Floresan ve biyolüminesans aracılığı ile optik görüntüleme çeşitlerinin avantajlarından birisi diğer görüntüleme sistemlerine göre basit, ucuz ve daha güvenilirdir. Özellikle biyolüminesans reporter sistem ile düşük seviyedeki gen ifadesi

bile yüksek hassaslıkta görüntülenmektedir. *In vitro* koşullarda kullanılan çeşitli optik reporter sistem inşası, bazı biyolojik hipotezleri anlamak için canlı hayvan modellerinde de kullanılmaktadır (**Şekil 2.4**). Optik görüntüleme modellerinin en kritik komponenti, ışımayı saptayacak olan aletlerin hassaslığıdır ve son zamanlardaki ilerlemeler oldukça hassas aletlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Charged Couple Device (CCD) kamera, fotonları elektronlara dönüştüren foton katot ile fotonları yakalamaktadır. Sıcaklık ilişkili termal gürültüyü engellemek için bu alet -120°C'ye kadar soğutulmaktadır. Bu hassas aralık görünür ve kızılötesi dalga boylarını saptayabilecek kadar hassastır ancak mavi, yeşil ve sarı ışık aralığı memeli doku tarafından kolaylıkla emildiğinden dolayı optik görüntü sisteminde kırmızı yada daha kısa dalga boyundaki ışınlar tercih edilmektedir (Youn and Hong, 2012) (**Şekil 2.4**).



Şekil 2.4. Optik görüntüleme kullanılarak gen ifadesinin izlenmesi için promotor-reporter gen inşası ve optik görüntüleme (H. Youn, K.-J. Hong, 2012).

Son zamanlarda floresan temelli reporter sistemler gen ifadesini, doku lokalizasyonu ve protein-protein etkileşimlerini izlemek için oldukça popülerdir. Floresan proteinlerin görüntülenmesi dış kaynaklı bir ışık kaynağının çıkışı ile ışık emisyonu

aracılığı ile ölçülmektedir (Shaw et al., 1992). Yeşil floresan proteinler son zamanlarda oldukça sık kullanılmaktadır ayrıca enhanced GFP (eGFP) olarak sentetik versiyonları da üretilmiştir. Kırmızı floresan proteinler (RFP); tetramerik toksisiteyi engellemek için genetik modifikasyonlar ile oluşturulmuştur (Shaw et al., 1992).

Reporter genler arasında lusiferaz ışık üreten enzimlerden biridir ve dışarıdan herhangi bir eksitasyon kaynağına ihtiyaç duymamaktadırlar. Lusiferaz aynı zamanda floresan ile karşılaştırıldığında daha az arka plan kirliliğine neden olmaktadır. Lusiferaz enzim kaynağı ise bazı bakteriler, denizel kabuklular, balıklar ve böceklerdir. Ateşböceği (Fluc) ve Renilla (Rluc) lusiferaz en çok bilinilenlerdir. Substratları ise lusiferin ve koelenterazindir (Contag and Bachmann, 2002).

In vivo biyoluminesens görüntüleme bakteriyel enfeksiyon modelleri oluşturarak kullanılmaktadır ve bunun için bir toprak bakterisi olan *Photobacterium luminescens* lusiferaz kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bakteriyel lusiferaz, aynı promotor kontrolü altında 5 farklı polisistronik genler tarafından ifade edilmektedir ve lux operon (LuxA, B, C, D and E) olarak bilinmektedir. LuxAB, heterodimerik bakteriyel lusiferazı kodlamaktadır LuxCDE ise yağ-asidi redüktaz enzim kompleksi gibi substrat sentezleyen enzimleri kodlamaktadırlar. Lux operon kullanılarak dizayn edilmiş bakteriyel reporter sistemi bir fare modelinde kullanılmaktadır ve enfeksiyon süresince takip edilmekte ve emisyon dalga boyu ise 490 nm olarak belirlenmektedir (Contag and Bachmann, 2002; Youn and Hong, 2012).

Y. enterocolitica gelişmekte olan ülkelerde önemli bir yersiniosis etkenidir. Türkiye’de her ne kadar *Y. enterocolitica* suşlarının saptanmasına yönelik araştırmalar yapılmış olsa da yersiniosis olgusu ya da *Y. enterocolitica* suşlarının patojenik biyoserotiplerinin belirlenmesi amaçlı çalışmalar yetersiz kalmaktadır. Bu bilgiler ışığında tezimizin ilk amacı İzmir İl’i içerisinde, çeşitli kaynaklardan patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının saptanması ve moleküler karakterizasyonudur.

Araştırmamızın önemli ikinci amacı ise; *Y. enterocolitica* O:3 serotipi kullanılarak; önemli virülens faktörü olan LPS’in; *in vitro* ve *in vivo* koşullardaki moleküler regülasyonunun anlaşılmasını sağlamaktır. Bu amaçla; LPS yapısının iki önemli bileşeni olan outer core ve O-antijen’in lusiferaz reporter sistemi tasarlanarak,

in vivo koşullarda endirekt mRNA ifadesi IVIS spektrum kullanılarak takip edilmiştir. Böylece enfeksiyon sırasında outer core ve O-antijenin enfeksiyonun hangi aşamasında nasıl bir biyolojik rolü olduğu anlaşılarak öncül bir çalışma gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. İzolasyon Kaynakları

Çalışmamız sırasında *Y. enterocolitica* suşlarının izolasyonu için kullanılan izolasyon kaynakları ve örnek sayısı **çizelge 3.1**'de belirtilmiştir.

Çizelge 3. 1. İzolasyon kaynakları ve örnek sayısı

Materyal	İzolasyon kaynağı	Lokasyon	Örnek sayısı (n)
Dışkı-1	Diyareli hasta	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesi	102
Dışkı-2	Domuz	Menemen, Kesik köyü	4
ve gübre			
Su-1	Körfez, kanal, belediye havuz suyu ve kuyu suyu	İzmir Kuzey ve Güney bölgesinde bulunan su kaynakları	12
Su-2	Atık su	Aliğa	2
		Menemen	2
		Çiğli	2
Toplam			124

3.1.2. Bakteriyel suşlar ve plazmitler

Pozitif kontrol olarak kullanılan *Y. enterocolitica* suşları Helsinki Üniversitesi, *Yersinia* araştırma laboratuvarı suş koleksiyonundan sağlanmıştır. Bu suşlar sırasıyla; *Y. enterocolitica* O:3 6471/76 (Skurnik, 1984), *Y. enterocolitica* O:5,27 JDE657 (Schiemann et al., 1981), *Y. enterocolitica* O:8 8081 (Portnoy and Falkow, 1981) ve *Y. enterocolitica* O:9 Ruokola/71 (Skurnik, 1984)'dir. Pozitif kontrol suşları; Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Genetik ve Mikrobiyoloji Araştırma laboratuvarında *Y.*

enterocolitica suşlarının izolasyonu ve tanınması amacıyla mikrobiyolojik testler, MALDI-TOF®MS ve PCR analizlerinde kullanılmıştır. Lusiferaz reporter suşlarının dizaynı sırasında özel *Y. enterocolitica*, *Escherichia coli* suşları ve plazmitler; klonlama ve allelik-exchange analizlerinde kullanılmıştır (**Çizelge 3. 2**).

Çizelge 3.2. Lusiferaz reporter sisteminin dizaynı sırasında kullanılan bakteriyel suşlar ve plazmitler

Bakteriyel suş	Tanım	Kaynak
<i>Y. enterocolitica</i> suşları		
YeO3 (6471/76)	Serotip O:3, pYV ⁺	hasta izolatu
YeO3_1521::LuxCDE/2	pEfB7-b::tersyönlü, YeO:3 suşundan orijinlenmiş	Bu çalışma
YeO3_1521::LuxCDE/1	pEfB7-a::doğruyönlü, YeO:3 suşundan orijinlenmiş	Bu çalışma
lux _{poc}	fb2:2/LuxCDABE/1, Outercore reporter; YeO3	Bu çalışma
lux _{pop1}	fb3:2/LuxCDABE/1, O-antijen reporter; YeO3	Bu çalışma
<i>E. coli</i> suşları		
S17-1λpir	<i>thi pro hsdR⁻ hsdM⁺ recA::RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7, Str^r(λpir)</i>	Life technologies®

Çizelge 3.2 (devam)

SY327 λ pir	$\Delta(\text{lac pro})$ <i>argE</i> (Am) <i>rif</i> <i>nalA</i> <i>recA56</i> (λ pir)	Life technologies®
SM10 λ pir	Kanamisin ^R , tcR	Life technologies®
ω 7249	β 2163 Δ nic35 Km ^R Ery ^R	Life Technologies®
DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(\text{mrr-hsd RMS-mcrBC})$, ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>ara</i> Δ 139 $\Delta(\text{ara, leu})$ 7697 <i>galU</i> , <i>galK</i> λ <i>rpsL</i> <i>nupG</i> λ <i>tonA</i> ,	Life Technologies®
Plazmit		
pTetlux1	<i>tetR</i> geni and <i>p_{tet}</i> promotor	
	BW19610/pSW23T, suicide plazmit	Monika Rybak
pKNG101	Streptomisin ^R , suicide plazmit	Life Technologies®
pEfB1	pSW23T'e klonlanmış LuxAB kaseti	Bu çalışma
pEfB2	luxAB kasedinin akışyukarı bölgesine klonlanmış pop1 promotoru	Bu çalışma
pEfB3	LuxAB kasetinin akışyukarı bölgesine klonlanmış poc promotoru	Bu çalışma
pTetLuxCDE	pTetLux1- <i>LuxAB</i>	Bu çalışma
pSW23T_ Δ M	pSW23T plazmidinin <i>mfeI</i> kesim bölgesi silinmiş vektör	Bu çalışma
pEfB4	pSW23T_ Δ M'eklonlanmış <i>YE1203</i> - 0751 gen bölgesi	Bu çalışma

Çizelge 3.2 (devam)

pEfB5	pEfB4 vektörünün self ligasyonu	Bu çalışma
pEfB6-a	<i>LuxCDE</i> kasetinin MfeI kesim bölgesine of pEfB5/doğru yönlü vektöre ligasyonu	Bu çalışma
pEfB6-b	<i>LuxCDE</i> kasetinin MfeI kesim bölgesine pEfB5/ters yönlü vektöre ligasyonu	Bu çalışma
pEfB7-a	pKNG101/doğru yönlü BamHI kesim bölgesine YE1203-0751 ve <i>LuxCDE</i> kasetinin ligasyonu	Bu çalışma
pEfB7-b	pKNG101/doğru yönlü BamHI kesim bölgesine YE1203-0751 ve <i>LuxCDE</i> kasetinin ligasyonu	Bu çalışma

3.1.3. Besiyerleri

Y. enterocolitica suşlarının izolasyonu ve tanımlanması amacıyla kullanılan besiyerleri; PBS (fosfat tamponlu su), PSB sıvı besiyeri (%1'lik sorbitol ve %0,15'lik safra tuzu içeren fosfat tamponlu su), Cefsulodin Irgasan Novobiocin Agar (CIN) (Sigma), Irgasan-ticarcillin-potassium cholorate (ITC) sıvı besiyeri (Sigma), *Salmonella-Shigella-sodium deoxycholate-calcium choloride* (SSDC) (Merck), PMB/PSMB (%1 mannitol, %1 sorbitol ve % 0,15 safra tuzu içeren fosfat tamponlu su), Maya ekstraktı-Rose Bengal sıvı besiyeri (YER), Triptik soy broth (TSB) (Merck), Modifiye edilmiş Triptik soy broth (mTSB), Mac Conkey Agar (Merck), Luria Bertani agar (Sigma) ve Luria Bertani sıvı besiyeri (Sigma), Simon's Sitrat Agar (Merck), Kligler's Demir Agar (Merck) ve Deoksiribonükleaz (DNaz) test agar kullanılmıştır.

PBS

gr/L

dH ₂ O.....	800 ml
NaCl.....	8,0 gr
KCl.....	0,20 gr
Na ₂ HPO ₄	1,44 gr
KH ₂ PO ₄	0,20 gr
dH ₂ O.....	1,0 L
(pH:7.45)	

Besiyeri içeriği gerekli miktarlarda tartıldıktan sonra üzerine belirlenen hacimlerde disitile su ilave edilmiştir ve besiyeri içeriğinin homojen olarak çözünmesi sağlandıktan sonra belirli hacimlerde tüplere paylaştırılmıştır ve 121°C'de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir. PBS besiyeri; diyare hastalarından dışkı örnekleri ile domuz çiftliğinden alınmış olan domuz dışkısı ve gübre örneklerinin, su kaynaklarının ön zenginleştirme işlemleri amacıyla kullanılmıştır (El Qouqa et al., 2011).

PSB

gr/L

Pepton.....	5,0 gr
Sorbitol.....	10,0 gr
NaCl.....	5,0 gr

Na₂HPO₄.....1,20 gr
 Safra Tuzu.....1,50 gr
 dH₂O.....1,0 L

Besiyeri içeriği gerekli miktarlarda tartıldıktan sonra üzerine belirlenen hacimlerde distile su koyulmuştur ve besiyeri içeriğinin homojen olarak çözünmesi sağlandıktan sonra belirli hacimlerde tüplere paylaştırılmıştır ve 121 °C’de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir. PSB besiyeri; diyare hastalarından dışkı örnekleri ile domuz çiftliğinden alınmış olan domuz dışkısı ve gübre örneklerinin, su kaynaklarının ön zenginleştirme işlemleri amacıyla kullanılmıştır (El Qouqa et al., 2011).

PSMB/PMB

gr/L

Pepton.....5,0 gr
 Sorbitol.....10,0 gr
 NaCl.....5,0 gr
 Na₂HPO₄.....1,20 gr
 Safra Tuzu.....1,5 gr
 Mannitol.....%1,0
 dH₂O.....1,0 L

Besiyeri içeriği gerekli miktarlarda tartıldıktan sonra üzerine belirlenen hacimlerde distile su ilave edilmiştir ve besiyeri içeriğinin homojen olarak çözünmesi sağlandıktan sonra belirli hacimlerde tüplere paylaştırılmıştır ve 121 °C’de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir. PSMB/PMB ön zenginleştirme besiyeri; su kaynaklarından alınmış olan su numunelerinin ön zenginleştirme işlemleri amacıyla kullanılmıştır. (El Qouqa et al., 2011; Fredriksson-Ahomaa and Korkeala, 2003).

YER

gr/L

Maya Özütü.....5,0 gr
 Na₂PO₄.....17,25 gr
 Safra Tuzu.....2,0 gr
 NaClO₂1,0 gr
 MgSO₄.....0,01 gr

Rose Bengal.....0,04 gr
dH₂O.....1,0 L

Besiyeri içeriği gerekli miktarlarda tartıldıktan sonra üzerine belirlenen hacimlerde distile su koyulmuştur ve besiyeri içeriğinin homojen olarak çözünmesi sağlandıktan sonra belirli hacimlerde tüplere paylaştırılmıştır ve 121 °C’de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir. YER ön zenginleştirme besiyeri; su kaynaklarından alınmış olan su numunelerinin ön zenginleştirme işlemleri amacıyla kullanılmıştır (Fredriksson-Ahomaa and Korkeala, 2003).

mTSB

gr/L

TSB (triptik soy broth).....30,0 gr
Maya özütü.....2,50 gr
Safra tuzu.....2,0 gr
Irgasan.....4,0 mg/ml
dH₂O.....1,0 L
pH: 7.6

Besiyeri içeriği gerekli miktarlarda tartıldıktan sonra üzerine belirlenen hacimlerde distile su koyulmuş ve besiyeri içeriğinin homojen olarak çözünmesi sağlandıktan sonra 121 C’de 15 dakika otoklav ile sterilizasyona maruz bırakıldıktan sonra 45 C’ye kadar soğutulduktan sonra filtrasyon ile steril edilmiş olan Irgasan (4,0 mg/ml) ilave edilmiştir. mTSB besiyeri; atık su tesislerinden alınmış olan atık su numunelerinin ön zenginleştirme işlemleri amacıyla kullanılmıştır (Cheyne, 2008).

SSDC Agar

gr/L

Sodyum Deoksikolat.....10,0 gr
Laktoz.....10,0 gr
Sodyum sitrat.....10,0 gr
Safra tuzu.....8,50 gr
Na₂S₂O₃.....5,42 gr
Enzimatik hayvan dokusu.....5,0 gr
Et özütü.....5,0 gr

Maya özütü.....	5,0 gr
CaCl ₂	1,0 gr
Demir (III)sitrat.....	1,0 gr
Nötral kırmızısı.....	0,025 gr
Brilliant yeşili.....	0,0003 gr
Bakteriyolojik agar.....	15,0 gr
dH ₂ O.....	1,0 L
pH: 7.6	

Dehidre besiyeri belirlenen hacme göre tartıldıktan sonra üzerine distile su ilavesi yapılmıştır. 121 °C’de 15 dakika otoklav ile sterilizasyonu sağlandıktan sonra 45 °C’ye kadar soğutulmuş ve steril petrilere 15-20 ml olacak şekilde ve aseptik koşullarda paylaştırılmıştır. SSDC besiyeri, ön zenginleştirme işlemleri tamamlanmış olan izolasyon materyallerinden olası *Y. enterocolitica* kolonilerini saptamak amacıyla kullanılmıştır (Johnson, 1998; Soderqvist et al., 2012).

CIN Agar **gr/L**

Mannitol.....	20,0 gr
Proteaz pepton.....	3,0 gr
Pepton.....	17,0 gr
Maya özütü.....	2,0 gr
Sodyum piruvat.....	2,0 gr
NaCl.....	1,0gr
Sodyum deoksikolat.....	0,50 gr
Sodyum kolat.....	0,50 gr
Nötral kırmızısı.....	30,0 gr
MgSO ₄	10,0 gr
Irgasan®	4,0 gr
Cefsulodin.....	4,0 gr
Novobiosin.....	2,50 gr
Kristal viyoleto.....	1,0 gr
Agar.....	13,5 gr
dH ₂ O.....	1,0 L
pH 7.4 +/- 0.2	

Dehidre besiyeri belirlenen hacimde formülasyona göre tartıldıktan sonra üzerine distile su ilavesi yapılmıştır. 121 °C’de 15 dakika otoklav ile sterilizasyonu sağlandıktan sonra 50-55°C’ye kadar soğutulmuş, CIN besiyeri tamamlayıcısı olan Novobiosin, Irgasan çözeltisi ilave edilmiştir ve steril petrilere 15-20 ml olacak şekilde ve aseptik koşullarda paylaştırılmıştır. CIN besiyeri, ön zenginleştirme işlemleri tamamlanmış olan izolasyon materyallerinden olası *Y. enterocolitica* kolonilerini saptamak amacıyla kullanılmıştır (Johnson, 1998; Soderqvist et al., 2012).

TSB

gr/L

Kazein pepton.....17,0 gr
Soya pepton.....3,0 gr
NaCl.....5,0 gr
K₂HPO₄.....2,50gr
Dekstroz.....2,50 gr
dH₂O.....1,0 L
pH 7,3 +/- 0,2

Dehidre besiyeri belirlenen hacme göre tartıldıktan sonra üzerine distile su ilavesi yapılmıştır. 121 °C’de 15 dakika otoklav ile sterilizasyonu sağlandıktan sonra 45 °C’ye kadar soğutulmuş ve steril petrilere 15-20 ml olacak şekilde ve aseptik koşullarda paylaştırılmıştır. TSB besiyeri; çevresel su örneklerinin zenginleştirilmesi ve atık su örneklerinin ön zenginleştirme işlemi sırasında mTSB besiyerini hazırlamak amacıyla kullanılmıştır (Cheyne et al., 2009).

MR-VP sıvı besiyeri (Methyl-Red Voges Proskauer Broth)

gr/L

Pepton (et özütü):7,0 gr
D(+) Glukoz:.....5,0 gr
Fosfat tamponu:.....5,0 gr
dH₂O.....1,0 L

Besiyeri içeriği gerekli miktarlarda tartıldıktan sonra üzerine belirlenen hacimlerde distile su ilave edilmiştir ve besiyeri içeriğinin homojen olarak çözünmesi sağlandıktan sonra belirli hacimlerde tüplere paylaştırılmıştır ve 121°C’de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir MR-VP sıvı besiyeri, izolasyonu ve tanılanması yapılmış

olan *Y. enterocolitica* suşlarının biyotiplendirilmesi analizlerinde kullanılmıştır (Johnson, 1998).

CR-MOX Agar **gr/L**

Triptik soy agar40,0 gr

dH₂O.....825,0 ml

121°C’de 15 dakika otoklavlanır ve 55°C’ye kadar soğutulduktan sonra aşağıdaki bileşenler eklenir:

- a) 80 ml 0,25 M sodyum okzalat çözeltisi
- b) 80 ml 0,25 M Magnezyum klorid çözeltisi
- c) 10 ml % 20 D-galaktoz çözeltisi
- d) 5 ml %1 Kongo kırmızısı çözeltisi

Eskulin Agar **gr/L**

Polipepton.....10,0 gr

Eskulin.....1,0 gr

Ferrik Amonyum sitrat.....1,0 gr

Agar.....5,0 gr

dH₂O.....1,0 L

Besiyeri içeriği gerekli miktarlarda tartıldıktan sonra üzerine belirlenen hacimlerde distile su ilave edilmiştir ve besiyeri içeriğinin homojen olarak çözünmesi sağlandıktan sonra belirli hacimlerde tüplere paylaştırılmıştır ve 121°C’de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir Eskulin agar, izolasyonu ve tanılanması yapılmış olan *Y. enterocolitica* suşlarının biyotiplendirilmesi analizlerinde kullanılmıştır (Johnson, 1998).

İndol Test Kültür Ortamı:

Bakto pepton..... %1,0

Besiyeri içeriği gerekli miktarlarda tartıldıktan sonra üzerine belirlenen hacimlerde distile su ilave edilmiştir ve besiyeri içeriğinin homojen olarak çözünmesi sağlandıktan sonra belirli hacimlerde tüplere paylaştırılmıştır ve 121°C’de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir İndol test kültür ortamı, izolasyonu ve tanılanması yapılmış olan *Y. enterocolitica* suşlarının biyotiplendirilmesi analizlerinde kullanılmıştır (Johnson, 1998).

Pyrazinamid Agar: **gr/L**

Tryptik soy agar.....30,0 gr
 Pyrazin karboksiamid.....1,0 gr
 0.2 M Tris-maleat tamponu.,1,0 ml
 dH₂O.....999 ml
 (pH:6.0)

Besiyeri içeriği gerekli miktarlarda tartıldıktan sonra üzerine belirlenen hacimlerde distile su ilave edilmiştir ve besiyeri içeriğinin homojen olarak çözünmesi sağlandıktan sonra belirli hacimlerde tüplere paylaştırılmıştır ve 121°C’de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir. Pyrazinamid agar, izolasyonu ve tanılanması yapılmış olan *Y. enterocolitica* suşlarının biyotiplendirilmesi analizlerinde kullanılmıştır (Johnson, 1998).

Tween 80 Agar: **gr/L**

Pepton.....10,0 gr
 NaCl.....5,0 gr
 CaCl₂.....0,1 gr
 Agar.....15,0 gr
 dH₂O.....1,0 L

Agar base 121 °C’de 15 dakika otoklavlanır. 45-50 °C’ye kadar soğutulur. Agar base’den ayrı olarak Tween 80 de 121°C’de 20 dakika otoklavlanır. Steril koşullarda Tween 80; son derişimi %1 (V/V) olacak şekilde Agar base’e eklenir. Tween 80 agar,

izolasyonu ve tanılanması yapılmış olan *Y. enterocolitica* suşlarının biyotiplendirilmesi analizlerinde kullanılmıştır (Efsa, 2007).

Fenol kırmızısı ksiloz sıvı besiyeri **gr/L**

Nutrient broth.....8,0 gr
Ksiloz.....%0,5-1
dH₂O.....1,0 L
pH indikatörü: fenol-red

Fenol kırmızısı Trehaloz sıvı besiyeri **gr/L**

Nutrient broth.....8,0 gr
Trehaloz.....%0,5-1
dH₂O.....1,0 L
pH indikatörü: fenol-red

Fenol kırmızısı Salisin sıvı besiyeri **gr/L**

Nutrient broth.....8,0 gr
Salisin.....%0,5-1
dH₂O.....1,0
pH indikatörü: fenol-red

DNAz Test Agar **gr/L**

Triptoz.....2,0 gr
Deoksiribonükleik asit..... 2,0 gr
NaCl.....5,0 gr
Agar.....15,0 gr
dH₂O.....1,0 L

Besiyeri içeriği gerekli miktarlarda tartıldıktan sonra üzerine belirlenen hacimlerde distile su ilave edilmiş, besiyeri içeriğinin homojen olarak çözünmesi sağlandıktan

sonra belirli hacimlerde tüplere paylaştırılarak 121°C’de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir. Fenol kırmızısı ksiloz, trehaloz, salisin ve DNaz besiyerleri; izolasyonu ve tanılanması yapılmış olan *Y. enterocolitica* suşlarının biyotiplendirilmesi analizlerinde kullanılmıştır (Johnson, 1998;Efsa, 2007).

ITC sıvı besiyeri

gr/L

Tripton.....	10,0 gr
Maya özütü.....	1,0 gr
MgCl ₂ *6H ₂ O.....	60,0 gr
NaCl.....	5,0 gr
malaşit yeşili %0.2 (w/v).....	5,0 ml
KClO ₃	1,0 gr
Irgasan.....	1,0 gr
Ticarsillin.....	1,0 gr
dH ₂ O.....	1,0 L

Dehidre besiyesi belirlenen hacimde formülasyona göre tartıldıktan sonra üzerine belirlen hacimde distile su ilavesi yapılmış ve belirli hacimlerde tüplere paylaştırıldıktan sonra 121°C’de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir. ITC sıvı besiyeri; diyare hastalarından dışkı örnekleri ile domuz çiftliğinden alınmış olan domuz dışkısı ve gübre örneklerinin, su kaynaklarının ön zenginleştirme işlemleri amacıyla; seçici ayırt edici önzenginleştirme sıvı besiyeri olarak kullanılmıştır (Laukkanen et al., 2010).

Kligler’s demir agar

gr/L

Polipepton.....	20,0 gr
Laktoz.....	20,0 gr
Dekstroz.....	1,0 gr
NaCl.....	5,0 gr
Ferrik amonyum sülfat.....	0,5 gr
Sodyum tiyosülfat.....	0,5 gr

Agar.....	15,0 gr
Fenol kırmızısı.....	0,025 gr
dH ₂ O.....	1,0 L

Dehidre besiyesi belirlenen hacimde formülasyona göre tartıldıktan sonra üzerine belirlen hacimde distile su ilavesi yapılmıştır ve belirli hacimlerde tüplere paylaştırıldıktan sonra 121°C’de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir. Kligler’s demir agar, CIN agar besiyerinde “dana gözü” morfolojindeki kolonilerin H₂S üretilip üretilmediği kontrol edilmiştir (Johnson, 1998).

Simon’s Sitrat agar **gr/L**

NH ₄ 2PO ₄	1,0 gr
K ₂ HPO ₄	1,0 gr
NaCl.....	5,0 gr
Sodyum Sitrat.....	2,0 gr
MgSO ₄	0,2 gr
Bromtimol mavisi.....	0,008 gr
Agar.....	13,0 gr
dH ₂ O.....	1,0 L

Dehidre besiyesi belirlenen hacimde formülasyona göre tartıldıktan sonra üzerine belirlen hacimde distile su ilavesi yapılmış ve belirli hacimlerde tüplere paylaştırıldıktan sonra 121°C’de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir. Simon’s Sitrat Agar, CIN agar besiyerinde “dana gözü” morfolojindeki kolonilerinin sitratı karbon kaynağı olarak kullanmaları test edilmiştir (Johnson, 1998).

MacConkey Agar **gr/L**

Kazain pepton.....	17,0 gr
Et özütü pepton.....	3,0 gr
NaCl.....	5,0 gr
Laktoz.....	10,0 gr
Safran tuzu karışımı.....	1,50 gr
Nötral Kırmızısı.....	0,03 gr
Kristal viyole.....	0,001 gr

Agar.....	13,50 gr
dH ₂ O.....	1,0 L

Dehidre besiyesi belirlenen hacimde formülasyona göre tartıldıktan sonra üzerine belirlen hacimde distile su ilavesi yapılmıştır; 121°C’de 15 dakika otoklav ile steril edildikten sonra 45 °C’ye kadar soğutulduktan sonra aseptik koşullarda steril petrilere 15-20 ml hacimlerde aktarılmıştır MAC besiyeri ile, CIN agar besiyerinde “dana gözü” morfolojinde olan kolonilerin, laktoz fermentasyonu test edilmiştir (Johnson, 1998).

Luria Agar **gr/L**

Trypton.....	10,0 gr
Maya özütü.....	5,0 gr
NaCl.....	5,0 gr
Agar.....	10,0 gr
dH ₂ O.....	1,0 L

Dehidre besiyesi belirlenen hacimde formülasyona göre tartıldıktan sonra üzerine belirlenen hacimde distile su ilavesi yapılmıştır. 121°C’de 15 dakika otoklav ile steril edildikten sonra 45 °C’ye kadar soğutulmuş ve aseptik koşullarda steril petrilere 15-20 ml hacimlerde aktarılmıştır. Luria agar; lusiferaz reporter suşlarının dizaynı ve inşası sırasında kullanılmıştır (Havens et al., 2003).

Luria Bertani sıvı besiyeri **gr/L**

Trypton.....	10,0 gr
Maya özütü.....	5,0 gr
NaCl.....	5,0 gr
dH ₂ O.....	1,0 gr

Dehidre besiyesi belirlenen hacimde formülasyona göre tartıldıktan sonra üzerine belirlen hacimde distile su ilavesi yapılmıştır ve belirli hacimlerde tüplere

paylaştırıldıktan sonra 121°C’de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir. Luria bertani sıvı besiyeri; lusiferaz reporter suşlarının dizaynı ve inşası sırasında kullanılmıştır (Havens et al., 2003).

3.1.4. Çözelti, tampon ve enzimler

Çözelti, tampon, enzim ve antibiyotikler; *Y. enterocolitica* suşlarının fenotipik ve genotipik tanılanması, lipolisakkarit profillerinin belirlenmesi, PCR, klonlama ve hayvan deneylerinde kullanılmıştır.

Gram’ın Kristal Violet Boyası

Kristal Violet.....2 gr
Etil Alkol (%95’lik).....20 ml
Amonyum oksalat.....0,8 gr
dH₂O1000 ml

20 ml etil alkolde 2 gr kristal violet çözülmüştür. 80 ml distile suda da 0,8 gr amonyum oksalat çözüldükten sonra bu çözeltiye alkolde çözülmüş olan kristal violet ilave edilerek karıştırılmıştır. Hazırlanan bu boya çözeltisi, gram boyama işleminde kullanılmıştır (Tamer vd., 1989).

Gram’ın Safranin Boyası

Safranin..... 0,25 gr
Etanol.....10 ml
dH₂O1000 ml

Safranin etanolde çözüldükten sonra distile su ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra filtre kağıdından süzülerek gram boyama işlemlerinde kullanılmıştır (Tamer vd., 1989).

Gram İyodür Çözeltisi

İyot.....1,0 gr
Potasyum iyodür.....2,0 gr

dH₂O300 ml

İyot ve potasyum iyodür, havanda toz haline getirildikten sonra distile su yavaş yavaş ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Elde edilen bu çözelti gram boyama işlemlerinde kullanılmıştır (Tamer vd., 1989).

%95'lik Etanol

Saf Etil alkol.....95 ml

dH₂O.....5 ml

KOH Çözeltisi gr/L

NaCl.....5.0 gr

KOH.....2.5 gr

dH₂O.....1.0 L

Salin Çözeltisi gr/ml

NaCl.....0,075 gr

Na₂HPO₄.....0,046 gr

NaH₂PO₄.....0,009 gr

dH₂O..... 1 ml

% 5'lik Sükroz Çözeltisi gr/L

Sükroz.....50,0 gr

dH₂O.....1,0 L

Kloraramfenikol (Sigma, ≥98% (HPLC), 20 mg/μl

Streptomisin (Sigma), 10 mg/μl

Kanamisin (Sigma), 10 mg/μl

Desferal[®] Novartis (500mg)

EcoRI (New England Biolabs[®]); CutSmart[®] Restriksiyon enzmi (10,000 units/ml),
Nebbuffer (10X)

BamHI (New England Biolabs[®]); CutSmart[®] Restriksiyon enzmi (10,000 units/ml),
Nebbuffer (10X)

Sall (Promega); Restriksiyon enzimi 2000 Unit/ml, Tango Buffer (10X)

Fast Digest MfeI (=MunI), (Thermo scientific); Restriksiyon enzimi, 20 rxn, 10X
fastDigest[®] Tamponu

T4 DNA Ligaz (Thermo Scientific, Fermentas 5U/L)

10X DOC tamponu **gr/L**

%0,25 DOC..... 25,0 gr
192 mM glisin.....144,1 gr
26 mM Tris-base.....31,5 gr
dH₂O.....1,05 ml
pH:8.4

DOC liziz tamponu **10ml**

%10 DOC.....2 ml
Merkaptoetanol.....0,4 ml
%100 gliserol.....1 ml
1,8 M Tris (pH:6,8).....5,55 ml
bromfenol mavisi..... 0,001 gr
dH₂O.....1,05 ml

%12'lik ayırma (Separating) jel **2 ml**

Akril:bis (30:0,8).....800 µl
 %10,0 DOC.....100 µl
 1,5 M Tris (pH:8,8).....500 µl
 %10 Amonyum persülfat.....10 µl
 dH₂O.....600 µl
 TEMED.....1 µl

%4 'lük Stacking Jel **1 ml**

Akril:bis (30:0,8).....133 µl
 %10,0 DOC.....50 µl
 0,5 M Tris (pH:6,8).....250 µl
 %10 Amonyum persülfat.....10 µl
 dH₂O.....567 µl
 TEMED.....1 µl

Fiksasyon Çözeltisi-1 **500 ml**

Metanol..... 250 ml
 Asetik asit.....50 ml
 dH₂O.....200 ml

Fiksasyon Çözeltisi-2 **500 ml**

Metanol..... 37,5 ml
 Asetik asit.....25 ml
 dH₂O.....200 ml

AgNO₃ Çözeltisi **50 ml**

10 N NaOH.....100 µl

NH ₄ OH.....	700 µl
AgNO ₃	0,35 gr
dH ₂ O.....	49 ml

Film geliştirici (Development) Çözeltisi **100 ml**

Sitrik asit.....	5 mg
Formaldehit.....	50 µl
dH ₂ O.....	95 ml

Reaksiyon durdurma Çözeltisi 100 ml

Asetik asit.....	1 ml
dH ₂ O.....	99 ml

TE (Tris EDTA) Tamponu: 10 mM Tris-HCl (pH:8.0)
1mM EDTA (pH:8.0)

Tris-borate- EDTA tamponu (TBE): Stok çözeltisi (5x/L)

	54 gr Tris Base
27.5 gr Borik asit	
20 ml 0.5 M EDTA (pH: 8.0)	

1X Çalışma çözeltisi:

89 mM Tris base
89 mM borik asit
2 mM EDTA
İzopropanol
Etanol (%70)

EDTA çözeltisi: (0,5 M) pH:8,0

186,1 gr disodium EDTA.2H₂O 1000 ml distile su

dNTP karışımı (Sigma; her deoksinükleotid trifosfattan 100 mM)

MgCl₂ çözeltisi (Fermantas, 3 mM)

Tag DNA Polimeraz (Fermantas, 500 U)

Dynazyme polimeraz (Finenzymes, 500 U)

Marker DNA'lar (Fermentas, O Gene Ruler 100 bp ve 1 Kb)

Tag buffer (Fermentas, 10X)

% 1 Agaroz Jel

1g.....Agaroz

100ml.....1 X TBE

5µl.....GelRed

% 1,5 Agaroz Jel

1,5g.....Agaroz

100ml.....1X TBE

5µl.....GelRed

% 2 Agaroz Jel

1,5 g.....Agaroz

100 ml.....1 X TBE

5 µl.....GelRed

Agaroz (Sigma)

10000 X GelRed (Biotium)

Orange G (Fermentas)

Proteinaz K (20 mg/ml) (Sigma)

6-8 haftalık 37 adet balb/c fare (Kobay A.Ş., Ankara)

3.1.5. Primerler

Çalışmada kullanılan primerler BM laboratory system (Ankara, Türkiye) ve Helsinki Üniversitesi *Yersinia* araştırma laboratuvarı tarafından sentezlenmiştir. Dupleks PCR ile *ail* (bağlanma ve invazyon lokus geni) ve 16S rRNA amplifikasyonu ile patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının genotipik tanılanması ve standart PCR ile plazmit ve kromozom aracılı kodlanan virülens genlerinin saptanması hedeflenmiştir (**Çizelge 3. 3**) Ayrıca Lusiferaz reporter suşlarının inşası sırasında kullanılan primerlerin listesi **Çizelge 3. 4**'de belirtilmiştir. Primer dizaynı sırasında **Chipster V3.1.** programı kullanılmıştır

Çizelge 3.3. Kromozom ve plazmit aracılı kodlanan virülens genlerini ve o-antijen spesifik genleri kodlayan primerler

PCR hedef bölge	Primer adı	dizi (5' → 3')	Size (bp)	Kaynak
<i>ail</i>	A1	ttaatgtgtacgctgggagtg	425	Wannet et al., 2001
	A2	agtattcatatgaagcgtc		
16S rRNA geni	Y1	aataccgcataacgtcttcg	330	Wannet et al., 2001
	Y2	cttcttctgcgagtaacgtc		
<i>ystA</i> sıcaklık stabil-enterotoksin	<i>ystA</i>	atcgacaccaataaccgctg ag ccaatcactactgacttcggc t	79	Thoerner et al., 2003
<i>ystB</i> , enterotoksin (1A biyotipi)	<i>ystB</i>	gtacattaggccaagagac g gcaacatacctcacaacacc	146	Thoerner et al., 2003
<i>Y. enterocolitica yadA</i> geni	<i>yadA</i>	cttcagatactggtgtcgctg t atgcctgactagagcgatat cc	849	Thoerner et al., 2003
<i>Y. enterocolitica</i> and <i>Y. pseudotuberculosis</i> Yop regülönun transkripsiyonel aktiviteörü	<i>virF/lcrF</i>	ggcagaacagcagtcagac ata ggtgagcatagagaatacgt cg	561	Thoerner et al., 2003
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 /O-antijen operon	per-6 per-7	attgacttatattgcttcgggta aaggtagctacatgtcgctc at	272	Skurnik Laboratory
<i>Y. enterocolitica</i> O:3 / O-antijen operon	o3wb595 9r o3wb511 9f	attagcaatctcgggggaat gaattgcatctgcacagaac	840	Skurnik Laboratory
<i>Y. enterocolitica</i> O:5 / O-antijen operon	O5-7699r O5-7011f	actctccgctgattgtcgtt taggcctgccaactcaagat	688	Skurnik Laboratory

Çizelge 3. 4. Lusiferaz reporter sistem için kullanılan primerler

Primer	Hedef bölge	Dizi (5'→ 3')	Boyut (bp)	Kaynak
Lux2F	<i>luxAB</i> gen kaseti	CGCGGATCCTTCAAGCT GCTGCTTTGTTG	2081	Bu çalışma
Lux2R		CGCGAATTCACCTCAA TAGCAATATAAGGACTC T		
O3ocP-fS	Outer core promotoru (<i>Poc</i>)	CGGGTCGACATGAGGGC CCATAGACCTTT	445	Bu çalışma
O3ocP-rE		CGGCGAATTCTCCCTTGT AACAAAAGCAAAGA		
O3op1-fS	O- antigen promotoru (<i>Pop1</i>)	CGGGTCGACTCTTTAAG CATGGCGGTCAGT	409	Bu çalışma
o3op1-rE		CGGCGAATTGCCCCAA AAATGAGAATGAA		
Lux1F	<i>luxAB</i> kaseti knock-out pTetlux1	AGTGAACGAATCCCCAG GAG	8139	Bu çalışma
Lux1R		TTAAGACAGAGAAA TTGCTTGATTTTCA		
1521-F1M	Ye1203-0751	GGCGGATCCGGTGAAAG GCGATGATGAACCC	1485	Bu çalışma
1521-R1		GGCGGATCCTGCCAATC AGCATCACTGT		
1521-F3	pEfB4 mutajenesisi	GGCCAATTGTTTTACTTA ATAGCCCTCAACTCAGA CAG	3308	Bu çalışma
1521-R3		GGCCAATTGTATTTAGTG CGGTAATTGGGCTTGTTT GGGCAAAGATGGAAAAA TGA		
LuxC-F	<i>LuxC</i>	TCCCCAAGCGACAATAA CAT	498	Bu çalışma
LuxC-R		CCTATCCCTCTTCTATGG GAG		
ms-09-F	<i>yadA</i>	GCTACTCCATCTTTCTGG GCG	472	Bu çalışma
ms-10-R				

1.1.1. Kullanılan başlıca cihazlar

Mikro santrifüj (14.000g) (Hettich EBA 12R)

Spektrofotometre (Varian Carry 50)

Yatay elektroforez (Consart HU 13)

Güç Kaynağı (1500 V) (Sigma)

Palm Cycler (Corbett Research)

T100 Thermal Cycler PCR (Bio-Rad®)

Palm Cycler (Biorad)

U.V. Transilüminatör (254nm)

Eppendorf BioPhotometer Spectrophotometer UV/VIS

HIDEX plate CHAMELEON, 4.08

Bioscreen C incubator (Growth Curves Ab Ltd)

Hoefer miniVE Yatay Elektroforez Sistemi (Amersham, Biosciences)

IVIS (*In vivo* görüntüleme sistemi, Perkin Elmer, Life technologies®)

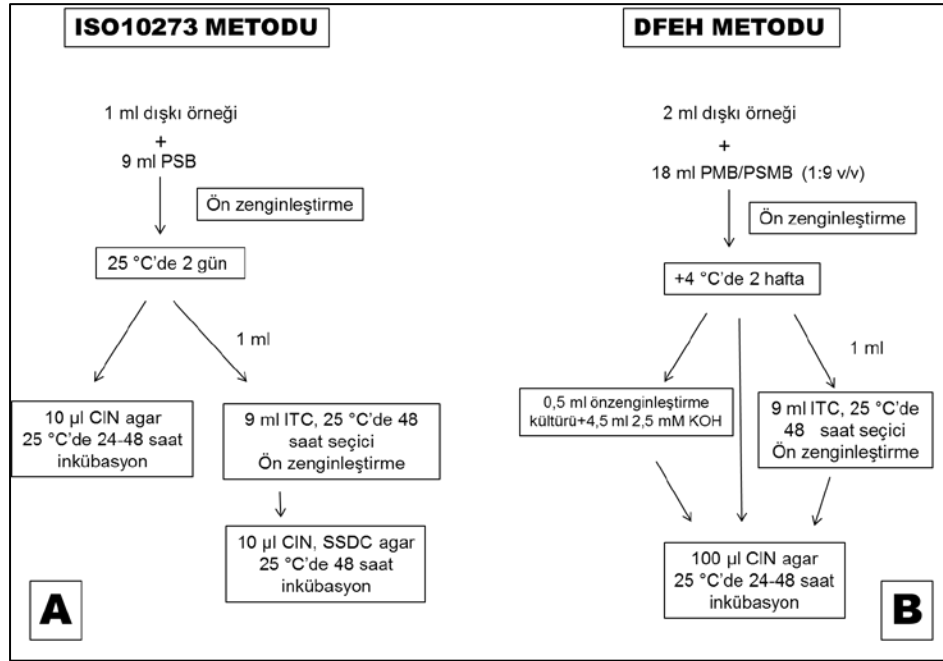
MALDI-TOF®MS (bioMérieux)

3.2. Metot

3.2.1. İnsan dışkı örneklerinden *Y. enterocolitica* izolasyonu

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi'nde kayıtlı hasta örneklerinden; Ekim 2012-Ocak 2013 tarihleri arasında, 62 çocuk ve 40 yetişkin olmak üzere toplam olarak 102 diyareli hasta dışkısı *Y. enterocolitica* suşlarını saptamak amacı ile analize alınmıştır. Analizi yapılan örneklerin alındığı tüm hastalarda 24 saat içerisinde günde üç veya daha fazla dışkılama ve sıvı kaybı, sulu dışkı gibi diyare belirtileri gözlenmiş ayrıca incelemeye alınan dışkı örneklerinin mikroskopik incelemesi sonucu bol miktarda lökosit ve/veya eritrosit saptanmıştır. Dışkı örnekleri *Y. enterocolitica* dışında; *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp, *Shigella* spp. ve diyarejenik *Escherichia coli* suşlarının varlığı açısından da incelenmiştir.

Dışkı örnekleri vakit kaybetmeden Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Genetik ve Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarına aktarılmıştır. *Y. enterocolitica* suşlarının izolasyonu için öncelikle ISO10273 metodu uygulanmıştır: 1 ml dışkı örneği ön zenginleştirme işlemi için 9 ml PSB sıvı besiyerine aktarılmış ve 25°C'de 2 gün inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyondan sonra ön zenginleştirme ortamından 10 µl alınarak CIN agar besiyerine inoküle edilmiş ve örnekler 25°C'de inkübasyona kaldırılmıştır. Aynı ön zenginleştirme kültür ortamından 1 ml zenginleştirme kültürü, 9 ml ITC sıvı besiyerine aktarılmış ve 25°C'de 48 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonrasında 10 µl zenginleştirilmiş kültür CIN besiyeri ve SSDC besiyeri ortamına yayma plaka ile inoküle edilmiş ve 25°C'de 48 saat inkübasyona kaldırılmıştır (**Şekil 3.1.A**) (Denis et al., 2011).



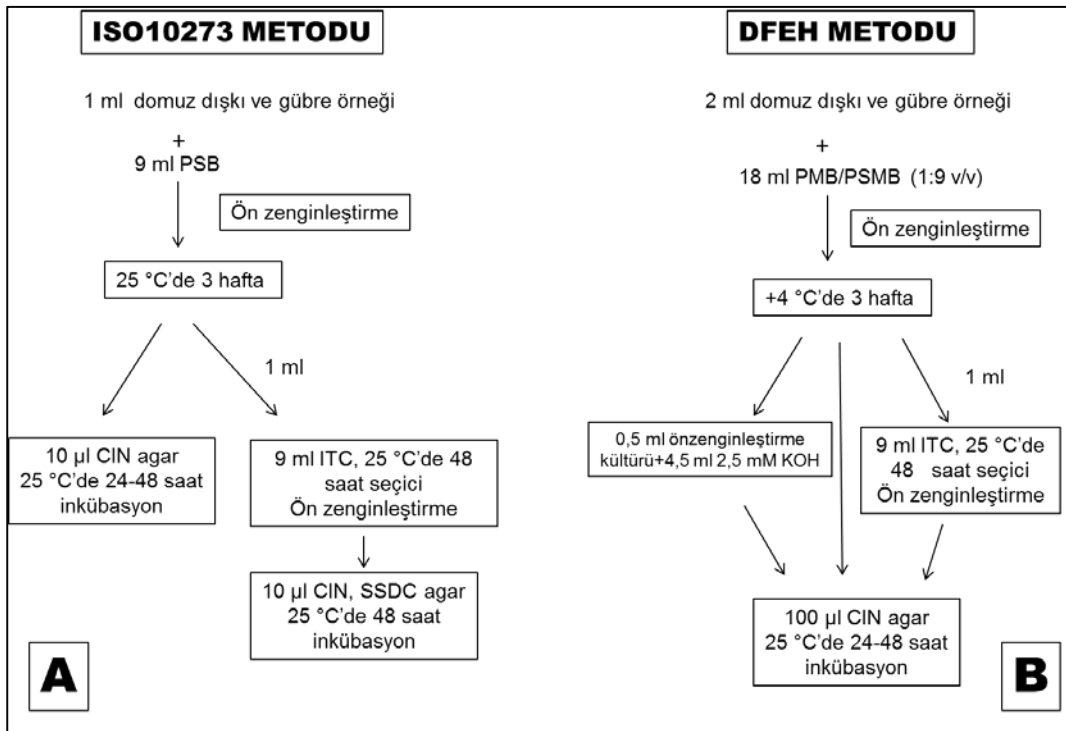
Şekil 3.1. İnsan dışkı örneklerinden *Y. enterocolitica* izolasyonu işlem akış şeması.

Ayrıca insan dışkı örneklerine izolasyon için DFEH (Department of Food and Environmental Hygiene, University of Helsinki) metodu da uygulanmıştır (Laukkanen et al., 2010). Bu metot iki farklı ön zenginleştirme yönteminden oluşmaktadır: %0.5'lik pepton, %1'lik mannitol ve %0.15'lik safra tuzundan oluşan PMB/PSMB ile soğuk soğuk zenginleştirme işleminde 2 ml dışkı örneği 18 ml PMB/PSMB (1:9 v/v) ortamına aktarılmıştır ve +4 °C'de 2 hafta inkübasyona kaldırılmıştır ve aynı dışkı örneklerinden 1 ml alınarak 9 ml ITC sıvı besiyerine aktararak 25 °C'de 2-3 gün inkübasyona kaldırılmıştır inkübasyon sonrasında 100 µl ön zenginleştirme kültürü CIN agar besiyerine aktarılmıştır (Atobla K. et al., 2012; Laukkanen et al., 2010) ve aynı zamanda ön zenginleştirme kültürlerine alkaline uygulaması yapılmıştır: her bir ön zenginleştirme kültürü (0.5 ml), 4.5 ml, 2.5 mM KOH ve % 0.5'lik alkali çözeltisi ile kısa süre muamele edilmiştir ve tekrar CIN agar besiyerine inokülasyonu yapılarak 25 °C'de 2-3 gün inkübasyona kaldırılmıştır (Aulisio et al., 1980) (Şekil 3.1.B) .

3.2.2. Domuz dışkısı ve domuz gübresinden *Y. enterocolitica* izolasyonu

İzmir ili, Menemen İlçesi Kesik köyü sınırları içerisinde bulunan domuz çiftliğinden, çiftlik sahibinden özel izin alınarak; domuz gübresi ve domuz dışkısından

Y. enterocolitica suşları araştırılmıştır. 2 adet domuz gübresi ve 2 adet domuz dışkısı örneği steril taşıma kaplarına toplanarak buz çantası içerisinde laboratuvara taşınmış ve aynı gün içinde analize alınmıştır. Örnekler iki farklı işlem uygulanmıştır: i) Dışkı ve gübre örnekleri direkt olarak CIN agar besiyeri ortamlarına paralel olarak inokülasyonları yapılmıştır. ii) DFEH metodu ve ISO10273 metodu uygulanmış ancak ön zenginleştirme süresi 3 haftaya kadar uzatılmıştır. Şüpheli kolonilere (“Boğa gözü”; koloninin ortası koyu pembe, çevresi şeffaf halka şeklinde çevrelenmiş) tanılama amaçlı daha ileri biyokimyasal testler uygulanmıştır (Şekil 3.2).

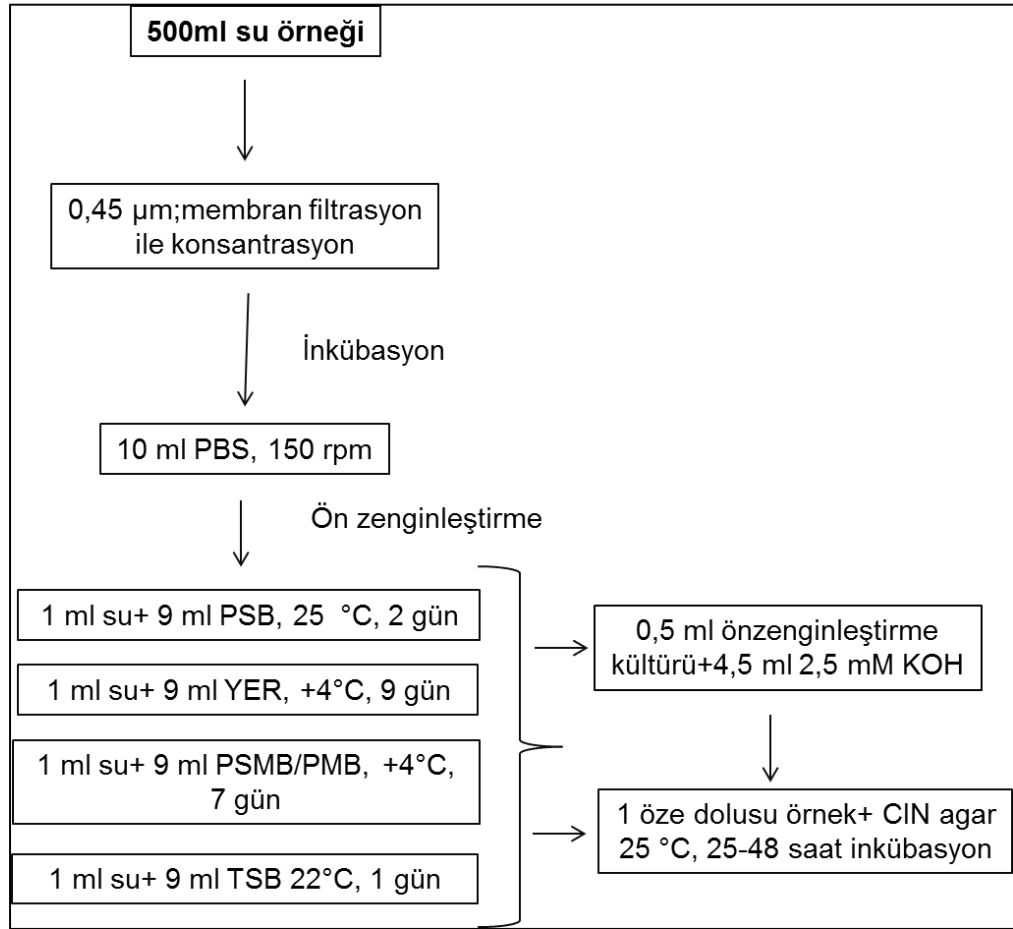


Şekil 3.2. Domuz dışkısı ve domuz gübresinden *Y. enterocolitica* izolasyonu işlem akış şeması

3.2.3. Su kaynaklarından *Y. enterocolitica* izolasyonu

2012 yılında İzmir'in Kuzey ve Güney bölgelerindeki 6 istasyondan aseptik koşullarda körfez, kanal, belediye havuz suyu ve kuyu suyu örnekleri (n=12; Bostanlı kanal-I, Bostanlı kanal-2, Bayraklı Körfez, Konak Belediye'si havuz suyu, Manisa İl'i, Akhisar İlçesi kuyu suyu) 500 ml'lik steril numune kaplarında toplanmıştır ve soğuk zincirde laboratuvara taşınmıştır. 500 ml su örnekleri 0.45µm'lik nitroselüloz membran filtre (S-Pak, Sigma Aldrich) ile vakum pompası aracılığı ile konsantre edilmiştir. Filtre daha sonra 10 ml PBS tamponu (pH:7.45) ile oda sıcaklığında 150

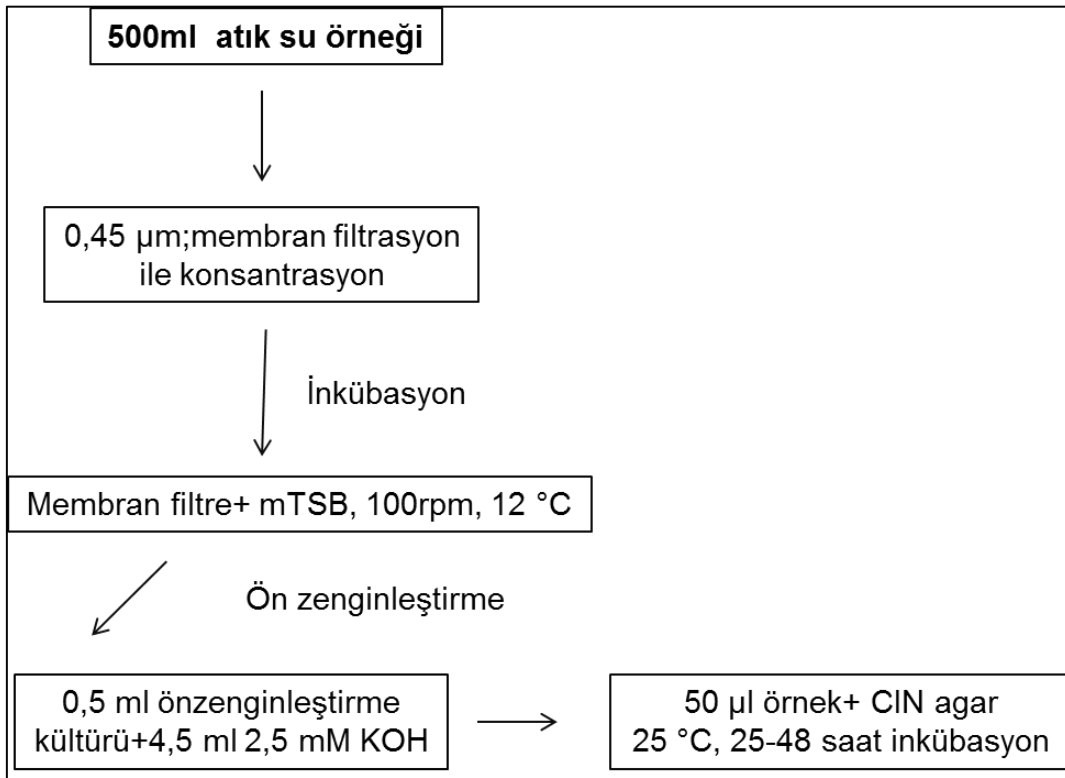
rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Konsantre edilmiş su örneklerinden *Y. enterocolitica* suşlarının saptanması için dört farklı zenginleştirme işlemi uygulanmıştır: i) konsantre edilmiş olan 1 ml su, 9 ml PSB ön zenginleştirme ortamına aktarılmıştır ve 25°C’de 2 gün inkübasyona kaldırılmıştır ii) 1ml su örneği 9 ml YER zenginleştirme ortamına aktararak +4°C’de 9 gün inkübasyona kaldırılmıştır; iii) PSMB/PMB zenginleştirme ortamında +4°C’de 7 gün ve iv) TSB zenginleştirme ortamında 22°C’de 1 gün inkübasyona kaldırılmıştır (Atobla K. et al., 2012; Fredriksson-Ahomaa and Korkeala, 2003; Laukkanen et al., 2009). İnkübasyon sonucu her bir zenginleştirme ortamından bir öze dolusu örnek CIN agar besiyeri ortamına inokülasyonları yapılmıştır ve 25°C’de 24-48 saat inkübasyona kaldırılmıştır. Aynı zamanda her bir zenginleştirme ortamı alkalın uygulaması yapılarak CIN agar besiyeri ortamına inokülasyonları yapılmış ve aynı sıcaklık ve sürede inkübasyona kaldırılmıştır (Şekil 3. 3).



Şekil 3.3. Su kaynaklarından *Y. enterocolitica* izolasyonu işlem akış şeması.

3.2.4. Atık su arıtma tesislerinden *Y. enterocolitica* izolasyonu

İzmir ili çevresinde bulunan ve İzmir Büyükşehir Belediyesi'nden alınan resmi izin ile 3 farklı atık su arıtma tesisinden (Aliğa, Menemen ve Çiğli) atık su örnekleri toplanmıştır. Her bir tesisten 2'şer atık su örneği alınarak toplam olarak 500 ml su numune kaplarında olmak üzere 6 su numunesi alınmış ve soğuk zincirde laboratuvara taşınarak ve mTSB zenginleştirme besiyeri kullanılarak 24 saat içerisinde analize alınmıştır. 500 ml su örnekleri 0.45µm'lik nitroselüloz membran filtre (S-Pak, Sigma Aldrich) ile vakum pompası aracılığı ile konsantre edilmiş ve filtrasyon sonrası membran filtreler mTSB zenginleştirme ortamına aktarılarak 100 rp'de 24 saat ve 12 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası zenginleştirme sıvı besiyerinden 50 µl kültür CIN agar besiyerine alkalın uygulaması ile birlikte inoküle edilerek ve 25°C'de 24-48 saat inkübasyona kaldırılmıştır (**Şekil 3.4.**) (Cheyne, 2008).



Şekil 3. 4. Atık su arıtma tesislerinden *Y. enterocolitica* izolasyonu işlem akış şeması.

3.2.5. *Y. enterocolitica* suşlarının tanılanması

Her bir CIN agar besiyerinden “boğa gözü” (ortası koyu pembe kenarları şeffaf) morfolojisinde en az 5 koloni alınarak Gram boyama, sitrat ve laktoz fermentasyonu, Kligler demir testi gibi fenotipik tanılama amaçlı biyokimyasal testler gerçekleştirilmiştir. Sitrat, Gram reaksiyonu ve laktoz fermentasyon reaksiyonu negatif olan ve ayrıca Kligler demir testi sonucu H₂S üretimi olmaksızın alkali reaksiyon gösteren koloniler; lizisi gerçekleşmeden protein spektrumlarını tür spesifik kütüphane verilerine göre MALDI-TOF[®]MS (bioMérieux) cihazı ile kesin fenotipik tanılamaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 48 kuyucuk içeren MS cihazına özel lam kullanılmıştır. 24 saatlik olası *Y. enterocolitica* kolonisinden alınmış ve kuyucuğa aktarılmıştır ve cihaz *Y. enterocolitica* pozitif suşları ile kalibre edilmiştir. Analiz sırasında koloniye ait proteinler fragmentasyon olmaksızın lazer ve küçük organik asitler ile iyonizasyonu sağlanmıştır. Proteinlerin yük kütle oranları belirlenmiş ve bu oranlar MALDI-TOF[®]MS veri kütüphanesi ile karşılaştırılarak bilinmeyen bakteriyel koloninin tür seviyesine kadar tanılanması sağlanmıştır (Dubois et al.,2012).



Şekil 3.5. MALDI-TOF/VITEK[®]MS (<http://www.biomerieux-diagnostics.com/>)

3.2.6. *Y. enterocolitica* suşlarının biyotiplendirilmesi ve fenotipik patojenite testleri

MALDI-TOF[®]MS cihazı ile fenotipik tanılamaları gerçekleştirilen *Y. enterocolitica* suşlarının biyotiplendirme analizleri gerçekleştirilmiş ve fenotipik patojenite testleri yapılmıştır. Biyotiplendirme testleri çeşitli biyokimyasal testleri kapsamaktadır: lipaz enzim aktivitesi, eskulin hidrolizi, salisin reaksiyonu, indol testi, D-ksiloz testi, trehaloz reaksiyonu, pyrazinamidaz, voges-proskauer ve DNaz testleridir (Efsa, 2007). Fenotipik patojenite testleri olarak; MR-VP sıvı besiyeri içerisinde otoaglutinasyon testi ve Kongo kırmızısına bağlanma testleri gerçekleştirilmiştir (Johnson, 1998) (**Çizelge 3. 5**).

Çizelge 3.5. Fenotipik biyotiplendirme referans tablosu

Test Adı	Biyogrup					
	1A	1B	2	3	4	5
Lipaz (Tween-Esteraz)	+	+	-	-	-	-
Eskulin Hidrolizi	+	-	-	-	-	-
Salisin (asit üretimi)	+	-	-	-	-	-
Pyrazinamidaz	+	-	-	-	-	-
İndol üretimi	+	+	(+)	-	-	-
Xylose (asit üretimi)	+	+	+	+	-	-
Trehalose (asit üretimi)	+	+	+	+	+	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	?
DNAaz aktivitesi	-	-	-	-	+	?

Ksiloz ve trehaloz testi: *Y. enterocolitica* suşları ksiloz ve trehaloz test kültür ortamlarına inokülasyonları yapılmıştır ve 25°C’de 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar 1., 2.,3.,4...10. güne kadar ksiloz ve trehaloz kullanım reaksiyonu kontrol edilmiştir (Silva et al., 2013).

Salisin testi: *Y. enterocolitica* suşları salisin test kültür ortamına inokülasyonları yapılmıştır ve 35°C’de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır Salisin kullanımı. 4. gün sonunda fenol red indikatörüne göre değerlendirilmiştir (Silva et al., 2013).

Eskulin hidrolizi: *Y. enterocolitica* suşları yatık eskulin kültür ortamlarına inokülasyonları yapılmıştır ve 25°C’de 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. Eskulin besiyerinde koloni etrafında oluşan siyahlanma eskulinin hidrolize olduğunu göstermektedir. Eskulin reaksiyonu biyogruplar arasında farklılık göstermektedir (Silva et al., 2013).

İndol testi: *Y. enterocolitica* suşları bakto pepton veya triptofan sıvı kültür ortamlarına inokülasyonları yapılmış ve 28°C’de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. İndol testi kontrolü için kovak’s ayıracı kullanılmıştır ve sıvı besiyeri yüzeyinde kırmızı halka oluşumu indol kullanımının pozitif olduğunu göstermektedir(Silva et al., 2013).

VP (Voges Proskauer) Testi: *Y. enterocolitica* suşları MR-VP sıvı kültür ortamlarına inokülasyonları yapılmıştır ve 25°C 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası; 6 ml α - naphthol eklenir ve karıştırılır ve daha sonra 0,2 ml 40% KOH + 0,3% keratin eklenir ve karıştırılır. Sonuçlar 15- 60 dakika aralıkları ile değerlendirilmiştir (EFSA, 2007).

Lipaz Testi: : *Y. enterocolitica* suşlarının Tween-80 agar’a ekimleri yapılarak 28 °C’de 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonucu koloni etrafında opak bir zon oluşumu lipaz enzim aktivitesini göstermektedir (EFSA, 2007).

Pyrazinamidaz Testi: *Y. enterocolitica* suşları Pyrazinamide Agar yatık kültür ortamına inokülasyonları yapılmıştır ve 25°C 48 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonucu kültür yüzeyine Fe^{+2} amonyum sülfat çözeltisi damlatılmıştır. 15 dakika sonra pembe renkten kahverengine doğru bir renk değişimi *Y.enterocolitica* suşlarında pyrazinoik asit (PYR) varlığını göstermektedir. Patojenik suşlarında PYR genellikle negatiftir (Johnson,1998).

DNaz testi: *Y. enterocolitica* suşlarını DNaz test ortamına bir öze yardımı ile 3-4 cm kalınlıkta şerit halinde inokülasyonu yapılarak ve 28°C’de 18-24 saat inkübasyona

kaldırılmıştır. İnkübasyon sonrası şerit halindeki koloninin üzerinden 1 N HCl ile yıkanmış ve koloni çevresinde açık bir zon oluşması suşun deoksiribonükleaz aktivitesi olduğunu göstermiştir (Johnson,1998).

Otoaglutinasyon: *Y. enterocolitica* suşlarının paralel şekilde MR-VP sıvı besiyerine inokülasyonları yapılarak, 25°C ve 35°C’de 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonucu oda sıcaklığında inkübasyona kaldırılan suşlar besiyeri içerisinde homojen olarak büyümektedirler. Ancak 35°C’deki inkübasyon sonucu koloniler sıvı besiyerinin alt kısmında toplanmaktadır. Bu test suşların virülens plazmidini içerdiğini göstermektedir (Johnson, 1998).

Kongo-Kırmızısına bağlanma testi:

İzolatların triptik soy sıvı besiyerine inokülasyonları yapılarak 25°C 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. Daha sonra 24 saatlik kültürden 100 µl CR-MOX agar besiyerlerine yayma plaka şeklinde inokülasyonları yapılmış ve tekrar 37°C’de 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonucu koloni çapı küçük koloniler büyüme sırasında kongo-kırmızısına bağlanmış ise büyüme sırasında kalsiyuma ihtiyaç duyduğunu ve suşların virulens plazmidi içerdiklerini göstermektedir. Daha büyük ve renksiz koloni morfolojisi ise kolonilerin virülens plazmidini kaybettiklerini göstermektedir (EFSA, 2007; Johnson 1998).

3.2.7. DNA İzolasyonu ve PCR

Genomik DNA ve plazmit DNA izolasyonu kit kullanarak elde edilmiştir (Invitrogen). Kullanılan pirmerler **Çizelge 3.3 ve 3.4’de** listelenmiştir.

3.2.7.1. Dubleks PCR

Y. enterocolitica suşlarının genotipik tanılama amacı ile *ail* ve 16S rRNA gen bölgelerinin amplifikasyonunu sağlayan dubleks PCR yapılmıştır (Wannet et al., 2001).

Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde, aşağıdaki bileşenler sırasıyla 0,2 ml’ lik ince cidarlı bir PCR tüpüne konulmuştur: 160 nM 16S rRNA ve 80 nM *ail* primerleri,

200 μ M Dntp, 0.5 U Tag DNA polimeraz, 1X PCR tampon + 2.5 mM Mg_2Cl ve her PCR tüpü için 20 ng genomik DNA kalıp olarak kullanılmıştır.

Amplifikasyon programlanabilir bir termal döngü ile Corbett Palm Cycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

-İlk denatürasyon 94 °C’de 5 dakika

- 36 döngü, her döngüde;

I. 94°C’ de 45 saniye

II. 62°C’ de 40 saniye

III. 72 °C’ de 45 saniye

- PCR tüpleri son döngüden sonra 72°C’ de 10 dakika inkübe edilmiştir.

- Tüpler reaksiyon bittikten sonra 4°C veya -20 °C’de saklanmıştır.

3.2.7.2. Standart PCR

Kromozom ve plazmit aracılı virülens genlerinin saptanması, O-antijen genotiplendirme ve lusiferaz reporter suşlarının inşası amacıyla standart PCR analizi gerçekleştirilmiştir.

Kromozom ve plazmit aracılı virülens genlerinin saptanması:

Kromozom ve plazmit aracılı virülens genlerinin amplifikasyonu için ail, ystA, ystB, yadA, virF/lcrF primerleri kullanılmıştır (**Çizelge 3.3**). (Thoerner et al., 2003) Toplam reaksiyon hacmi 25 μ l olacak şekilde, aşağıdaki bileşenler sırasıyla 0,2 ml’ lik ince cidarlı bir PCR tüpüne koyulmuştur. Her primer çiftinden 1 μ M, 200 μ M Dntp, 1.25 U Tag DNA polimeraz, 1X PCR tamponu, 3 mM Mg_2Cl ve her PCR tübü için 20 ng/2,5 μ l genomik DNA ve plazmit DNA kalıp olarak kullanılmıştır.

Amplifikasyon programlanabilir bir termal döngü ile Corbett Palm Cycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

-İlk denatürasyon 95 °C’de 10 dakika

- 25 döngü, her döngüde;

I. 95°C' de 15 saniye

II. 57-63°C' de 30 saniye

III. 72 °C' de 30 saniye

- PCR tüpleri son döngüden sonra 72°C' de 10 dakika inkübe edilmiştir.

- Tüpler reaksiyon bittikten sonra 4°C veya -20 °C' de saklanmıştır.

O-Antijen genotiplendirme ve lusiferaz reporter sistem İnşası:

O-antijen spesifik primerler ve lux_{poc} ve lux_{pop1} reporter suşlarının inşası için kullanılan pimerler **Çizelge 3.3** ve **Çizelge 3.4**'de belirtilmiştir. Her iki analiz için standart PCR kullanılmıştır ve annealing sıcaklıkları hedef bölgenin büyüklüğüne (bp) göre optimize edilmiştir.

Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde, aşağıdaki bileşenler sırasıyla 0,2 ml' lik ince cidarlı bir PCR tüpüne koyulmuştur. Her primer çiftinden 1mM, 200 µM Dntp, 1.25 U Dynazyme, 1X Dynazyme buffer, ve her PCR tübü için 10 ng/ 0,5 µl genomik DNA ve plazmit DNA kalıp olarak kullanılmıştır.

Amplifikasyon programlanabilir bir T100 Thermal Cycler PCR cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

-İlk denatürasyon 95 °C' de 1 dakika

- 25 döngü, her döngüde;

I. 95°C' de 30 saniye

II. 57-65°C' de 20 saniye

III. 72 °C' de 1,20 dakika

- PCR tüpleri son döngüden sonra 72°C' de 10 dakika inkübe edilmiştir.

3.2.8. *Y. enterocolitica* suşlarının serotiplendirilmesi

Fenotipik ve genotipik tanılamaları yapılmış olan patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının serotiplendirilmesi Skurnik laboratuvarında bulunan *Yersinia* spesifik

bakteriyofajlar ile fenotipik olarak serotiplendirilmiştir (Baker and Farmer 3rd, 1982). Biyogrupları belirlenen 9 adet patojenik *Y. enterocolitica* suşu Luria bertani (LB) sıvı besi yerinde oda sıcaklığında 24 saat inkübasyonu sonucu; steril 15 ml'lik falkon tüplerine (100 µl) aktarılmıştır. Sıvı kültür; 3 ml soft agar (%1'lik agar) ile karıştırılmıştır. Bu karışım daha önceden hazırlanmış LB agar besiyerine aktarılmış ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. *Y. enterocolitica* suşlarına spesifik bakteriyofajların 1X PBS (pH:7.45) içerisinde seri seyreltmeleri (10^{-1} - 10^{-11}) yapılarak oda sıcaklığında bekletilmiş soft agar yüzeyine 5 µl spotlanmıştır. Oda sıcaklığında ve 37°C'de 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İki farklı sıcaklıkta inkübasyon sonucu liziz zonunun oluştuğu en küçük titre belirlenerek patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının serotipleri belirlenmiştir.

Fenotipik olarak serotipleri belirlenen patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının fenotipik sonuçlara dayanılarak; O-antijenine spesifik primerler kullanılarak standart PCR analizleri ile genotipik olarak da serogrupları belirlenmiştir ve doğrulanmıştır. (Çizelge 3.3)

3.2.9. *Y. enterocolitica* suşlarının lipopolisakkarit (LPS) profillerinin belirlenmesi

Patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının lipopolisakkarit izolasyonu deoxycholate-polyacrylamide-gel electrophoresis (DOC-PAGE) ve gümüş boyama analizleri ile gerçekleştirilmiştir (Skurnik et al., 1995). *Y. enterocolitica* suşlarının 24 saat oda sıcaklığında LB sıvı besiyerine inokülasyonları yapılmıştır. İnkübasyon sonucu aktif kültürden 0,5 ml alınmış, santrifüjlenerek üst sıvı atılmıştır ve DOC-liziz tamponu ile süspanse edilmiştir. 100°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir, inkübasyon sonrası 2-4 µl proteinaz K (20 mg/ml) ilave edilerek 55-60°C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. LPS izolasyonu sonrası DOC-PAGE jel kasetleri hazırlanmıştır Son olarak %10'luk amonyum persülfat ve TEMED ilave edilmiştir. Örnekler; DOC-PAGE tamponu ile 120V'da resolving jel için, 60-70 V'da stacking jel için yürütülmüştür. Gümüş boyama aşamasında ise jel; FIX 1 (Metanol, Asetik asit ve H₂O) çözeltisi içerisinde 30 dakika inkübe edilmiş ve 4x10 dakika su ile yıkanmıştır daha sonra jel 15 dakika gümüş nitrat çözeltisi (10 N NaOH ve NH₄OH) ile yıkanmış ve reaksiyon %1'lik

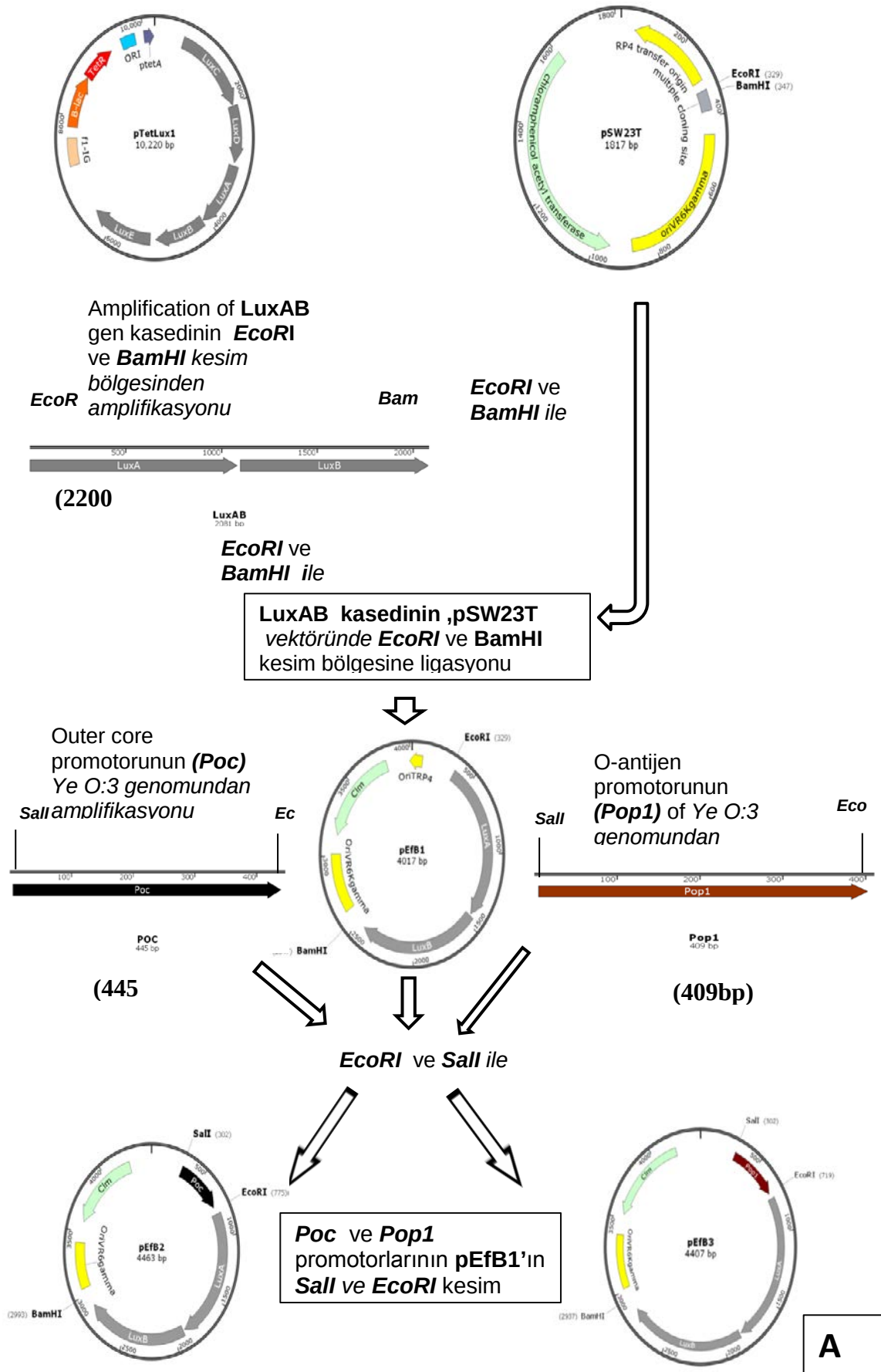
asetik asit ile durdurulmuştur. En son aşamada jel %5'lik gliserol içeren dH₂O ile yıkanmış ve kurutularak LPS profilleri görüntülenmiştir (Beczala, 2012).

3.2.10. *Y. enterocolitica* O:3 Suşu Kullanılarak luxCDABE Reporter Sisteminin Oluşturulması

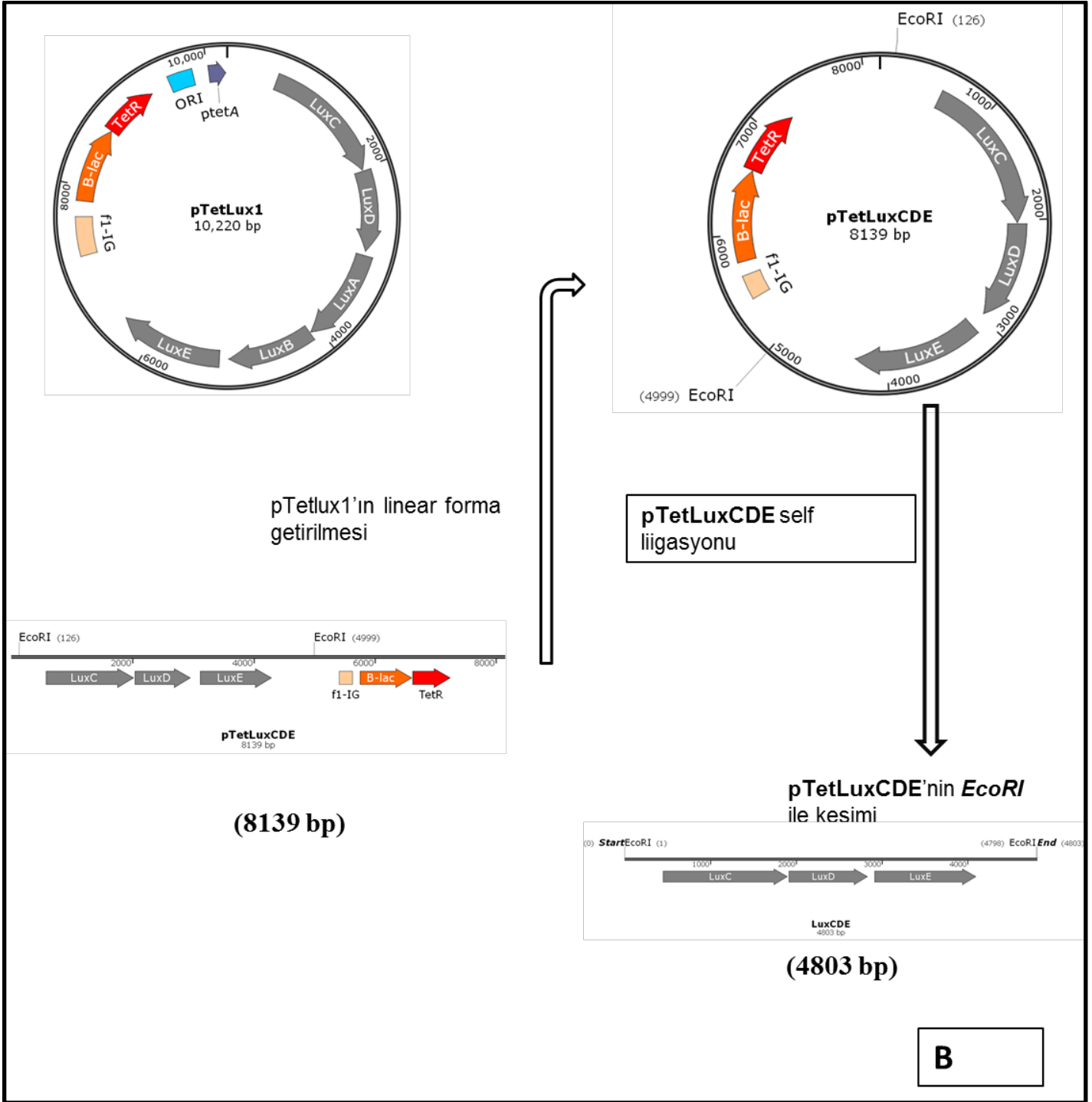
pTetlux1 plazmidi luxCDABE operonun kaynağı olarak kullanılmış ve pTetlux1 plazmidi kalıp olarak kullanılarak, luxAB operonunun (2200 bp) standart PCR ile (EcoRI ve BamHI flanking bölgeleri ile birlikte) amplifikasyonu yapılmıştır. EcoRI ve BamHI kesim bölgeleri içeren luxAB PCR ürünü EcoRI ve BamHI ile kesilmiş ve pSW23T suicide vektörün EcoRI ve BamHI kesim bölgesine ligasyonu yapılmıştır. Ligasyon reaksiyonu *E.coli* S17λpir komponent hücrelerine transformasyon ile aktararak transformantlar kloramfenikol antibiyotiği içeren LB agar besiyeri ortamından seçilmiştir. Ligasyonun yönü ve klonlama bölgesi PCR ve sekans analizleri ile doğrulanmıştır ve pEfB1 olarak isimlendirilmiştir. *Y.enterocolitica* O:3 genomundan O-antijen (pop1) ve outer core (poc) promotor bölgelerinin standart PCR ile amplifikasyonu yapılmıştır (Sall ve EcoRI flanking) (**Şekil 3. 6.**). Amplifikasyon sonucu PCR ürünü (O- antijen ve Outer core) EcoRI ve Sall ile kesilip, pEFB1'in akış yukarı bölgesine klonlaması yapılmıştır. Klonların seçimi aynı şekilde kloramfenikol antibiyotiği içeren LB agar besiyeri ortamından yapılmış ve promotor klonlamaları pEfB2 ve pEfB3 olarak isimlendirilmiştir. Bir sonraki aşamada *Y. enterocolitica* O:3 RNA dizi haritası yardımı ile sıcaklıktan bağımsız ifade edilen hipotetik protein olan Y11_01511– Y11_01531 bölge seçilerek PCR ile amplifikasyonu (BamHI flanking) gerçekleştirilmiştir. BamHI ile kesimi yapılan Y11_01511 – Y11_01531 bölgesi pSW23T suicide plazmitine ligasyonu yapılmıştır ve pEfB5 olarak isimlendirilmiştir (**Şekil 3.8.**).

Plazmit pTetlux1 kalıp olarak kullanılarak, plazmit PCR mutajenez (EcoRI flanking bölgesi içermektedir) ile luxCDE operonu pEfB5 plazmidine klonlanması (Y11_01511, Y11_01531 iki ORF bölgesi arasına) iki farklı oryantasyonda (pEfB6-a ve pEfB6-b) yapılmıştır. pEFB6-a ve pEfB6-b plazmidine klonlaması yapılan Y11_01511 + Y11_01531+luxCDE bölgesi, pKNG101 vektörüne klonlanmıştır. pKNG101; Y11_01511 + Y11_01531+luxCDE; *Y. enterocolitica* O:3 suşunun genomunda doğru entegrasyonu sağlamaktadır. Y11_01511 + Y11_01531+luxCDE

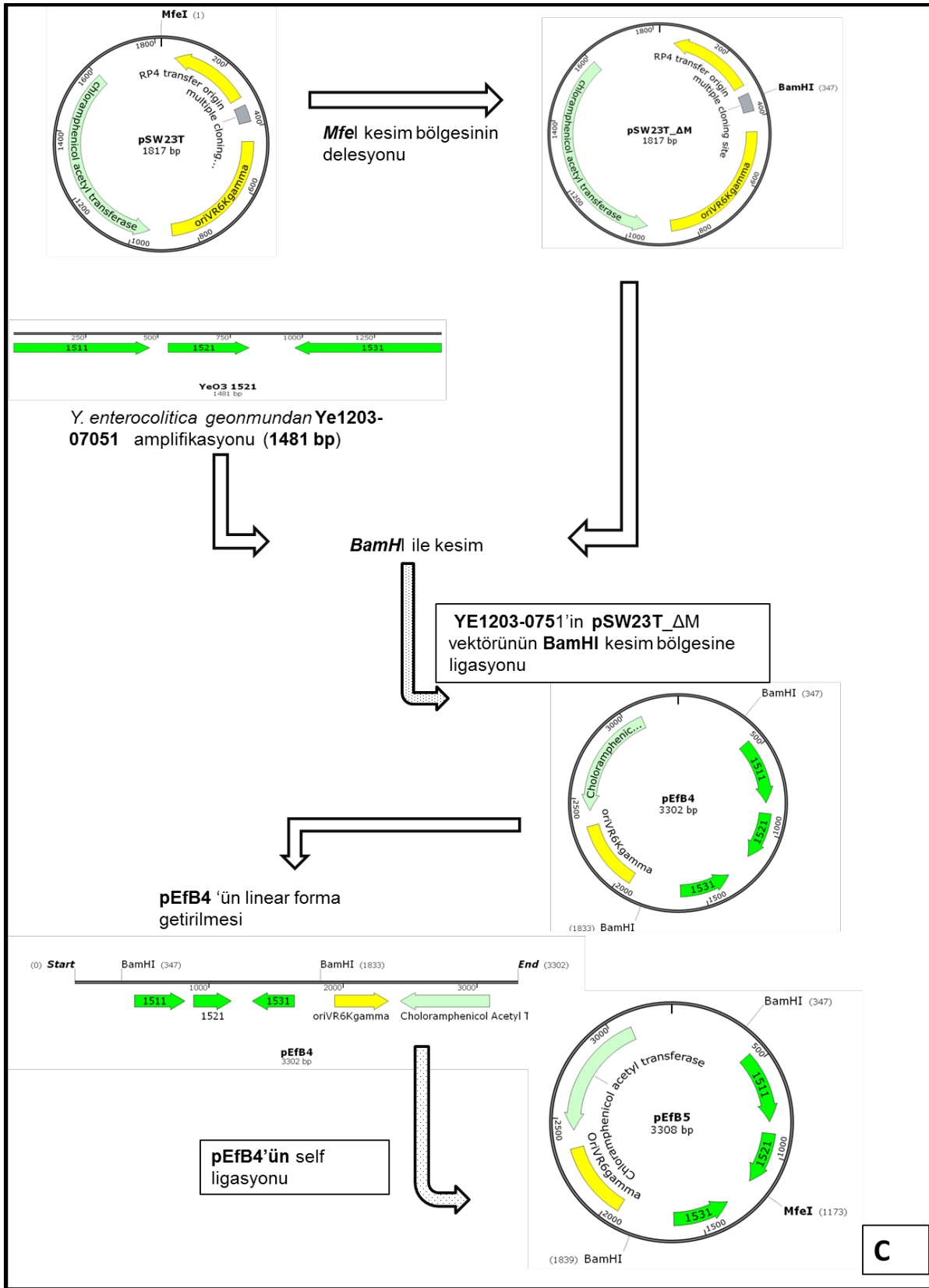
fragmenti pKNG101 vektörüne klonlanmış ve koloni PCR ve ortak kesim bölgesi olan BamHI ile iki farklı entegrasyon doğrulanmıştır ve pEFB7-a ve pEFB7-b olarak isimlendirilmiştir **Şekil 3.7** ve **Şekil 3.9**. luxCDABE reporter sistemi ile haberci *Y. enterocolitica* O:3 suşlarının oluşturulması için kullanılan primerler **Çizelge 3. 4.** 'de belirtilmiştir.



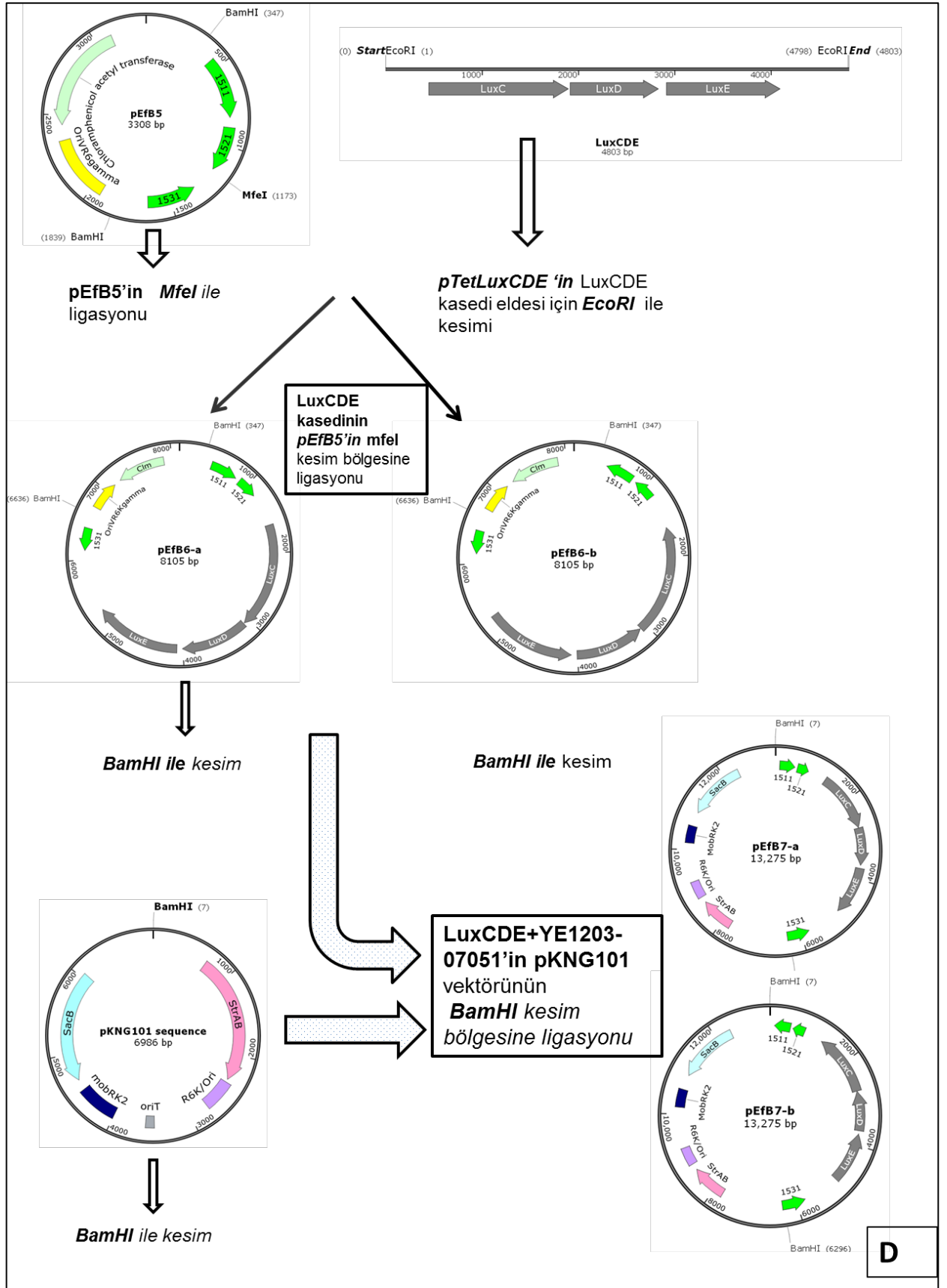
Şekil 3.6. luxAB reporter sisteminin oluşturulması (A)



Şekil 3.7. luxCDE reporter sisteminin oluşturulması (B).



Şekil 3.8. luxCDABE reporter sisteminin oluşturulması (C).



Şekil 3.9. luxCDABE reporter sisteminin oluşturulması (D)

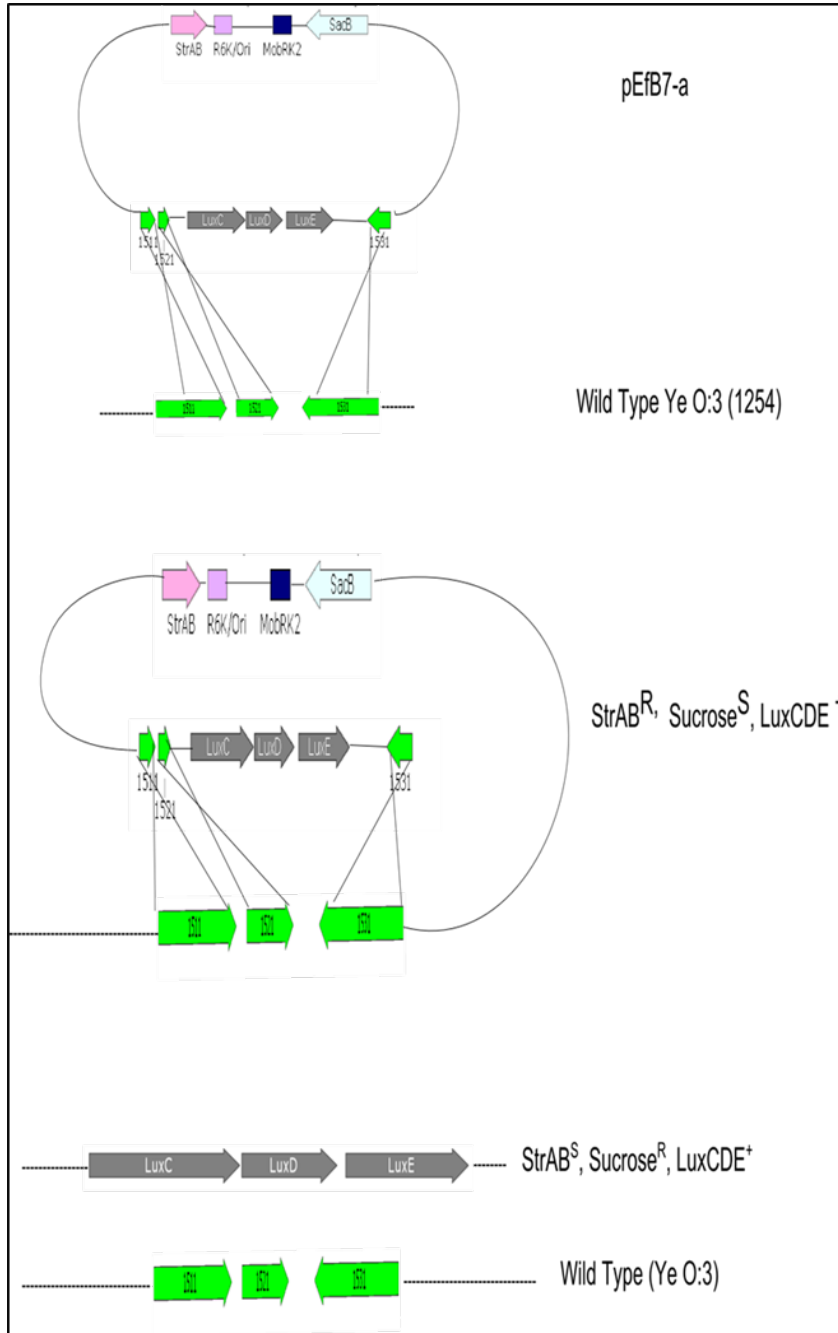
3.2.11. Suicide vektörlerin Konjugasyon ile Mobilizasyonu ve Mutant Suşların İzlenmesi

pEFB7-a ve pEFB7-b olarak dizayn edilen reporter suşların (*E.coli* SM10λpir strep^R) *Y. enterocolitica* O:3 suşuna (doğal suş, hasta izolatu) konjugasyonu gerçekleştirilmiştir. Donör bakteri olan *E. coli* SM10λpir (strep^R) , 5 ml LB sıvı besiyerinde 37°C’de ve 150 rpm’de Streptomisin (strep) antibiyotiği ilave edilerek (1mg/ ml) 150 rpm’de inkübasyona kaldırılmıştır. *Y. enterocolitica* O:3 suşu ise aynı koşullarda; 5 ml LB sıvı besiyeri ortamında 150 rpm’de ve 37 °C’de inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonrası 24 saatlik kültür; 1,500 x g, rpm ve 15 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve hücre pelleti OD600’deki absorbans değerine göre 1XPBS (pH:7.2) ile süspanse edilmiştir. Her bir *E. coli* SM10λpir ve *Y. enterocolitica* O:3 süspanسیونundan 50 µl alınarak antibiyotik içermeyen LA besiyeri’ne aktarılmış oda sıcaklığında 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonucu, eşleştirme karışımı 1 ml 1XPBS (pH: 7,2) ile yıkanmış ve seri dilüsyonları yapılarak streptomisin antibiyotiği içeren CIN agar besiyerine yayma plaka yöntemi ile ekimleri yapılarak ve oda sıcaklığında 2-7 gün inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonucu Streptomisin dirençli kolonilerin I. Krossing over için doğru entegrasyonu; CIN agar besiyeri içerisinde Streptomisin dirençli olan koloniler seçilmiş (transkonjugatlar) ve koloni PCR ve sekans analizleri ile doğrulanmıştır.

3.2.12. Sükroz seleksiyonu

Genoma doğru entegrasyon PCR ve sekans analizi ile doğrulanmış olan streptomisin dirençli *Y. enterocolitica* O:3 transkonjugatlarından 10 adet koloni seçilerek, %5 sükroz içeren LB sıvı besiyerinde herhangi bir antibiyotik ilavesi olmadan oda sıcaklığında 3 gün boyunca ve her gün kültür 1/5 oranında LB sıvı besiyeri ile kültür devamlılığı sağlanarak sükroz seleksiyonu sağlanmıştır. İnkübasyon sonrası rekombinantların %5’lik sükroz içeren besiyeri içerisinde büyümeleri kontrol edilmiştir. Strep^S ve sükroz^R olan koloniler seçilerek YeO:3 :: LuxCDE_1521 olarak isimlendirilmiştir (Şekil 3.9).

LuxAB kaseti içeren ve pEfB2 ve pEfB3 ile oluşturulan poc (outer core) ve pop1 (O-antijen)'un YeO:3::LuxCDE_1521'ye konjugasyon ile LuxCDE kasetinin akış aşağı bölgesine entegrasyonu sağlanmıştır ve YeO:3::LuxCDE_1521/1(cIm^R) ve YeO:3::LuxCDE_1521/2(CIm^R) olarak isimlendirilmiştir. Doğru entegrasyon PCR ve sekans analizleri ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak; genetik olarak kararlı iki reporter suş inşa edilmiş ve lux_{poc} ve lux_{pop1} olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 3.10. Sükröz seleksiyonu

3.2.13. *İn-Vitro* Biyolüminesens Ölçümleri

3.2.13.1. Reporter suşlarının CFU ve biyolüminesens arasındaki korelasyonu ve büyüme profilleri

lux_{poc} ve lux_{pop1} reporter suşları, LB sıvı besiyerine (20 mg/μl kloramfenikol) oda sıcaklığında ve 37°C’de ve 15 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu lux_{poc} ve lux_{pop1} , 1/100 oranında (OD600 =0.03) seyreltilerek 37 °C ve oda sıcaklığında 150 rpm’de tekrar inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon süresince 2 saat aralıklar ile 200 μl her bir reporter suştan örnek alınmıştır. Alınan örneklerin lüminemeter (HIDEX plate CHAMELEON, 4.08; tek ölçüm/saniye) aracılığı ile biyolüminesens ölçümleri yapılmıştır. CFU miktarlarını belirlemek amacıyla suşların seri seyreltmeleri yapılarak LB agar besiyerine yayma plaka ile ekimleri yapılmış ve oda sıcaklığında ve 37 °C’de inkübasyona kaldırılmıştır. Ölçümler 2 saat aralıklar ile 18 saat boyunca gerçekleştirilmiştir.

3.2.13.2. Reporter suşlar ile *Y. enterocolitica* O:3 suşunun korelasyonu

Reporter suşlar ile yabanıl tip *Y. enterocolitica* O:3 arasındaki büyüme korelasyonunu belirlemek amacıyla büyüme eğrisi analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla lux_{poc} ve lux_{pop1} reporter suşları, LB sıvı besiyerine (20 mg/μl kloramfenikol) oda sıcaklığında ve 37°C’de ve 15 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu lux_{poc} ve lux_{pop1} , 1/100 oranında (OD600=0.2) seyreltilmiş ve her bir reporter suştan 200 μl alınarak honeycomp plakalarına 6 paralel olacak şekilde aktarılmıştır. Bioscreen C incubatör (Growth Curves Ab Ltd.) cihazı kullanılarak optik yoğunluk 600 nm’de 15 dakika aralıklar ile 24 saat boyunca okutulmuştur. Altı paralel optik yoğunluk okumalarının ortalamaları alınarak reporter suşlarının 24 saatlik büyüme grafikleri belirlenmiştir.

3.2.14. *In-Vivo* Biyoluminesens Ölçümü

3.2.14.1. Hayvan denemesi

Kırkdört adet 6-8 haftalık balb/c inbred fare türleri Kobay A.Ş'den satın alınmıştır. Ege Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2015-004 No'lu Etik Kurul onayı alınmış ve Fareler Ege Üniversitesi, İlaç Geliştirme & Farmokinetik Araştırma ve Uygulama Birimi (ARGEFAR), Faz Öncesi Araştırmalar Birimi'ne teslim edilmiştir. Fareler teslim alındıktan sonra bir hafta karantina odasında tutulmuştur. Deneye başlamadan önce 1 hafta farelerin ortama adaptasyonu sağlanmıştır (2 hafta). Farelere yapılan her uygulamada Avrupa Birliği Derneği Kuralları (86/609/EEC) referans alınmıştır. Fare denemeleri, hayvan deney sertifikası bulunan EÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim elemanı Araş. Gör. Melih Dağdeviren tarafından gerçekleştirilmiştir. Her kafese standart olarak 4-5 fare yerleştirilmiş, oda sıcaklığı ise 21 ± 1 °C olarak ayarlanmıştır; 12 saat gece/gündüz ışık rotasyonu takip edilmiştir. Farelere salin ve desferal enjeksiyonun olduğu gün dışında fare pelletleri ve çeşme suyu sürekli olarak sağlanmıştır. Enfeksiyon süresince ve enjeksiyona kadar her fare ($n=44$) günlük olarak tartılmıştır. Fare deneyi, fareler 6-8 haftalık ($18,65 \pm 0,20$ gr) olduğunda başlamış ve 44 fare rastgele olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır: i) Salin+Outer Core (SLN+OC, $n=8$), ii) Desferal+Outer Core (DSF+OC, $n=9$), iii) Salin+O-Antigen (SLN+O-Ant, $n=10$) ve iv) salin+O-Antigen (DSF+O-Ant, $n=10$) bakteriyel enjeksiyondan bir gün önce her fare grubuna desferal (10 mg desferal/ 100 µl, Novartis®) ve salin, karın boşluğuna (intra-periton) enjeksiyonu gerçekleştirilmiş ve farelerin yemleri, salin ve desferal enjeksiyonundan hemen sonra alınmıştır ve bakteriyel enjeksiyona kadar 24 saatlik zaman periyodunda farelerin aç kalması sağlanmıştır. lux_{poc} (*Y. enterocolitica* O:3_outer core), salin ve desferal grubu 200 µl hacimde ve 10^9 bakteri/ml derişiminde gavaj ile farelere verilmiştir. Aynı işlemler, lux_{pop1} (*Y. enterocolitica* O:3_O-antijen) reporter suşu için de bir gün sonra tekrarlanmıştır. Her grup fare, enjeksiyondan 1.saat, 1. gün ve 5. gün sonra olacak şekilde ketamin (50 mg/kg) – xylazine (10 mg/kg) ile bayıltılarak IVIS spektrum ile (Caliper Life Sciences, Hopkinton–MA) fotoğrafları çekilerek enfeksiyonun izlenmesi sağlanmıştır. 5. gün enfeksiyon sonrası IVIS spektrum ile görüntü alındıktan sonra her bir fare anestezi ile bayıltılarak servikal dislokasyon ile kesilmiştir. Her bir farenin karaciğerinin $\frac{1}{4}$ 'ü, peyer plakları, sindirim sistemi, mezenterik lenf nodu, ve dalak;

steril petri kaplarına aktararak IVIS spektrum ile fotoğrafları çekilmiştir ve her bir organ hassas terazi ile tartılmış, eşit hacimde gliserol ilavesi yapılarak bir gece -20°C’de bekletilmiştir. Ertesi gün, aynı gruptan orijinlenen aynı dokular birleştirilerek, buz üzerindeki 1x PBS (pH: 7.45) ile (1 gr doku/3 ml PBS) karıştırılmış ve potter-elvehjem homojenizatör ile homojenizasyonu sağlanmıştır. Her bir dokudan 500 µl alınarak PBS içerisinde 10^{-1} - 10^{-5} ’lik seri seyreltmeleri yapılmış ve reporter suşların seçilimi için kloraramfenikol antibiyotiği içeren CIN agar besiyerine inokülasyonları gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında 2-5 gün inkübasyona kaldırılmış ve sonuçlar cfu/g olarak hesaplanmıştır.

3.2.14.2. IVIS spektrum ölçümü

IVIS spektrum yüksek hassaslıkta ve *in vivo* koşullarda floresan veya biyoluminesens görüntüleme sağlamaktadır. 20 mikrona kadar çözünürlüğü bulunmaktadır ve 28 farklı (430-580) dalga boyu aralığında okuma ve fotoğraf çekme etkinliği bulunmaktadır (www.perkinelmer.com).

Lux_{poc} ve lux_{pop1} reporter suşlarının balb/c fare modellerinde neden olduğu enfeksiyon ve outer core, o-antijen promtorlarının ifadesi; 1. Saat, 1. Gün ve 5. Gün olarak IVIS spektrum ile izlenmiştir. IVIS denemesi boyunca görüntüler 13,5 mikronpiksellik ve termoelektronik olarak -120 °C’ye kadar soğutulan CCD kamera ile çekilmiştir. Enfeksiyon süresince IVIS spektrum ile çekilmiş olan fotoğrafların parametreleri; 5 dakika bağlanma süresi ile radiance ($p/sec/cm^2/sr$) birimi olarak ifade edilmiştir ve biyoluminesens renk skalası minimum ve maksimum değerler olarak ve gen ifadesine bağlı olarak belirlenmiştir.

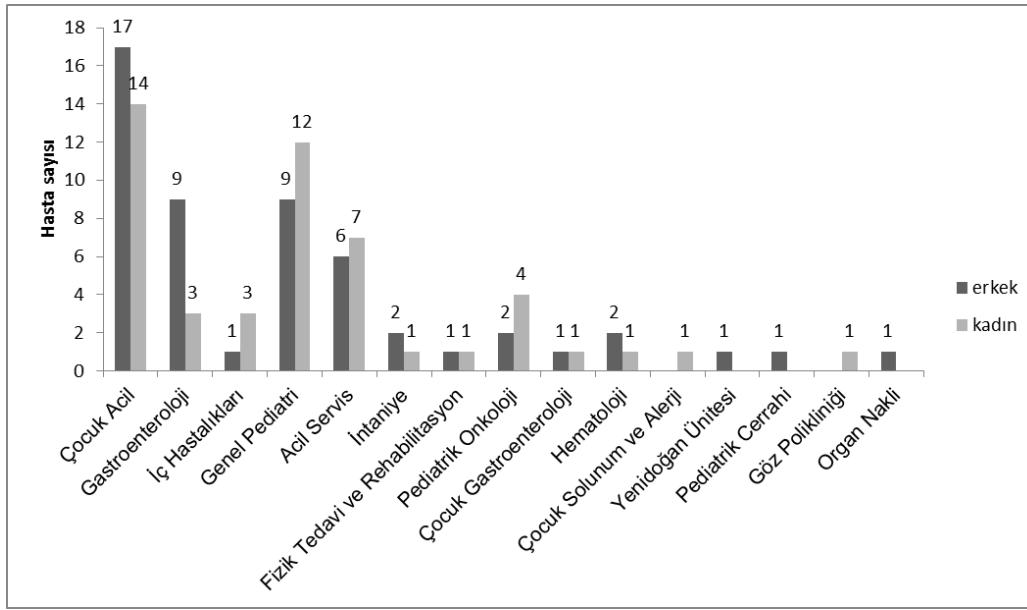


Şekil 3.11. IVIS Spektrum (www.perkinelmer.com)

4. BULGULAR

4.1. İnsan Dışkı Örneklerinden *Y. enterocolitica* İzolasyonu

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi'nde kayıtlı hasta örneklerinden; Ekim 2012-Ocak 2013 tarihleri arasında, 62 çocuk ve 40 yetişkin olmak üzere toplam olarak 102 diyareli hasta dışkısı *Y. enterocolitica* suşlarının izolasyonu amacı ile analize alınmıştır. Analize alınan hastaların departmana ve cinsiyete göre dağılımı **Şekil 4.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 1. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastane'sine kayıtlı diyare teşhisi koyulmuş 102 hastanın departmanı ve cinsiyetine göre dağılımı.

102 hasta örneğinden 132 adet “dana gözü” morfolojisinde olan şüpheli koloni ile ileri tanılama testleri yapılmıştır. 102 hasta dışkı örneğinden *Y. enterocolitica* suşu saptanamamıştır (**Çizelge 4.1**).

Çizelge 4.1. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi diyare hastalarına ait dışkı örneklerinden *Y. enterocolitica* izlasyonu ve fenotipik tanılama analizleri

Sıra No	İzolat No	İzolasyon kaynağı/ servis	Ön zenginleştirme	İzolasyon besiyeri	Lakto z +/-	Sitrat +/-	H ₂ S +/-	MALDI-TOF MS
1	12	Çocuk Acil Servis	PSMB, 25 °C, 2 gün	CIN	+	+	+	
2	9	Çocuk Acil Servis	PSB, 25 °C, 2 gün	CIN	+	+	+	
3	8	Çocuk Sağlığı kliniği	PSMB, 25 °C, 2 gün	CIN	+	+	+	
4	3-c	Çocuk Sağlığı kliniği	PSB, 25 °C, 2 gün	SSDC	+	-	+	
5	3-b	Çocuk Sağlığı kliniği	PSMB, 25 °C, 2 gün	SSDC	+	-	+	
6	5	Çocuk Acil Servis	PSB, 25 °C, 2 gün	SSDC	+	-	+	
7	2	Çocuk Acil Servis	PSB, 25 °C, 2 gün, KOH	SSDC	+	-	+	
8	7	Çocuk Acil Servis	PSMB, 25 °C, 2 gün, KOH	CIN	+	-	+	
9	10	Çocuk Acil Servis	PSB, 25 °C, 2 gün, KOH	CIN	+	-	+	
10	1-a	Genel pediatri	PSMB, 25 °C, 2 gün, KOH	CIN	+	-	+	
11	1-b	Genel pediatri	PSB, 25 °C, 2 gün, KOH	CIN	+	-	+	
12	1-c	Genel pediatri	PSMB, 25 °C, 2 gün, KOH	CIN	+	-	+	
13	4	Genel pediatri	PSMB, 25 °C, 2 gün	CIN	+	-	+	
14	11	Çocuk Acil Servis	PSB, 25 °C, 2 gün	SSDC	+	-	+	
15	6	Çocuk Acil Servis	PSB, 25 °C, 2 gün	SSDC	+	-	+	
16	24-a	Çocuk Acil Servis	PSMB, 25 °C, 2 gün	SSDC	+	+	+	
17	19	Çocuk Acil Servis	PSMB, 25 °C, 2 gün	SSDC	+	+	+	
18	15	Çocuk Acil Servis	PSB, 25 °C, 2 gün	CIN	+	-	+	
19	13	Çocuk Acil Servis	PSMB, 25 °C, 2 gün	CIN	+	+	+	
20	14	Çocuk Acil Servis	PSB, 25 °C, 2 gün	CIN	+	+	+	
21	19-a	Çocuk Acil Servis	PSMB, 25 °C, 2 gün	CIN	+	-	+	
22	18-a	Çocuk Acil Servis	PSB, 25 °C, 2 gün	SSDC	+	-	+	

Çizelge 4.1 (Devam)

23	17	Çocuk Acil Servis	PSB, 25 °C, 2 gün	CIN	+	+	+
24	21	Çocuk Acil Servis	PSMB, 25 °C, 2 gün	CIN	+	+	+
25	20	Çocuk Acil Servis	PSMB, 25 °C, 2 gün	CIN	+	+	+
26	23	Gastroenteroloji	PSB, 25 °C, 2 gün	CIN	+	-	+
27	16	Çocuk Acil Servis	PBS/PSM B +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+
28	14	Çocuk Acil Servis	PBS/PSM B +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+
29	17	Çocuk Acil Servis	PSMB + ITC +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+
30	11	Çocuk Acil Servis	PSB +ITC+4 °C, 14 gün	CIN	-	-	+
31	8	Çocuk Acil Servis	PSMB + ITC+4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+
32	5	Çocuk Acil Servis	PSMB + ITC+4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+
33	6	Çocuk Acil Servis	PSB +ITC+4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+
34	7	Çocuk Acil Servis	PSMB + ITC+4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-
35	2	Gastroenteroloji	PSB +ITC +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	+
36	3	Gastroenteroloji	PSB +ITC+4 °C, 14 gün	CIN	-	+	+
37	4	Acil Servis	PSMB + ITC +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	+
38	9	Acil Servis	PSB +ITC +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	-

*Serratia
liquifaciens*

Çizelge 4.1 (Devam)

39	1	Fizik Tedavi Rehabilitasyon	PSMB + ITC +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+
40	12	Fizik Tedavi Rehabilitasyon	PSMB + ITC +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+
41	33-a	Çocuk Acil Servis	PSB +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+
42	33-b	Çocuk Acil Servis	PSB +ITC +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+
43	33-c	Çocuk Acil Servis	PSMB+IT C +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+
44	31-a	Çocuk Acil Servis	PSB+ITC +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-
45	31-b	Çocuk Acil Servis	PSMB+IT C +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-
46	31-c	Çocuk Acil Servis	PSB+ITC +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+
47	34-a	Çocuk Sağlığı kliniği	PSMB+IT C +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+
48	34-b	Çocuk Sağlığı kliniği	PSB+ITC +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+
49	34-c	Çocuk Sağlığı kliniği	PSMB+IT C +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+
50	57-a	Çocuk Sağlığı kliniği	PSB+ITC +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	+
51	32-a	Çocuk Sağlığı kliniği	PSMB+IT C +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+
52	32-b	Çocuk Sağlığı kliniği	PSB+ITC +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+
53	32-c	Çocuk Sağlığı kliniği	PSMB+IT C +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+
54	52-a	Acil Servis	PSB+ITC +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	+
55	53-a	Acil Servis	PSMB+IT C +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	+
56	54	Hematoloji	PSB+ITC +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+

Çizelge 4.1. (Devam)

57	55	Hematoloji	PSMB+IT C +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-	
58	60	Çocuk Acil Servis	PSB+ITC +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-	
59	59	Çocuk Acil Servis	PSB+ITC +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-	
60	62	İntaniye polikliniği	PSMB+IT C +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-	
61	61	İntaniye polikliniği	PSMB+IT C +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+	
62	63-a	Çocuk Acil Servis	PSMB+IT C +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	+	
63	64-a	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	+	
64	66-a	Genel pediatri	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	+	
65	65-a	Genel pediatri	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	+	
66	71-b	Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	+	
67	69	Çocuk Onkoloji	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+	
68	70	Çocuk Onkoloji	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+	
69	67-a	Hematoloji	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	+	+	
70	68-a	Hematoloji	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	+	+	
71	D- 48psmb	Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	-	<i>Serratia liqifaciens</i>

Çizelge 4.1. (Devam)

72	D-50 psb	Gastroenteroloji	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	-	<i>Serratia odorifera</i>
73	D-50psmb	Gastroenteroloji	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+	
74	D-52	Genel pediatri	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+	
75	D-53	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	-	
76	D-54-1	İntaniye polikliniği	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	-	
77	D-54-2	İntaniye polikliniği	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	+	+	
78	D-55-1	Hematoloji	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	+	+	
79	D-55-2	Hematoloji	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	+	+	
80	D-59 psmb	Genel pediatri	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	+	+	
81	D-61 PSMB	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+	
82	D-61 - 1-PSB	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+	
83	D-61-2- PSB	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+	
84	D-63 PSB	Fizik Tedavi Rehabilitasyon	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+	

Çizelge 4.1. (Devam)

85	D-63-1psmb	Fizik Tedavi Rehabilitasyon	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	-
86	D-63-2psmb	Fizik Tedavi Rehabilitasyon	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	-
87	D-63-3psmb	Fizik Tedavi Rehabilitasyon	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+
88	D-65 PSB	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+
89	D-65 PSMB	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+
90	D-66 PSB	Çocuk solunum Alerji	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+
91	D-66-1-psb	Çocuk solunum Alerji	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	-
92	D-66-2 PSMB	Çocuk solunum Alerji	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	-
93	D-70 PSMB	Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	-
94	PSMB H1	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	-
95	PSMB H2	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	-
96	PSMB H3	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-
97	PSMB H4	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+

Çizelge 4.1. (Devam)

98	PSB J1	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-
99	PSB J2	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-
100	PSB J3	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-
101	PSMB K1	Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-
102	PSMB K2	Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-
103	PSMB K3	Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-
104	PSB F1	Genel pediatri	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-
105	PSB F2	Genel pediatri	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-
106	PSB F3	Genel pediatri	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-
107	PSB F4	Genel pediatri	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-
108	PSMB L1	Genel pediatri	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-
109	PSMB L2	Genel pediatri	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	+
110	PSMB B1	Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	+

Çizelge 4.1. (Devam)

111	PSMB B2	Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	-	<i>Serratia liquifaciens</i>
112	PSMB B3	Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	-	<i>Serratia liquifaciens</i>
113	PSMB B4	Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	+	
114	PSMB B5	Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	+	
115	PSB C1	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
116	PSB e1	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
117	PSB e2	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
118	PSMB G1	Genel pediatri	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+	
119	PSMB G2	Genel pediatri	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	-	+	
120	PSB D1	İç Hastalıkları	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	-	<i>Morganella morganii</i>
121	PSB H1	Gastroenteroloj i	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+	
122	PSB H2	Gastroenteroloj i	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	+	
123	PSB H3	Gastroenteroloj i	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-	

Çizelge 4.1 (Devam)

124	PSB I-1	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	+	-	
125	PSB I-2	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	+	-	
126	PSB I-3	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	-	<i>Serratia liquifaciens</i>
127	PSB I-4	Çocuk Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	-	-	-	<i>Serratia liquifaciens</i>
128	PSB M-1	Genel pediatri	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-	
129	PSB A1	Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-	
130	PSB A2	Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-	
131	PSB A3	Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-	
132	PSB A4	Acil Servis	PSMB/PS B,ITC , +4 °C, 14 gün	CIN	+	+	-	

4.2. Domuz Dışkı ve Domuz Gübre Örneklerinden *Y. enterocolitica* İzolasyonu

İzmir il'i, Menemen İlçesi Kesik köyü sınırları içerisinde bulunan domuz çiftliğinden; 2 adet domuz dışkısı ve 2 adet domuz gübresinden *Y. enterocolitica* suşu araştırılmıştır. Toplam olarak 4 adet domuz dışkısı ve gübresinden 69 adet şüpheli koloni tanılama amacı ile analize alınmış (Çizelge 4. 2.) ve 5 adet (%7, 24) *Y. enterocolitica* suşu saptanmıştır.

Çizelge 4.2. Domuz dışkı ve domuz gübre örneklerinden *Y. enterocolitica* izolasyonu ve fenotipik tanılama analizleri.

Sıra No	İzolat No	Materyal	Ön zenginleştirme	İzolasyon besiyeri	Laktoz +/-	Sitrat +/-	H ₂ S +/-	MALDI-TOF MS
133	A1-1-1	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
134	A1-1-2	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
135	A1-1-3	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
136	A1-1-4	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
137	A1-2-1	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
138	A1-2-2	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
139	A1-2-3	dışkı	direk inokülasyon	CIN	-	+	-	-
140	A1-3-1	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
141	A1-3-2	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
142	A1-3-3	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
143	A1-3-4	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
144	A1-3-5	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
145	A1-4-1	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
146	A1-4-2	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
147	A1-5-1	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
	A1-5-2				-	-	-	<i>Aeromonas Hydrophilia/ caviae</i>
148		dışkı	direk inokülasyon	CIN				
149	A1-5-3	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
	A1-6-1				-	-	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
150		dışkı	direk inokülasyon	CIN				
151	A1-6-2	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
152	A2-1-1	dışkı	direk inokülasyon	CIN	-	+	-	-
	A2-2-1				-	-	-	<i>Erwinia rhapontici</i>
153		dışkı	direk inokülasyon	CIN				
	A2-2-2				-	-	-	<i>Phobacterium damsela</i>
154		dışkı	direk inokülasyon	CIN				
155	A2-2-3	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-

Çizelge 4.2 (Devam)

156	A2-3-1	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
	A2-4-1				-	-	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
157		dışkı	direk inokülasyon	CIN				
158	A2-5-1	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
159	A2-6-1	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
160	A2-6-2	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
161	A2-6-3	dışkı	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
162	A3-1-1	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
163	A3-1-2	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
164	A3-1-3	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
165	A3-2-1	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
166	A3-3-1	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
167	A3-3-2	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
168	A3-4-1	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
169	A3-4-2	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
170	A3-4-3	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
	A3-5-1				+	+	-	-
171		Gübre	direk inokülasyon	CIN				
172	A3-5-2	Gübre	direk inokülasyon	CIN	-	+	-	-
173	A3-5-3	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
174	A3-5-4	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
175	A3-6-1	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
176	A4-1-1	Gübre	direk inokülasyon	CIN	-	+	-	-
177	A4-1-2	Gübre	direk inokülasyon	CIN	-	+	-	-
178	A4-2-1	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
179	A4-2-2	Gübre	direk inokülasyon	CIN	-	+	-	-
180	A4-2-3	Gübre	direk inokülasyon	CIN	-	+	-	-
181	A4-2-4	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
182	A4-3-1	Gübre	direk inokülasyon	CIN	-	+	-	-

Çizelge 4.2 (Devam)

183	A4-3-2	Gübre	direk inokülasyon	CIN	-	+	-	-
184	A4-3-3	Gübre	direk inokülasyon	CIN	-	+	-	-
185	A4-3-4	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
186	A4-3-5	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
187	A4-4-1	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
188	A4-4-2	Gübre	direk inokülasyon	CIN	+	+	-	-
189	A4-5-1	Gübre	direk inokülasyon	CIN	-	+	-	-
190	A1-1	Gübre	direk inokülasyon	CIN	-	-	-	<i>Y.enterocoliti ca</i>
191	A2-1	Gübre	direk inokülasyon	CIN	-	-	-	<i>Y.enterocoliti ca</i>
192	A2-2	Gübre	direk inokülasyon	CIN	-	-	-	<i>Y.enterocoliti ca</i>
193	A4- PSB/ A4-19	Gübre	PSM,PSMB, ITC +4°C, 3 hafta	CIN	+	+	+	-
194	A4- PSB /A4-20	Gübre	PSM,PSMB, ITC +4°C, 3 hafta	CIN	+	+	+	-
195	A4- PSMB /A4-21	Çamur	PSM,PSMB, ITC +4°C, 3 hafta	CIN	+	+	-	-
196	A2- PSMB /A2-22	dışkı	PSM,PSMB, ITC +4°C, 3 hafta	CIN	-	-	-	<i>Y.enterocoliti ca</i>
197	A1- PSB/A 1-23	dışkı	PSM,PSMB, ITC +4°C, 3 hafta	CIN	+	+	-	-
198	A1- PSB/A 1-24	dışkı	PSM,PSMB, ITC +4°C, 3 hafta	CIN	+	+	-	-
199	A2- PSB/ A2-25	dışkı	PSM,PSMB, ITC +4°C, 3 hafta	CIN	-	-	-	<i>Y.enterocoliti ca</i>
200	A2- PSB/ A2-26	dışkı	PSM,PSMB, ITC +4°C, 3 hafta	CIN	-	-	-	-
201	A2- PSB/A 2-27	dışkı	PSM,PSMB, ITC +4°C, 3 hafta	CIN	+	+	-	-

4.3. Su Kaynaklarından *Y. enterocolitica* İzolasyonu ve Tanılanması

Körfez, kanal, belediye havuz suyu ve kuyu suyu (n=12), 2012 Ağustos-Eylül dönemi, İzmir'in Kuzey ve Güney bölgelerinden *Y. enterocolitica* suşları araştırılmıştır. Toplam olarak 12 su örneğinden 15 *Yersinia* benzeri şüpheli koloni daha ileri fenotipik tanılama analizine dahil edilmiştir (Çizelge 4.3). 12 adet su örneğinden *Y. enterocolitica* saptanamamıştır.

Çizelge 4.3. Su kaynaklarından *Y. enterocolitica* izolasyonu ve fenotipik tanılama analizleri

Sıra No	İzolat No	İzolasyon kaynağı/ servis	Materiyal	Ön zenginleştirme	İzolasyon besiyeri	Lak toz +/-	Sitrat +/-	H ₂ S +/-	MALDI-TOF MS
202	S-4-f	Bostanlı Kanal-2	körfez suyu	PSB, 25 °C, 2 gün	CIN	+	+	+	
203	S-4-e	Bostanlı Kanal-2	körfez suyu	PSB, 25 °C, 2 gün	CIN	+	+	+	
204	S-4-d	Bostanlı Kanal-2	körfez suyu	YER, +4 °C 9 gün	CIN	+	+	+	
205	S-4-c	Bostanlı Kanal-2	körfez suyu	YER, +4 °C 9 gün	CIN	+	+	+	
206	S-4-b	Bostanlı-Kanal-2	kanal suyu	PSMB, +4 °C 7 gün	CIN	-	-	-	<i>Vibrio alginolyticus</i>
207	S-4-a	Bostanlı Kanal-2	Kanal suyu	TSB, 22 °C 1gün	CIN	-	-	-	<i>Aeromonas hydrophila</i>
208	S-2-f	Bayraklı Körfez	körfez suyu	TSB, 22 °C 1 gün	CIN	+	-	+	
209	S-2-e	Bayraklı Körfez	körfez suyu	YER, +4 °C 9 gün	CIN	+	-	+	
210	S-2-d	Bayraklı Körfez	körfez suyu	PSB, 25 °C 2 gün	CIN	-	-	-	<i>Vibrio alginolyticus</i>
211	S-2-c	Bayraklı Körfez	körfez suyu	TSB, 22 °C 1 gün	CIN	+	+	-	
212	S-2-b	Bayraklı Körfez	körfez suyu	PSB, 25 °C 2 gün	CIN	+	+	-	
213	S-2-a	Bayraklı Körfez	körfez suyu	YER, +4 °C 9 gün	CIN	-	-	-	<i>Aeromonas hydrophila</i>
214	S-12-a	Konak,Belediye Havuz	Havuz suyu	YER, +4 °C 9 gün	CIN	+	+	-	
215	S-12-b	Konak,Belediye Havuz	Havuz suyu	PSMB, +4 °C 7 gün	CIN	+	+	-	
216	S-13	Akhisar, Manisa	Kuyu Sondaj	TSB, 22 °C 1 gün	CIN	+	+	+	

4.4. Atık Su Arıtma Tesislerinden *Y. enterocolitica* İzolasyonu

İzmir il'i çevresinde bulunan ve İzmir Büyükşehir Belediye'sinden alınan resmi izin ile 3 farklı atık su arıtma tesisinden (Aliğa, Menemen ve Çiğli) Şubat 2013 ayı içerisinde, atık su örnekleri toplanmıştır. Her bir tesisten 2'şer su örneği alınarak toplam olarak 6 adet su numunesi alınmıştır. Toplamda 43 şüpheli koloni fenotipik tanılama testlerine tabi tutulmuştur ve toplam 4 adet (%9,3) *Y. enterocolitica* suşu tanılanmıştır (**Çizelge 4.4**).

Çizelge 4.4. Atık su arıtma tesislerinden izole edilen *Y. enterocolitica* suşları ve fenotipik ve tanılanmaları.

Sıra No	İzolat No	İzolasyon kaynağı	Materiyal	Ön zenginleştirme	İzolasyon besiyeri	Laktoz +/-	Sitrat +/-	H ₂ S +/-	MALDI-TOF MS
217	AS-7-1	Menemen-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	+	-	-
218	AS-7-2	menemen-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	-	-
219	AS-7-3	menemen-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	+	+	+	-
220	AS-7-4	menemen-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	+	+	+	-
221	AS-7-5	menemen-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	+	+	-
222	AS-7-6	menemen-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	+	+	+	-
223	AS-1-8	Çiğli-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	+	-
224	AS-1-9	Çiğli-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	-	-
225	AS-1-10	Çiğli-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	+	+	-	-
226	AS-10-11	Aliğa-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	-	-

Çizelge 4.4 (Devam)

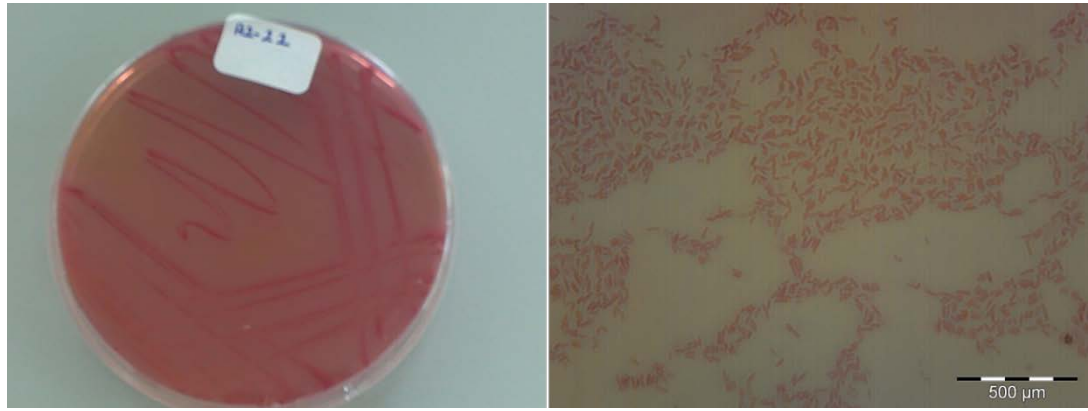
227	AS-10-12	Aliğa-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	+	+	-
228	AS-10-13	Aliğa-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	-	-
229	AS-8-14	Menemen-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	+	-	-
230	AS-8-15	Menemen-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	-	<i>Y.enterocolitica</i>
231	AS-4-16	Çiğli-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	+	+	-	-
232	AS-2-17	Çiğli-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	-	-
233	AS-2-18	Çiğli-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	+	+	-	-
234	AS-5-28	Menemen-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	+	+	-	-
235	AS-5-29	Menemen-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	+	+	-	-
236	AS-5-30	Menemen-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	+	+	-	-
237	AS-5-31	Menemen-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	-	-
238	AS-5-32	Menemen-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	+	+	-	-
239	AS-5-33	Menemen-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	+	-
240	AS-12-34	Aliğa-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	-	-
241	AS-12-35	Aliğa-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	-	<i>Y.enterocolitica</i>
242	AS-12-36	Aliğa-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	+	+	-	-
243	AS-6-37	Menemen-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	+	-	-
244	AS-7-38	Menemen-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	+	-	-

Çizelge 4.4 (Devam)

245	AS-6-39	Menemen-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	+	-	-
246	AS-6-40	Menemen-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	+	+	-	-
247	AS-11-41	Aliaga-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	+	+	-	-
248	AS-11-42	Aliaga-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	+	-	-
249	AS-11-43	Aliaga-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	+	-	-
250	AS-11-44	Aliaga-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	+	+	-	-
251	AS-11-45	Aliaga-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	-	<i>Y.enterocolitica</i>
252	AS-11-46	Aliaga-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	+	
253	AS-11-47	Aliaga-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	-	<i>Y.enterocolitica</i>
254	AS-11-48	Aliaga-2	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	+	-
255	AS-3-49	Çiğli-3	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	-	-
256	AS-3-50	Çiğli-3	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	+	-	-
257	AS-3-51	Çiğli-3	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	-	-
258	AS-9-52	Aliaga-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	-	-	-	-
259	AS-9-53	Aliaga-1	Atık su	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm	CIN	+	+	-	-

4.5. *Y.enterocolitica* Suşlarının Fenotipik ve Genotipik Tanılanması

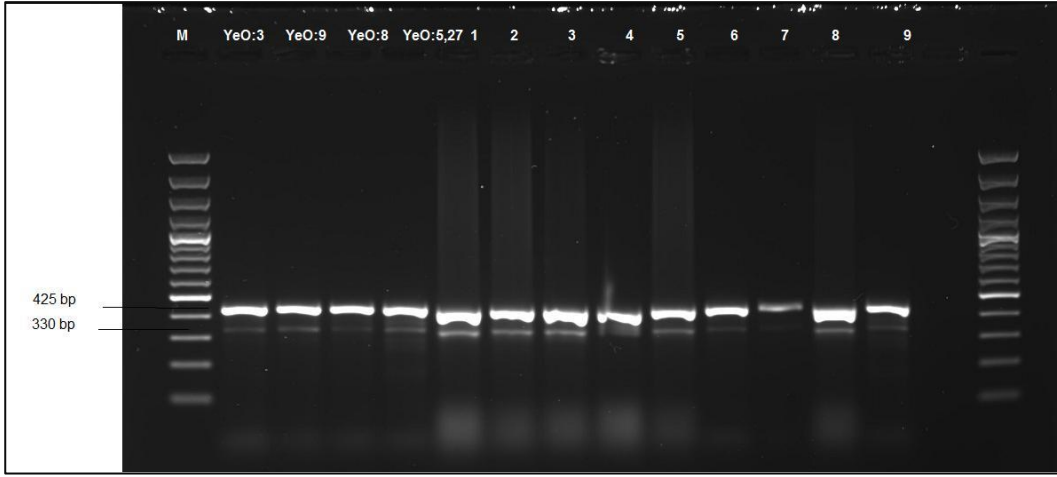
Y. enterocolitica suşlarının fenotipik tanılama analizleri kapsamında; sitrat, Gram boyama (Şekil 4.2.) ve laktoz fermentasyonu reaksiyonu negatif olan ve ayrıca Kligler demir testi sonucu H₂S üretimi olmaksızın alkali reaksiyon gösteren koloniler olası *Y. enterocolitica* suşları olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca şüpheli suşların MALDI-TOF[®]MS cihazı ile fenotipik tanılamaları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4).



Şekil 4.2. A2-22 No'lu *Y. enterocolitica* izolatının CIN agar besiyerideki saf kültür morfolojisi ve Gram reaksiyonu (500µm).

Y. enterocolitica izolatlarının genotipik tanılama analizleri ise *ail* ve 16S rRNA gen bölgelerinin amplifikasyonunu sağlayan dubleks PCR analizi ile gerçekleştirilmiştir. Sırasıyla 330 ve 425 bp'de olan *ail* ve 16S rRNA PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jel kullanılarak görüntülenmiştir (Şekil 4.3).

Fenotipik ve genotipik tanılama analizleri sonucu 259 şüpheli koloniden toplam olarak 9 (%3,48) adet *Y. enterocolitica* suşu saptanmıştır. Dokuz adet *Y. enterocolitica* suşunun 5 (% 55,55) tanesi domuz çiftliğinden; 4 (% 44,44) tanesi ise atık arıtma tesislerinden izole edilmiştir (Çizelge 4.5.).



Şekil 4.3. *Y. enterocolitica* izolatlarının *ail* (bağlanma ve invazyon lokusu) ve 16S rRNA bölgelerinin dubleks PCR ile amplifikasyonu **425 bp:ail; 330 bp:16S rRNA** **M:** 100 bp marker (Fermentas). (%1,2 Agaroz jel).

Çizelge 4.5. Fenotipik ve genotipik yöntemler ile tanılanan *Y. enterocolitica* suşlarının izolasyon kaynağı, örnekleme zamanı ve materyal sayısı ve izolasyon yüzdeleri.

İzolasyon kaynağı	Örnekleme zamanı	Pozitif <i>Y. enterocolitica</i> suşları (%)			
		Material sayısı	Şüpheli koloni sayısı	MALDI-TOF [®] MS	PCR (<i>ail</i> / 16S rRNA)
Diyare /dışkı	Ekim 2012 - Ocak 2013	102	132	-	-
Domuz dışkısı ve gübresi	Şubat 2013	4	69	5 (7,24)	5 (7,24)
Körfez, kanal ve havuz suyu	Ağustos-Eylül 2012	12	15	-	-
Atık su	Şubat 2013	6	43	4 (9,3)	4(9,3)
Toplam		124	259	9 (% 3,48)	9 (% 3,48)

4.6. *Y. enterocolitica* Suşlarının Biyotiplendirilmesi ve Fenotipik Patojenite Testleri

MALDI-TOF[®]MS ile fenotipik tanılamaları gerçekleştirilen *Y. enterocolitica* suşlarının biyotiplendirme analizleri ve fenotipik patojenite testleri yapılmıştır. Biyotiplendirme testleri çeşitli biyokimyasal testleri kapsamaktadır: lipaz enzim aktivitesi, eskulin hidrolizi, salisin reaksiyonu, indol testi, D-ksiloz testi, trehaloz

reaksiyonu, pyrazinamidaz, voges-proskauer ve DNase testleri referans alınarak *Y. enterocolitica* suşları; 2 farklı biyotipe ayrılmıştır ve bu gruplar 4 ve 2'dir.

Fenotipik patojenite testleri olarak; MR-VP sıvı besiyeri içerisinde otoagglütinasyon testi ve Kongo kırmızısına bağlanma testleri gerçekleştirilmiştir böylece biyotipi 2 ve 4 grup olarak belirlenen izolatların virülens plazmidi taşıdıkları fenotipik olarak doğrulanmıştır. *YadA* geni plazmit aracılı kodlanan virülens belirtecidir. İzole edilmiş olan *Y. enterocolitica* suşlarının biyotip ve virülens genlerinin dağılımı (Çizelge 4. 6.)'da belirtilmiştir.

4.7. *Y. enterocolitica* Suşlarının Serotiplendirilmesi

Fenotipik ve genotipik tanılamaları yapılmış olan patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının serotiplendirilmesi Skurnik laboratuvarında bulunan *Yersinia* suşlarının serotiplerine spesifik bakteriyofajlar ile fenotipik olarak serotiplendirilmiştir. Bakteriyofaj serotiplendirme analizine göre *Y. enterocolitica* suşlarında 3 farklı serotip belirlenmiştir; O:3, O:9 ve O: 5,27 (Şekil 4.4.)



Şekil 4.4. A1-1 ve AS-11-47 No'lu *Y. enterocolitica* izolatlarının, *Y. enterocolitica* suşlarına spesifik fajlar ile fenotipik olarak serotiplendirilmesi.

4.8. *Y. enterocolitica* Suşlarının Genotipik Olarak Serotiplendirilmesi

Serotipleri belirlenen *Y. enterocolitica* suşlarının fenotipik sonuçlara dayanılarak; O-antijenine spesifik primerler kullanılarak standart PCR analizleri ile genotipik olarak da serotipleri belirlenmiş ve doğrulanmıştır (Çizelge 3.3).

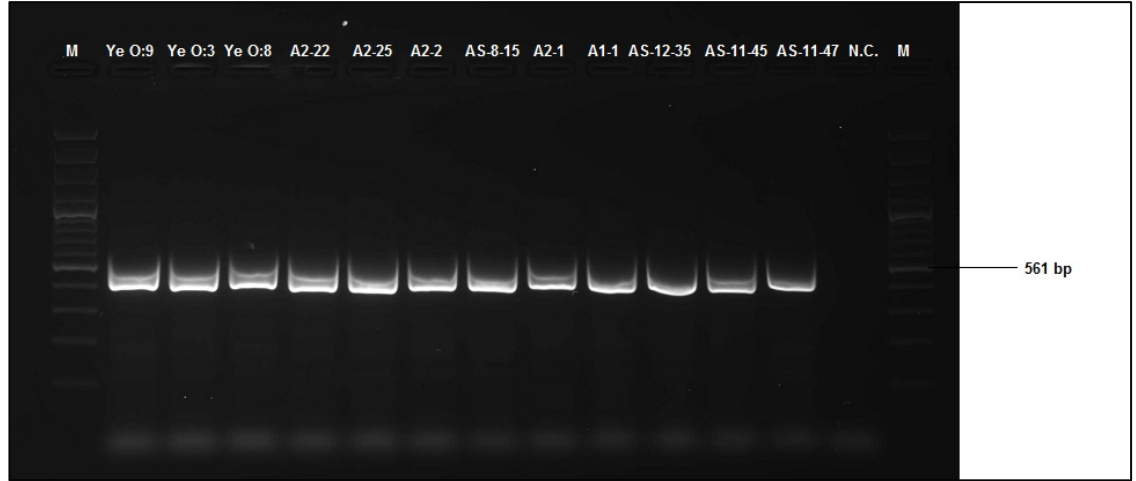
Standart PCR analiz sonucuna göre; *Y. enterocolitica* O:9/ O-antijen operonu 272 bp, *Y. enterocolitica* O:3/ O-antijen operonundan 840 bp ve *Y. enterocolitica* O:5,27/O-antijen operonundan ise 688 bp çoğaltılmıştır. Agaroz jel elektroforezi **şekil 4.5'** de gösterilmektedir.



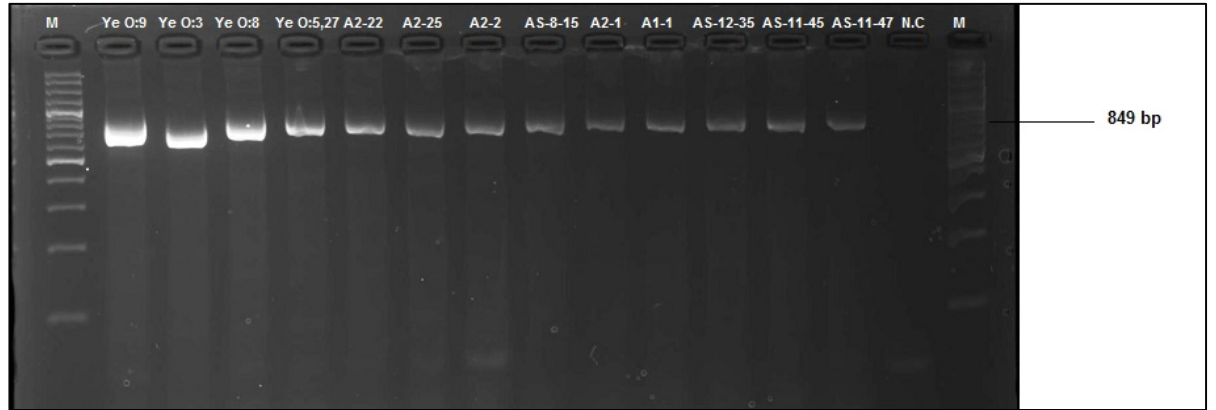
Şekil 4.5. *Y. enterocolitica* suşlarının genotipik olarak serotiplendirilmesi. **A2-1:***Y. enterocolitica* 2/O:5,27, **A2-2:** *Y. enterocolitica* 2/O:9, **AS-8-15:** *Y. enterocolitica* 2/O: 9, **A2-22:** *Y. enterocolitica* 2/O:9, **A2-25:** *Y. enterocolitica* 2/O: 9, **AS-11-45:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **A1-1:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **AS-12-35:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **AS-11-47:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **N.C.:** Negatif kontrol (%1,5 agaroz jel).

4.9. Kromozom ve Plazmit Aracılı Virülens Genlerinin Saptanması

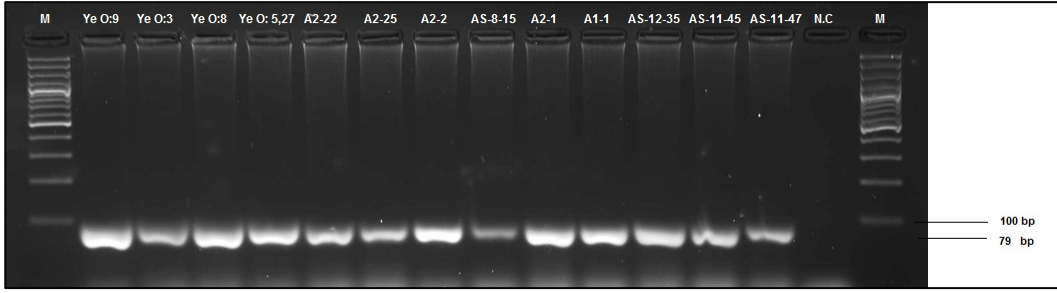
Kromozom ve plazmit aracılı virülens genleri olan *ail* (425 bp) (**şekil 4.2**), *ystA* (79 bp), *ystB* (146 bp), *yadA* (849 bp) ve *virF/lcrF* (561 bp), spesifik primerler kullanılarak çoğaltılmışlardır. PCR amplifikasyonu sonrası; pcr ürünleri %1,5'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir. (**Şekil 4.6.**), (**Şekil 4.7**) ve (**Şekil 4.8**). Pozitif kontrol suşu olarak; *Y. enterocolitica* O:9, *Y. enterocolitica* O:3, *Y. enterocolitica* O:8 ve *Y. enterocolitica* O: 5,27 kullanılmıştır (**Çizelge 4.6.**)



Şekil 4.6. *Y. enterocolitica* transkripsiyonel aktivatör; Yop regülönü: *virF/lcrF* (561 bp). **M:** Marker, **pozitif kontrol:** *Y. enterocolitica* O:9, *Y. enterocolitica* O:3, *Y. enterocolitica* O:8. **A2-1:** *Y. enterocolitica* 2/O:5,27, **A2-2:** *Y. enterocolitica* 2/O:9, **AS-8-15:** *Y. enterocolitica* 2/O: 9, **A2-22:** *Y. enterocolitica* 2/O:9, **A2-25:** *Y. enterocolitica* 2/O: 9, **AS-11-45:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **A1-1:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **AS-12-35:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **AS-11-47:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **N.C:** Negatif kontrol (%1,5 agaroz jel).



Şekil 4.7. *Y. enterocolitica* izolatlarında plazmit aracılı kodlanan *yadA* geni (861 bp). **M:** Marker, **pozitif kontrol:** *Y. enterocolitica* O:9, *Y. enterocolitica* O:3, *Y. enterocolitica* O:8 ve *Y. enterocolitica* O: 5,27. **A2-1:** *Y. enterocolitica* 2/O:5,27, **A2-2:** *Y. enterocolitica* 2/O:9, **AS-8-15:** *Y. enterocolitica* 2/O: 9, **A2-22:** *Y. enterocolitica* 2/O:9, **A2-25:** *Y. enterocolitica* 2/O: 9, **AS-11-45:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **A1-1:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **AS-12-35:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **AS-11-47:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **N.C:** Negatif kontrol (%1,5 agaroz jel).



Şekil 4.8. *Y. enterocolitica* sıcaklık stabil *ystA* enterotoksin geni (79 bp) **M:** Marker, **pozitif kontrol:** *Y. enterocolitica* O:9, *Y. enterocolitica* O:3, *Y. enterocolitica* O:8 ve *Y. enterocolitica* O: 5,27. **A2-1:** *Y. enterocolitica* 2/O:5,27, **A2-2:** *Y. enterocolitica* 2/O:9, **AS-8-15:** *Y. enterocolitica* 2/O: 9, **A2-22:** *Y. enterocolitica* 2/O:9, **A2-25:** *Y. enterocolitica* 2/O: 9, **AS-11-45:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **A1-1:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **AS-12-35:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **AS-11-47:** *Y. enterocolitica* 4/O:3, **N.C:** Negatif kontrol (%1,5 agaroz jel).

İzolasyon, fenotipik ve genotipik tanılama ve virülens belirteçlerinin saptanması sonucunda; 259 şüpheli *Yersinia* benzeri koloniden 9 adet patojenik *Y. enterocolitica* suşu saptanabilmiştir. Patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının karakteristik özellikleri **Çizelge 4.6'** da özetlenmiştir.

Çizelge 4. 6. *Y. enterocolitica* suşlarının biyoserotipleri, izolasyon kaynakları, izolasyon metotları ve virülens belirteçler.

İzolasyon kodu	izolasyon kaynağı	izolasyon metodu	Biyosero tip	Virulens geni
A2-2	Domuz gübresi/Menemen	Direkt inokülasyon, CIN	2/O:9	<i>ail, yadA, virF, ystA</i>
A2-1	Domuz gübresi/Menemen	Direkt inokülasyon, CIN	2/O:5,27	<i>ail, yadA, virF, ystA</i>
A2-22	Domuz dışkı/Menemen	PSMB, ITC +4C°, 3 hafta, CIN	2/O:9	<i>ail, yadA, virF, ystA</i>
A2-25	Domuz dışkı/Menemen	PSB, ITC +4 C°, 3 hafta, CIN	2/O:9	<i>ail, yadA, virF, ystA</i>
A1-1	Domuz gübresi/Menemen	Direkt inokülasyon, CIN	4/O:3	<i>ail, yadA, virF, ystA</i>
AS-8-15	Atık su/Menemen	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm, CIN	2/O:9	<i>ail, yadA, virF, ystA</i>
AS-11-45	Atık su/Aliağa	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm, CIN	4/O:3	<i>ail, yadA, virF, ystA</i>
AS-12-35	Atık su/Aliağa	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm, CIN	4/O:3	<i>ail, yadA, virF, ystA</i>
AS-11-47	Atık su/Aliağa	mTSB, 24 sa, 12°C, 100 rpm, CIN	4/O:3	<i>ail, yadA, virF, ystA</i>

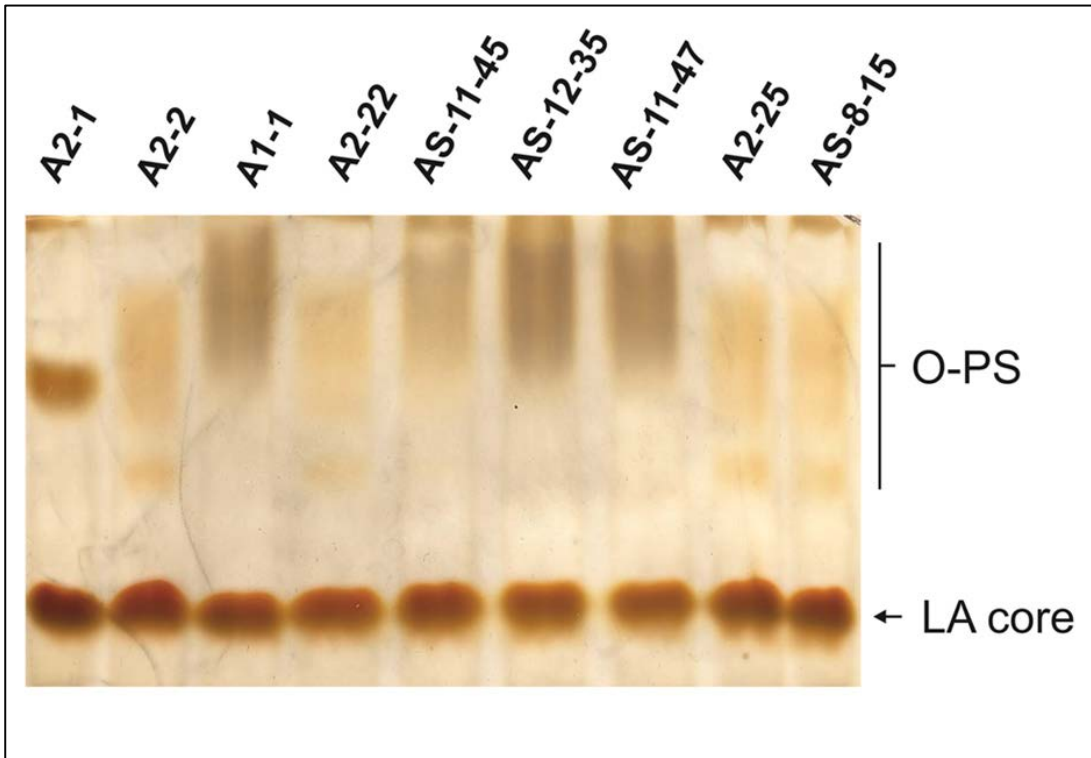
Ayrıca, *Y. enterocolitica* suşlarının izolasyonu ve tanılanması sırasında; Gram reaksiyonu ve laktoz fermentasyonu reaksiyonu negatif olan ve ayrıca Kligler demir testi sonucu H₂S üretimi göstermeyen *Yersinia*-benzeri suşları MALDI-TOF[®]MS ile tanılanmıştır (**Çizelge 4.7**).

Çizelge 4.7. Biyokimyasal testler ve MALDI-TOF[®]MS ile tanılanan *Yersinia*-benzeri suşların izolasyon materyali ve kaynağına göre dağılımları

İzolasyon kodu	İzolasyon materyali ve kaynağı	Genus /Tür
9	dışkı/Diyare /Acil servis	<i>Serratia liqifaciens</i>
D48 PSMB	dışkı/Diyare /Acil servis	<i>Serratia liqifaciens</i>
D50 PSB	dışkı/Diyare /Gastroenteroloji	<i>Serratia odorifera</i>
PSMB B2	dışkı/Diyare /Acil servis	<i>Serratia liqifaciens</i>
PSMB B3	dışkı/Diyare /Acil servis	<i>Serratia liqifaciens</i>
PSB C1	dışkı/Diyare / Çocuk Acil servis	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PSB e1	dışkı/Diyare /Çocuk Acil servis	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PSB e2	dışkı/Diyare /Çocuk Acil servis	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PSB D1	dışkı/Diyare /İntaniye	<i>Morganella morganii</i>
PSB I-3	dışkı/Diyare /Çocuk Acil servis	<i>Serratia liqifaciens</i>
PSB I-4	dışkı/Diyare /Çocuk Acil servis	<i>Serratia liqifaciens</i>
S-4-b	Kanal suyu/Bostanlı	<i>Vibrio alginolyticus</i>
S-4-a	dışkı/Diyare /Çocuk Acil servis	<i>Aeromonas hydrophila</i>
S-2-d	Körfez suyu/ Bayraklı	<i>Vibrio alginolyticus</i>
S-2-a	Körfez suyu/ Bayraklı	<i>Aeromonas hydrophila</i>
A1-5-2	Domuz dışkısı	<i>Aeromonas hydrophila/ caviae</i>
A1-6-1	Domuz dışkısı	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
A2-2-1	Domuz dışkısı	<i>Erwinia rhapontici</i>
A2-2-2	Domuz dışkısı	<i>Phobacterium damsela</i>
A2-4-1	Domuz dışkısı	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

4.10. *Y. enterocolitica* suşlarının LPS Profillerinin Belirlenmesi

Patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının LPS izolasyonu deoxycholate-polyacrylamide-gel electrophoresis (DOC-PAGE) ve gümüş boyama analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Saptanan *Y. enterocolitica* suşlarının LPS profili (O-polisakkarit ve lipid A yapıları) **Şekil 4.9.**'da gösterilmiştir. **A2-1** No'lu suş (*Y. enterocolitica* O:5,27) tek zincirli O polisakkarit yapısına sahiptir. **A2-2, A2-22, A2-25 ve AS-8-15** (*Y. enterocolitica* O:9) ise daha kısa homopolimerik O-polisakkarit yapısına sahiptir. Ancak; **A1-1, AS-11-45, AS-12-35 ve AS-11-47** (*Y. enterocolitica* O:3) suşları daha uzun homopolimerik O-polisakkarit yapısına sahiptir.

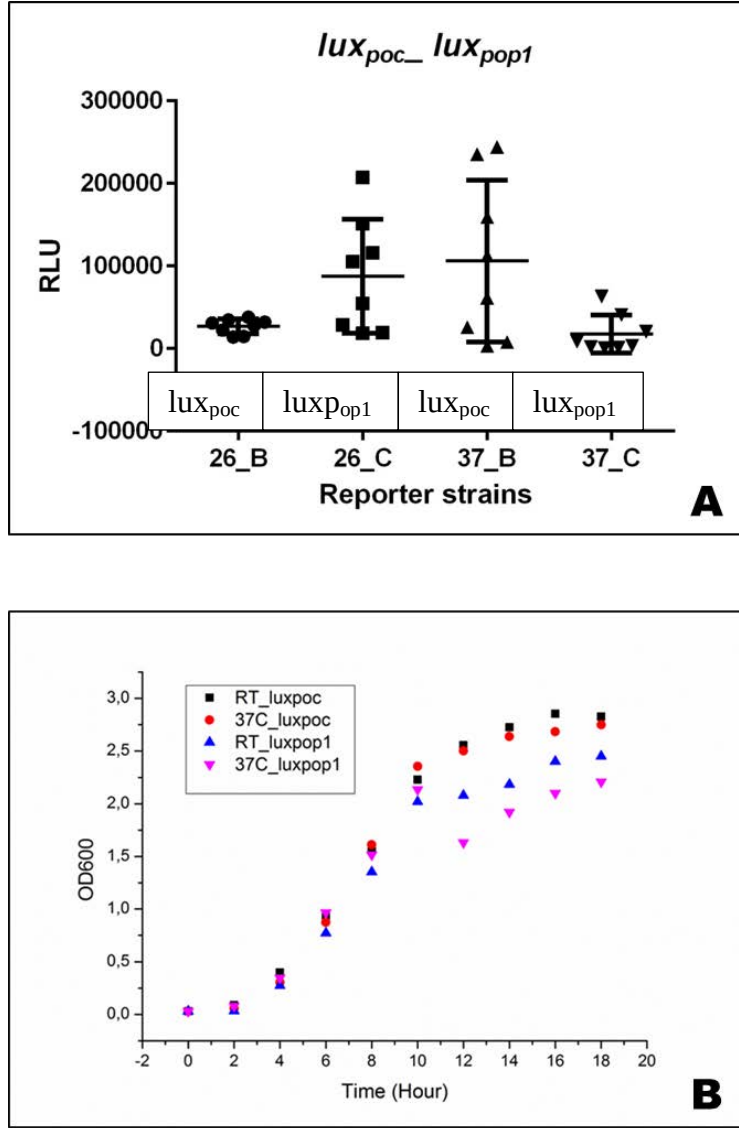


Şekil 4.9. Bu çalışmada izole edilmiş olan *Y. enterocolitica* suşlarının LPS profilleri.

4.11. *İn vitro* Koşullarda Lusiferaz Reporter Suşların (lux_{poc} ve lux_{pop1}) Biyolüminesens Analizi

4.11.1. Lusiferaz reporter suşlarının (lux_{poc} ve lux_{pop1}) biyolüminesens (RLU) arasındaki korelasyonu ve büyüme eğrisi

lux_{poc} ve lux_{pop1} reporter suşlarının, oda sıcaklığında (26 °C) ve 37°C'deki O-antijen ve outer core ifadesi, lüminemeter (HIDEX plate CHAMELEON, 4.08; tek ölçüm/ saniye) aracılığı ölçülmüştür ve ölçüm değerleri Relative light Unit (RLU) olarak belirtilmiştir. **Şekil 4.10 A'**ya göre; lux_{poc} ; B olarak, lux_{pop1} ise C olarak belirtilmiştir. 26_B=oda sıcaklığındaki outer core ifadesini 26_°C ise oda sıcaklığındaki outer core ifadesini ifade etmektedir. 37_B; 37 °C'deki O-antijen ifadesini, 37_B ise 37 °C'deki O-antijen ifadesini belirtmektedir. Outer core reporter suşu (26_B= lux_{poc} ve 37_B= lux_{poc}); 37°C'de oda sıcaklığına göre daha fazla ifadesi gerçekleştirirken; O-antijen ise oda sıcaklığında daha fazla üretilmektedir (26_C ve 37_C). Ancak; iki reporter suşun büyüme eğrisi incelendiğinde outer core suşunun O-antijen'e göre daha hızlı büyüdüğü rapor edilmiştir (**Şekil 4.10. B**). Grafikler Origin prolab 8.6. ve Graphpadprism 6.0 ile oluşturulmuştur.

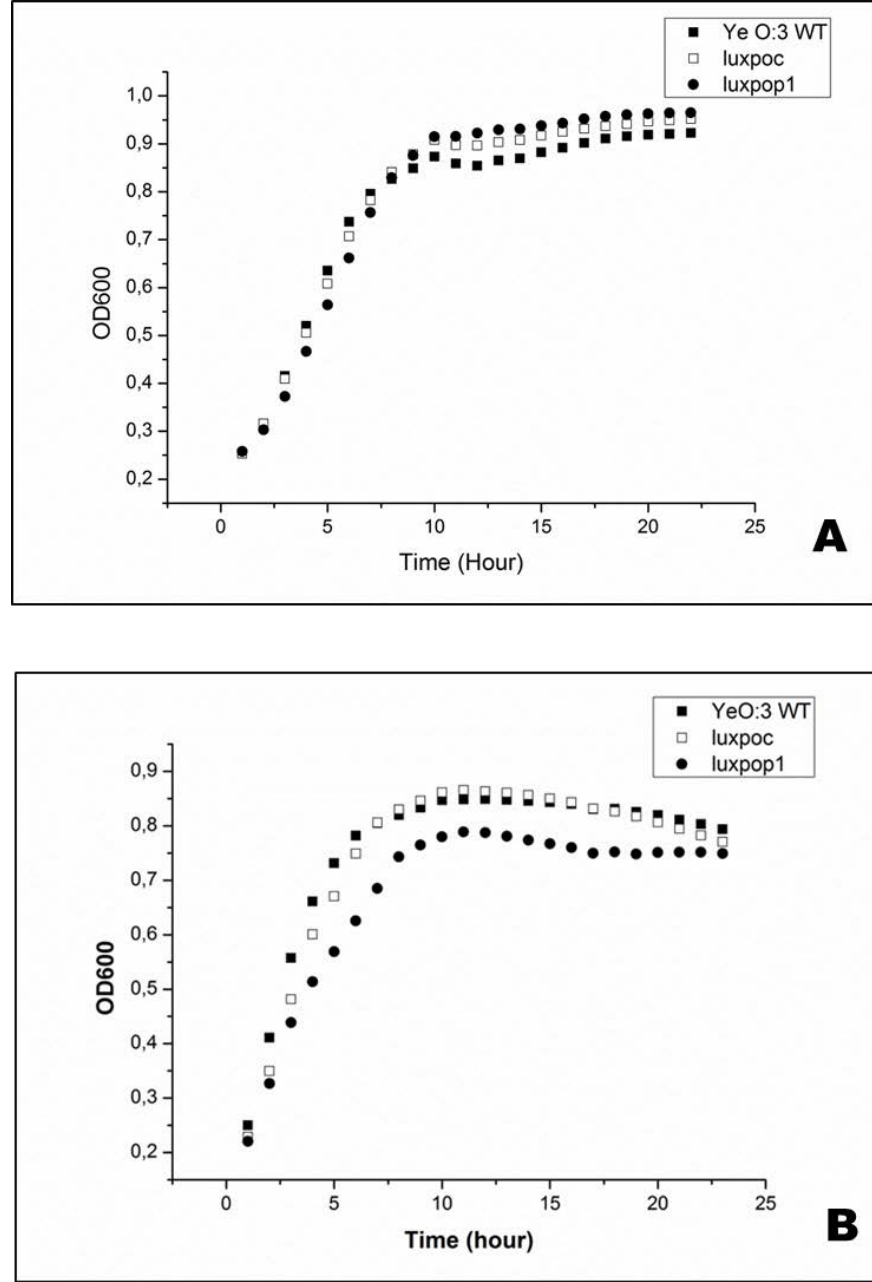


Şekil 4.10. *In vitro* koşullar altında lux_{poc} ve lux_{pop1} reporter suşlarının zamana ve sıcaklığa bağlı olarak büyüme ve biyoluminesens korelasyonu. lux_{poc} ; B olarak, lux_{pop1} ise C olarak ifade edilmektedir. **RLU**: Relative Light Unit

4.11.2. Lusiferaz reporter suşlar (lux_{poc} ve lux_{pop1}) ile Doğal Tip *Y. enterocolitica* O:3 suşunun korelasyonu

Reporter suşlar ile doğal tip *Y. enterocolitica* O:3 arasındaki büyüme korelasyonunu belirlemek amacıyla büyüme eğrisi analizi gerçekleştirilmiştir. Lusiferaz reporter suşlarının dizaynı sırasında lux operonun *Y. enterocolitica* O:3 WT suşunun genomuna entegrasyon nedeniyle, reporter suşların *Y. enterocolitica* O:3 WT ile aynı korelasyonda büyüme eğrisi profile göstermelidir (Şekil 4.11 A ve B) Şekil

4.11. A; suşların oda sıcaklığındaki büyüme eğrisini göstermektedir. **Şekil 4.12. B** ise suşların 37°C’deki büyüme eğrisini göstermektedir.



Şekil 4. 11. *In vitro* koşullar altında lux_{poc} ve lux_{pop1} reporter suşlarının oda sıcaklığı **(A)** (25°C) ve 37 °C’deki **(B)** büyüme koşullarındaki *Y. enterocolitica* O:3 WT suşu ile korelasyonu

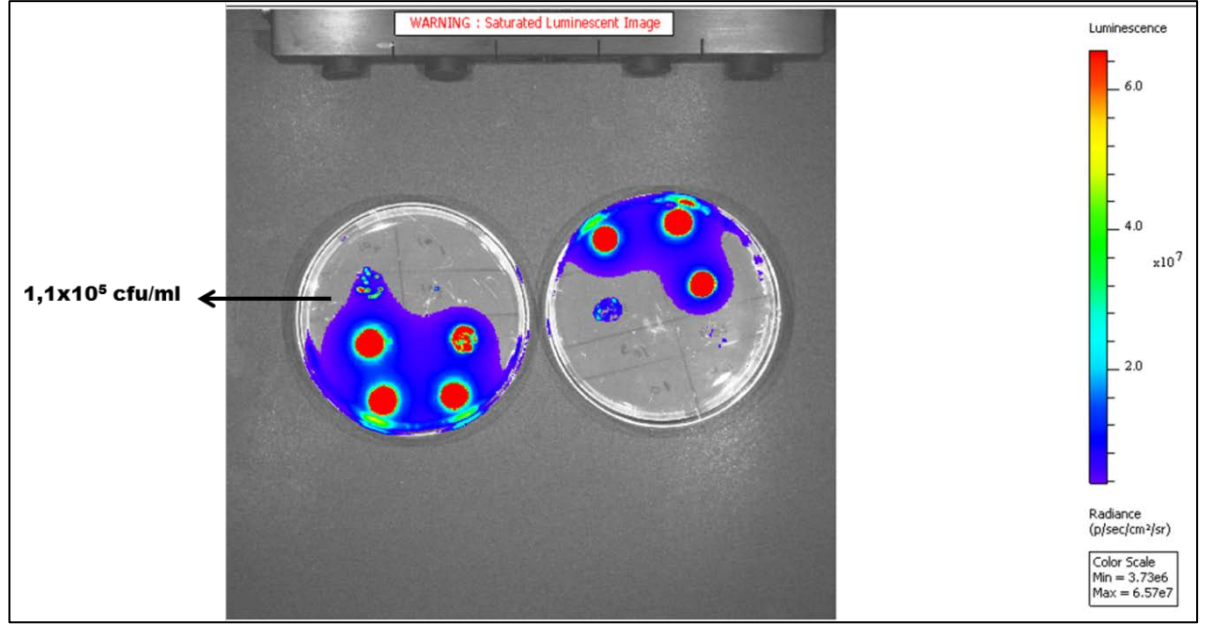
4.12. *In Vivo* Biyolüminesens Analizi

4.12.1. IVIS Spektrum

lux_{poc} ve lux_{pop1} reporter suşlarının balb/c fare modellerinde neden olduğu enfeksiyon ve outer core, o-antijen promotorlarının ifadesini; 1. Saat, 1. Gün ve 5. Gün olarak IVIS spektrum ile izlenmiştir. Enfeksiyon süresince IVIS spektrum ile çekilmiş olan fotoğrafların parametreleri; 5 dakika bağlanma süresi ile radiance ($p/sec/cm^2/sr$) birimi olarak ifade edilmiştir ve biyolüminesens renk skalası minimum ve maksimum değerler olarak ve ifadeye bağlı olarak belirlenmiştir. IVIS spektrum eksitasyon ve emisyon filtreleri maviden NIR dalga boyuna kadar spektral tarama ile gerçekleştirilmektedir. Emisyon filtreleri; 490-850 nm ve Eksitasyon filtreleri ise 415-760 nm dalgaboyu aralığındadır (Şekil 4.13), (Şekil 4.14), (Şekil 4.15), (Şekil 4.16)

Enfeksiyonun 5. gününde; balb/c fareler sakrifiye edilerek olarak lenfoid dokular (lenf nodu, karaciğer, dalak, peyer plakları) ve sindirim sistemi IVIS spektrum ile incelenerek outer core ve O- antijenin indirekt mRNA ifadesi takip edilmiştir. Doku fotoğraflarının parametreleri; 5 dakika bağlanma süresi ile radiance ($p/sec/cm^2/sr$) birimi olarak ifade edilmiştir ve biyolüminesens renk skalası minimum ve maksimum değerler ve ifadeye bağlı olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17), (Şekil 4.18).

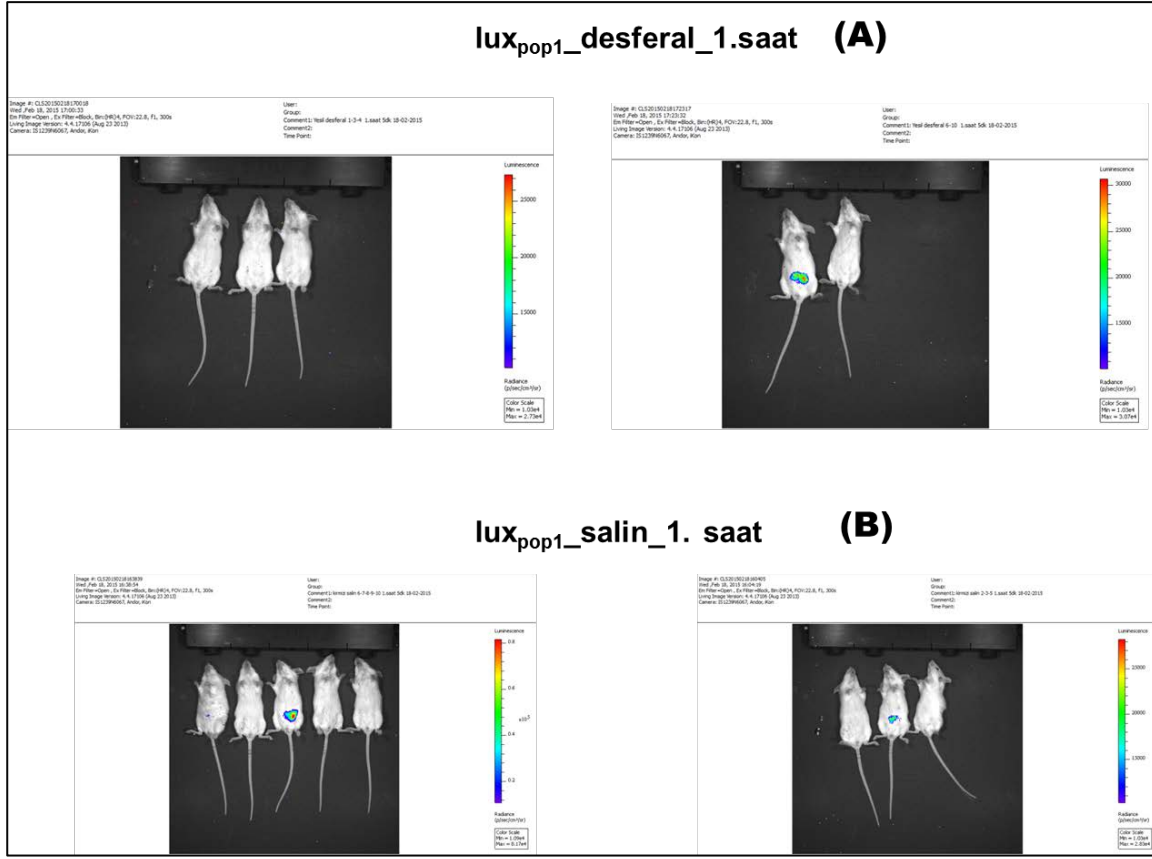
Ayrıca dokular; IVIS spektrum ile incelendikten sonra homojenizatör ile homojenize edilmiştir ve enfeksiyon sonrası her bir dokudaki bakteriyel yük cfu/gr olarak belirlenmiştir (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Dalakta, 5. Gün enfeksiyon sonucunda outer core desferal grubu 10^7 cfu/gr iken o-antijen desferal grubu 10^5 - 10^6 cfu/gr olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde ciğerde O-antijen salin grubunun 10^6 cfu/gr değerine ulaştığı görülmüştür. Peyer plaklarındaki kolonizasyon göz önünde bulundurulduğunda, O-antijen reporter suşlarının (Desferal ve Salin grubu) daha yüksek bakteriyel yüke sahip oldukları gözlenmiştir ($10^4 \pm 10^6$ cfu/gr).



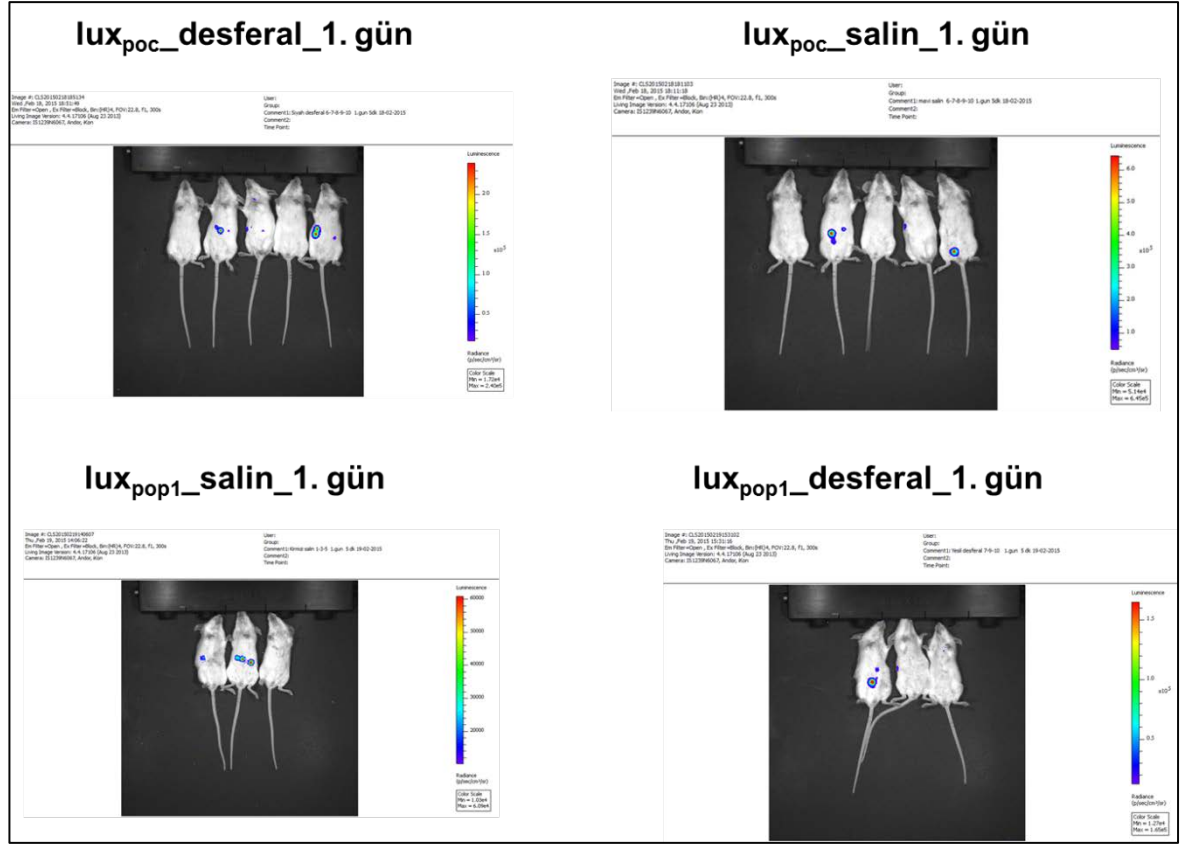
Şekil 4.12. *In vitro* koşullarda $1,1 \times 10^5$ cfu/ml 'deki reporter suşunun luminesens renk skalası ve IVIS Min renk skalası (3.73×10^6 olarak belirlenmiştir)



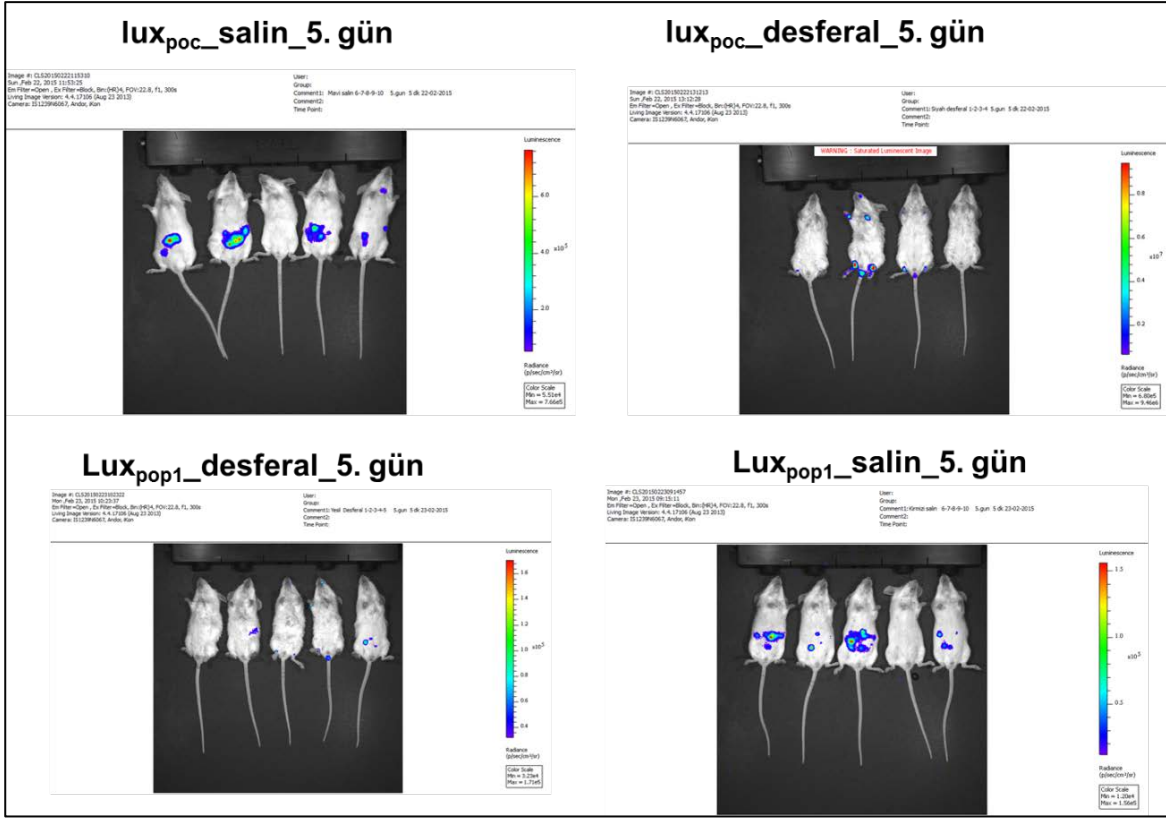
Şekil 4.13. lux_{poc} reporter suşunda desferal ve salin grubu olarak enfeksiyonun 1. saati, IVIS spektrum ile biyoluminesens ölçümü (p/sec/cm²/sr).



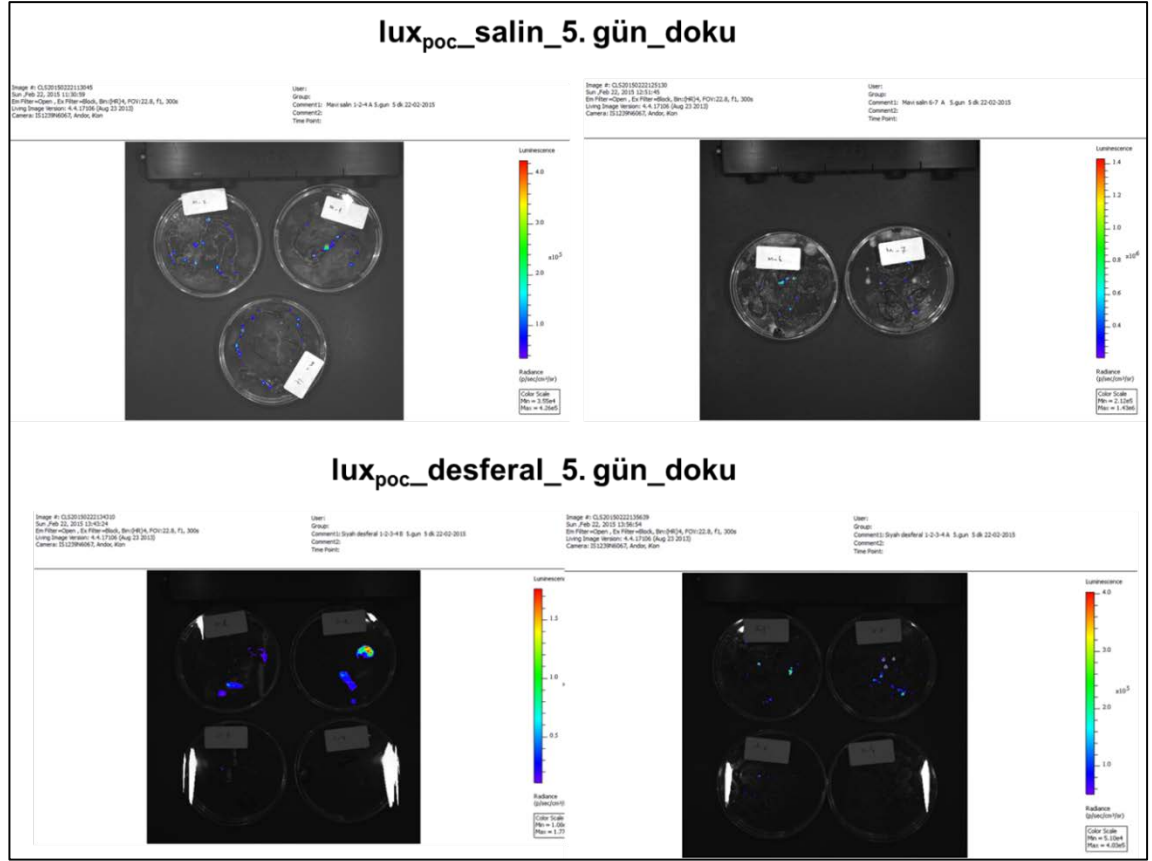
Şekil 4.14. lux_{pop1} reporter suşunda desferal ve salin grubu olarak enfeksiyonun 1. saati, IVIS spektrum ile biyoluminesens ölçümü (p/sec/cm²/sr)



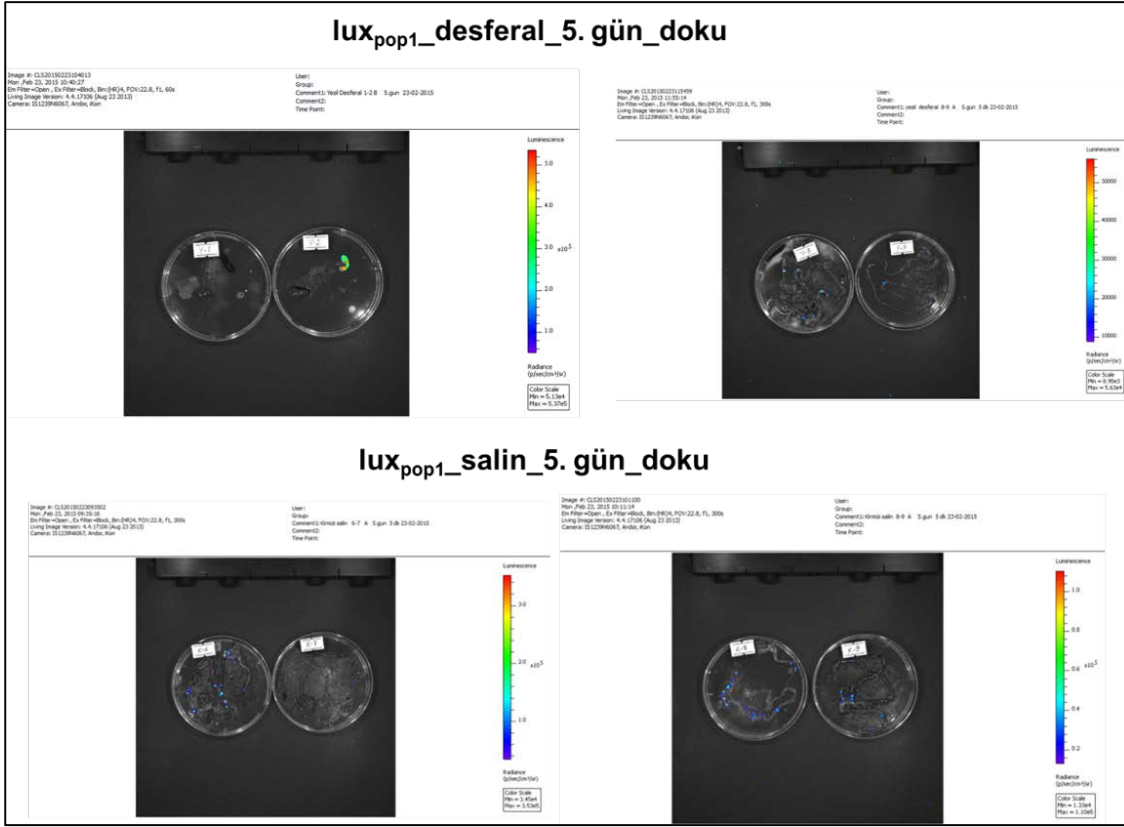
Şekil 4.15. lux_{pop1} ve lux_{poc} reporter suşlarında desferal ve salin grubu olarak enfeksiyonun 1. günü, IVIS spektrum ile biyoluminesens ölçümü (p/sec/cm²/sr).



Şekil 4.16. lux_{pop1} ve lux_{poc} reporter suşlarında desferal ve salin grubu olarak enfeksiyonun 5. günü, IVIS spektrum ile biyoluminesens ölçümü ($p/sec/cm^2/sr$).

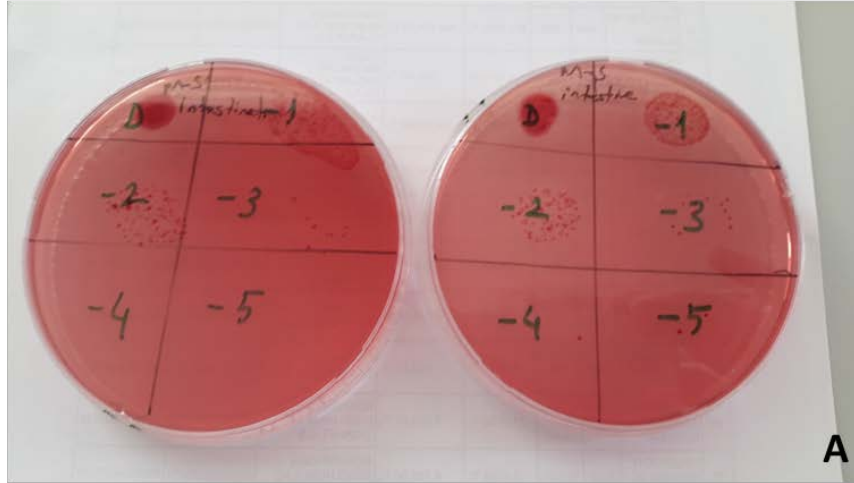


Şekil 4.17. lux_{poc} reporter suşunun desferal ve salin grubu olarak enfeksiyonun 5. günü; lenf nodu, karaciğer, dalak, peyer plakları ve sindirim sisteminin IVIS spektrum ile biyoluminesens ölçümü (p/sec/cm²/sr).

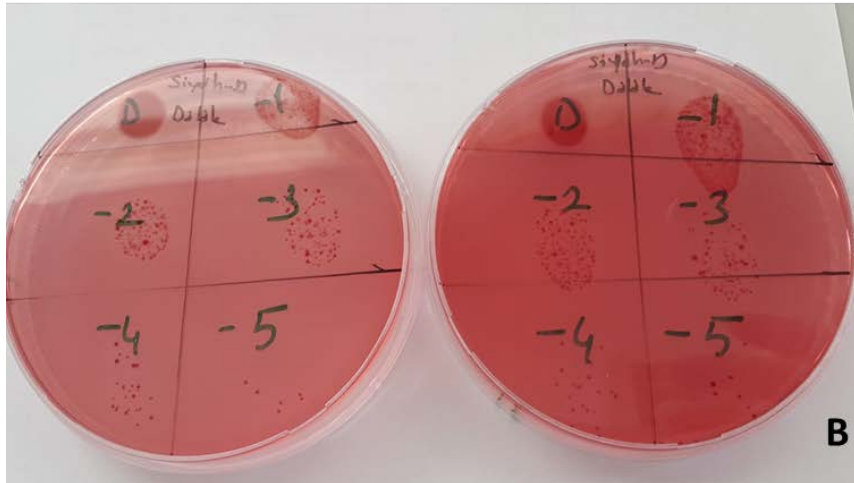


Şekil 4.18. lux_{pop1} reporter suşunun desferal ve salin grubu olarak enfeksiyonun 5. günü; lenf nodu, karaciğer, dalak, peyer plakları ve sindirim sisteminin IVIS spektrum ile biyoluminesens ölçümü (p/sec/cm²/sr).

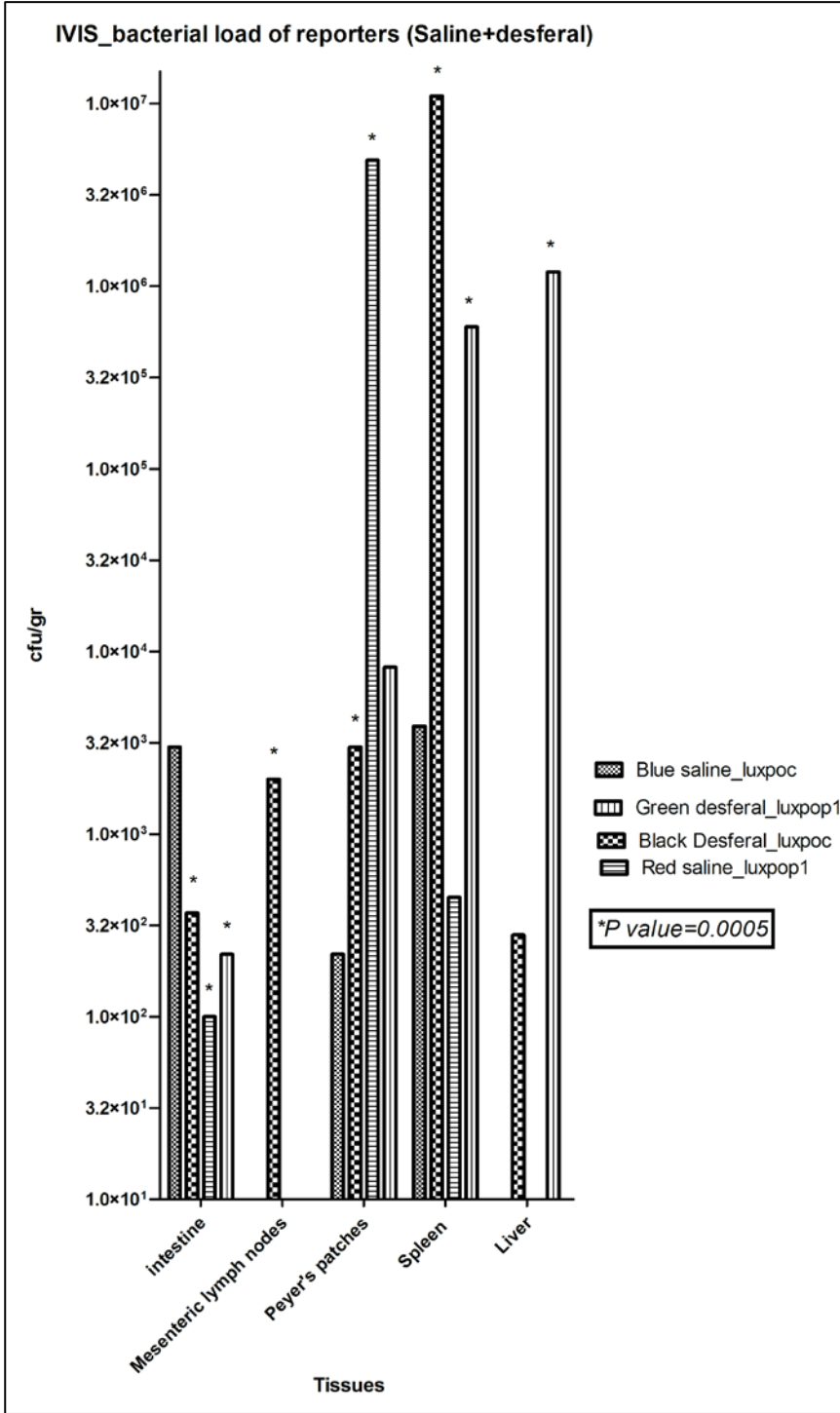
lux_{poc}_salin_sindirir sistem



lux_{poc}_desferal_dalak



Şekil 4.19. lux_{poc} reporter suşunun (desferal grubu) enfeksiyon sonrası sindirim sistemi ve dalakta doku homojenizasyonu sonrası bakteriyel yükün belirlenmesi için CIN agar besiyerine inokülasyonu.



Şekil 4.20. lux_{poc} ve lux_{pop1} reporter suşlarının 5. gün enfeksiyon sonrası; sindirim sistemi, mezenterik lenf nodu, peyer plakları, dalak ve karaciğerdeki bakteriyel yükün belirlenmesi (**Graphpad Prism 5.01**).

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Yersinia, insanlar ve hayvanlar için önemli bir enteropatojendir (Autenrieth et al., 1996). *Yersinia* genusunun insanlarda enfeksiyona neden olan 3 türü bulunmaktadır: *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* ve *Y. pestis*. *Y. enterocolitica* 6 biyotipe ayrılmaktadır; biyotip 1A virülens plazmidi taşımadığından dolayı patojen grubuna dahil edilmemiştir (Heroven and Dersch, 2014; Mahesh Shanker Dhar, 2014). 1B, 2, 3 ve 5 biyotipleri ise patojenik suşları oluşturmaktadır (Wauters et al., 1987). Biyotip 1B, 2, 3 ve 5, genellikle 70 kb'lık virülens plazmidi taşımakta ve ayrıca kromozom aracılı kodlanan virülens faktörlerine sahiptir (Drummond et al., 2012). Kromozom aracılı kodlanan virülens faktörleri; ail (bağlanma ve invazyon lokusu), inv (invazin) ve yst (*Yersinia* stabil toksini)'dir. İnsanlarda enfeksiyona neden olan biyoserotipleri ise, 1B/O:8, 2/O:5,27, 2/O:9, 3/O:3, 4/O:3'tür (Atiqur Rahman et al., 2011). Patojenik *Y. enterocolitica* suşları gıda kaynaklı enterik bir enfeksiyon olan yersiniosis'e neden olmaktadır ve genellikle diyare olarak bilinen klinik bir tablo sergilemektedir. Ayrıca reaktif artrit, eritema nodozum gibi sistemik enfeksiyonlara da neden olmaktadır (Drummond et al., 2012; Efsa, 2012; Heroven and Dersch, 2014).

Y. enterocolitica'nın dünya genelinde yabani ve evcil hayvanlar, çevresel su kaynakları ve insanlar olmak üzere çeşitli rezervuarları bulunmaktadır (Atiqur Rahman et al., 2011; Ioannidis et al., 2014; Longenberger et al., 2014; Ye et al., 2014). Araştırmamızda, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastane 'sinden 62 çocuk ve 40 yetişkin olmak üzere toplam olarak 102 adet diyareli hasta dışkısı, *Y. enterocolitica* suşlarını saptamak amacıyla analize alınmıştır. Ancak, *Y. enterocolitica* suşu saptanamamıştır. Türkiye'de klinik örneklerden birkaç yersiniosis olgusu rapor edilmiştir. İstanbul'da, tip I diyabet hastasından karaciğerinde apseye neden olan *Y. enterocolitica* saptanmıştır (Mert vd., 2011). Özden vd., (2012), Elazığ'da 51 yaşındaki periton diyalizi hastasından patojenik *Y. enterocolitica* suşu saptamışlardır. Ciddi gastrointestinal kanamalı bir hastadan da ayrıca *Y. pseudotuberculosis* olgusu Kahramanmaraş'da rapor edilmiştir (Bülbüloğlu vd.,2010). Dünya genelinde gerçekleştirilmiş olan araştırmaları incelediğimizde; Almanya 2009-2010 yılları arasında gerçekleştirilen popülasyon temelli bir araştırmada yersiniosis hastalarının % 5'inin 5 yaşından küçük hasta gruplarının oluşturduğu rapor edilmiştir (Rosner et al., 2013). Ito et al. (2012), 20 aylık bir bebekten kanamalı enterokolitise neden olan *Y.*

enterocolitica suşunu olgu sunumu olarak rapor etmişlerdir. Benzer olarak bağırsak dönmesi tanısı koyulmuş bir yetişkin hastada enterokolitis etkeni *Y. enterocolitica* suşu saptanmıştır (Imoto et al., 2012).

Çalışmamızda, diyare teşhisi koyulmuş hastaların dışkı örneklerinden (n=102) *Y. enterocolitica* suşu saptanamamıştır. Analize alınan dışkı örnekleri ağırlıklı olarak genel pediatri ve çocuk acil servislerinden orijinlenlenmektedir (**Şekil 4.11**). Türkiye ve Dünya genelinde yapılmış olan araştırma verilerini değerlendirdiğimizde klinik örneklerden *Y. enterocolitica* saptanması çok sık değildir dolayısı ile sonuçlarımız Türkiye’den verilen raporlar ile uyumluluk göstermektedir. Araştırmamızdan da anlaşılacağı gibi, Türkiye’de *Y. enterocolitica* saptanmasının düşük oranda olması ve genel olarak olgu sunumları olarak sınırlı kalması; Türkiye’de domuz eti ve ürünlerinin tüketilmemesi olarak düşünülebilir.

Araştırmamızda ayrıca, diyare hastalara ait dışkı örnekleri; klinik mikrobiyolojide önemli olan *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., ve diyarejenik *E. coli* suşları rutin olarak araştırılmıştır. 102 adet diyareli hasta dışkısından bir hastada *E. coli* O157:H7 saptanmıştır. Ayrıca; bir hastada da *Campylobacter jejuni* ve Enteropatojenik *E. coli* ile ko-enfeksiyon olarak rapor edilmiştir. Dünya genelinde intestinal sistemde enfeksiyona neden olan enterik patojenlerin saptanmasına yönelik araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Katar’da 2005-2013 yılları arasında gerçekleştirilmiş bir araştırmada; ciddi kanlı diyare teşhisi koyulmuş 26,140 hastadan yüksek oranda (8,6%) *Salmonella* spp., ve sırasıyla *E. coli*, *Shigella* spp. ve *Campylobacter* spp. saptanmıştır (Ghunaim et al., 2015). Araştırmamızda da benzer şekilde bir hastada *E.coli* ve *Campylobacter* spp. ko-infeksiyon olarak rapor edilmiştir. İran’da; çocukların diyare örneklerinden yüksek oranda (% 49,8) *Shigella flexneri* rapor edilmiştir (Khaghani et al., 2014). Nijerya’da, 2010-2012 yılları arasında 5 yaşının altındaki diyare teşhisi koyulmuş 4020 çocuğun dışkı örneklerinin %10,3’ünde Enteropatojenik *E. coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.’nin oluşturduğu üçlü enfeksiyon rapor edilmiştir (Langendorf et al., 2015). Diyare etkeni olan *Salmonella* spp., benzer şekilde 5 yaş altındaki çocuklardan yüksek oranda Çin’den rapor edilmiştir (Liang et al., 2015). Diyarbakır’da diyare teşhisi koyulmuş 767 adet hastadan; 19 adet *Shigella* (%1,7), 153 adet enteropatojenik *E.coli* (60,9%) rapor edilmiştir (Turhanoğlu vd.,2012).

Kırıkkale’de ise 10 yaş altındaki çocuklar üzerine gerçekleştirilen araştırmada 245 hastanın 12’sinde enterotoksijenik *E. coli* saptanmıştır (İşeri vd., 2012). Araştırmamızda, diğer diyarejenik bakteriyel ajanların rapor edilmesi Dünya geneli ve Türkiye’den verilen raporlar ile uyumludur ancak saptama oranı açısından daha düşük bir orana sahiptir.

Y. enterocolitica suşlarının domuz kesimhanelerinden, domuz bademciklerinden, dilinden, ağız boşluğundan ve dışkı örneklerinden izolasyonu ve tanılanması için birçok araştırma gerçekleştirilmiştir (Biasizzo, 2013; Bonardi, 2013; Vanantwerpen et al., 2014). Araştırmamızda, İzmir İl sınırları içerisindeki Menemen domuz çiftliğinden 2 adet domuz dışkısı ve 2 adet domuz gübresi, *Y. enterocolitica* suşu saptamak için analize alınmıştır. Gerçekleştirdiğimiz ön zenginleştirme işlemleri sonucu 69 adet *Yersinia* benzeri şüpheli koloniden 5 adet (%7, 24) *Y. enterocolitica* suşu fenotipik ve genotipik tanılama analizleri ile saptanmıştır. Fenotipik ve genotipik patojenite testleri sonucu saptanan suşların patojenik olduğu belirlenmiştir. Domuz gübresinden saptanan patojenik biyoserotipler: 4/O:3 ($n=1$), 2/O:5,27 ($n=1$) ve 2/O:9 ($n=3$)’dur. Domuz dışkısından ise 2/O:9 ($n=1$) biyoserotipi rapor edilmiştir. Dünya genelinde gerçekleştirilmiş araştırmalar dikkate alındığında *Y. enterocolitica* 4/O:3 biyoserotipinin domuzlardan en sık izole edilen biyoserotip olduğu rapor edilmiştir (Fondrevez et al., 2014). İnsanlarda hastalığa neden olan *Y. enterocolitica* suşları ise genellikle domuz eti ve domuz eti ürünlerinden saptanmaktadır (Laukkanen et al., 2010). Domuzlar genellikle *Y. enterocolitica* suşlarının sağlıklı taşıyıcıları olarak bilinmektedir ve domuzlarda herhangi bir hastalık belirtisi görülmemektedir. *Y. enterocolitica* suşları domuzların dillerinde, bademciklerinde taşınmaktadır ve dışkı ile dışarı atılmaktadır. Tan ve ark., Malezya’da 9 domuz çiftliğinden 165 domuzu *Y. enterocolitica* saptamak amacıyla araştırmışlar ve %18 oranında patojenik *Y. enterocolitica* 3/O:3 suşu saptamışlardır (Tan et al., 2014). İtalya’da 115 domuz örneğinden 24 adet (%20,9) *Y. enterocolitica* 4/O:3 biyoserotipi saptanmıştır (Bonardi, 2013). *Y. enterocolitica* 4/O:3 serotipleri Kuzey İtalya’da domuz kesimhanesinden saptanmıştır (Bonardi, 2014). Ayrıca Fondrevez et al. (2014), Fransa’da domuz kesimhanesinden patojenik *Y. enterocolitica* biyoserotiplerini rapor etmişlerdir. Gerçekleştirdiğimiz araştırmamız da diğer çalışmalar ile korelasyon göstermektedir. Benzer şekilde domuz gübresinden, domuzlarda en sık rastlanan biyoserotip olan 1 adet *Y. enterocolitica* 4/O:3 biyoserotipi rapor edilmiştir. Türkiye genelinde ise

literatür araştırması yapıldığında, domuz dışkısı ve gübresinden *Y. enterocolitica* saptanmasına yönelik herhangi bir veriye rastlanılamamıştır. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı'na göre, Türkiye'de kayıtlı 5 adet domuz çiftliği bulunmaktadır (Antalya, Balıkesir, Edirne, İzmir ve Kırklareli) fakat resmi bir kesimhane bilgisi bulunmamakta ancak 2004 yılında 174 ton domuz eti üretildiği belirtilmiştir (Türkiye Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, www.tarim.gov.tr). Türkiye'deki domuz çiftlikleri yanı sıra, yaban domuz avcılığı ve tüketimi de göz önünde bulundurulmalıdır ancak Türkiye'de bu konu hakkında resmi bir veri verilmemiştir. Dünya genelinde ise; yaban domuzlarda *Y. enterocolitica* izolasyonu ve karakterizasyonu üzerine araştırmalar gerçekleştirilmiştir (Hayashidani et al., 2002; Bancarz-Kisiel et al., 2015; Sannö et al., 2014). Ksiel et al. (2015), Polonya'da gerçekleştirdikleri araştırmada yaban domuzlarında özellikle *Y. enterocolitica* suşlarının 2/O:9 ve 4/O:3 biyoserotiplerini rapor etmişlerdir. Araştırmamızda; analize alınmış olan domuz dışkısı ve domuz gübre sayısı düşük olmasına rağmen; 4 örnekten 5 adet *Y. enterocolitica* suşu saptanabilmiştir ancak saptama oranının yüksek olması; domuzlardaki *Y. enterocolitica* epidemiyolojisi hakkında kesin bilgi vermemektedir. Epidemiyolojisi ve insidansı hakkında kesin bilgi verebilmek için daha fazla domuz orijinli örnek analize alınmalıdır. Domuz etinin Türkiye'de genellikle turistler tarafından tüketildiğini göz önünde bulundurulabilir ve 4 adet domuz gübresi ve domuz dışkı materyalinden 5 adet patojenik *Y. enterocolitica* suşu saptanmasının turistler için büyük bir tehlike oluşturabileceği sonucuna varılabilir.

Su kaynakları; çevresel kirliliği yanı sıra, yabani ve evcil hayvanların fekal kontaminasyona maruz kalmaktadır. Bu yüzden su kaynakları da *Y. enterocolitica* rezervuarı olarak göz önünde bulundurulmaktadır (Nesbakken, 2013). Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada; 12 adet kanal, körfez, belediye havuzu ve kuyu suyundan yapılan ön zenginleştirme işlemleri sonucunda 15 adet *Yersinia* benzeri koloni; fenotipik ve genotipik tanılama analizlerine tabi tutulmuş ancak *Y. enterocolitica* suşu saptanamamıştır. Ancak araştırmamızda İzmir İl'i çevresinde bulunan 3 farklı atık su arıtma tesisinden (Aliğa, Menemen ve Çiğli), 6 adet atık su numunesi analize alınmış ve 43 adet *Yersinia* benzeri şüpheli koloniden 4 adet (% 9,3) patojenik *Y. enterocolitica* suşu saptanmıştır. Saptanan *Y. enterocolitica* suşlarının biyoserotipleri ise bakteriyofaj tiplendirme ve O-antijen genotiplendirme ile 2/O:9 ve 4/O:3 olarak belirlenmiştir. 3 adet *Y. enterocolitica* 4/O:3 suşu Aliğa atık su arıtma

tesisinden ve 1 adet *Y. enterocolitica* 2/O: 9 serotipi ise Menemen atık su arıtma tesisinden izole edilmiştir. Aliğa ve Menemen atık su arıtma tesisleri daha çok insan ve evcil hayvan atığı içermesine rağmen saptanmış olan patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının kaynağı hakkında kesin bir karara varamayabiliriz. Dünya genelinde, Cheyne ve ark. (2009) yılında; Kanada, Ontario bölgesinde 200 nehir suyu örneğinde patojenik *Y. enterocolitica* suşlarını saptamayı amaçlamışlar ancak saptanan *Y. enterocolitica* suşlarının patojenik olmadığını rapor etmişlerdir. Ancak, Brezilya’da yapılan bir araştırmada, atık su ve diğer su örneklerinden *Y. enterocolitica* 2/O:5,27 ve *Y. enterocolitica* 3/O:5,27 biyoserotipleri saptanmıştır (Falcao et al., 2004). Diğer bir araştırma ise Waage ve ark. tarafından Norveç’te gerçekleştirilmiştir; yapılan araştırmaya göre çevresel ve atık su örneklerinden *Y. enterocolitica* O:3 suşları nested PCR ile saptanmıştır (Waage et al., 1999). Zieger and Diesterweg (1990), Almanya’da atık su arıtma tesislerinden *Y. enterocolitica* O:3 ve O:4 serotiplerinin izolasyonunu sağlamışlardır. Türkiye’de ise İzmir’de içme suyu kaynaklarının mikrobiyolojik kalitesi üzerine yapılan araştırmada 100 su örneğinden 5 adet *Y. enterocolitica* suşu rapor edilmiştir fakat saptanan *Y. enterocolitica* suşlarının biyoserotipleri hakkında kesin bir bilgi bulunmamaktadır (Gonul ve Karapinar, 1991). Atık su arıtma tesislerinden izolasyonu sağlanmış olan 2/O:9 ve 4/O:3 biyoserotipleri dünya genelinde su örneklerinden gerçekleştirilmiş olan izolasyon çalışmaları ile uyumluluk göstermektedir. Benzer şekilde araştırmamızda atık su arıtma tesislerinden *Y. enterocolitica* suşlarının O:3 ve O:9 serotipleri rapor edilmiştir.

Gram negatif bakterilerde; LPS bileşeninin lipidA ve core yapıları korunmuş bölgeler olarak bilinirken, O-antijen yapısı oldukça değişkendir. Korunmuş bölgeler gram negatif bakteriler arasında aynı profili gösterirken; O-antijen yapısı ise oligosakkarit zincirinin uzunluğuna göre değişiklik göstermektedir ve bu değişkenlik bakteriyel suşların gruplandırılmasına ve serotiplendirilmesine olanak sağlamaktadır (Reyes et al., 2012). LPS bileşenlerinin profillerinin belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE veya DOC-PAGE analizi gerçekleştirilmektedir ve böylece O-antijeni oluşturan oligosakkarit birimleri belirlenmektedir. Araştırmamızda saptadığımız 9 adet *Y. enterocolitica* suşunun LPS profillerini belirlemek amacıyla DOC-PAGE ve gümüş boyama analizleri gerçekleştirilmiştir ve böylece *Y. enterocolitica* suşlarının 2/O:9, 2/O:5,27 ve 4/O:3 olmak üzere 3 farklı serotipe sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızın birinci amacı kapsamında, İzmir İl'inde bulunan domuz çiftliği ve atık su arıtma tesislerinden 9 adet patojenik *Y. enterocolitica* suşu saptanmıştır. Patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının domuz gübresi ve domuz dışkılarından izole edilmesi Türkiye'den ilk verilen rapordur. Saptanan 9 adet patojenik *Y. enterocolitica* suşu üç farklı biyoserotipe sahiptir: 2/O:9, 2/O:5,27 ve 4/O:3'tür ve bu biyoserotipler Avrupa'da insanlardan izole edilen ve en sık gözlenen patojenik *Y. enterocolitica* biyoserotipleridir (Efsa, 2012). İzolasyonları ve tanılamaları gerçekleştirilmiş olan *Y. enterocolitica* suşlarının fenotipik ve genotipik analizler ile karakterizasyonu yapılmıştır. Türkiye'de *Y. enterocolitica* suşlarının izolasyonu üzerine oldukça az sayıda araştırma bulunmaktadır ve özellikle patojenik biyoserotiplerinin izolasyon oranı oldukça düşüktür. Patojenik *Y. enterocolitica* suşlarının saptama oranının düşük olmasının sebepleri arasında öncelikle Türkiye'de klinik önemi olmadığı için klinikte rutin olarak analize alınmamasıdır. Diğer bir sebep ise Türkiye'de domuz eti ve ürünlerinin tüketilmemesi ve dolayısı ile yersiniosis olgusunun saptanma olasılığının çok düşük olmasıdır. Ancak; domuz çiftliğinden *Y. enterocolitica* suşlarının izolasyonu halk sağlığı açısından büyük risk oluşturma potansiyeli bulunmaktadır.

Y. enterocolitica suşlarında birçok virülens faktörü; virülens plazmidi tarafından kodlanmaktadır ve en önemlileri ise *yadA*, *yops* ve *virF/lcrF*'dir. Ayrıca, *ail* ve *inv*, *ystA* ve *ystB* de kromozom tarafından kodlanan virülens faktörleridir (Fàbrega and Villa, 2012). Gerçekleştirdiğimiz araştırmamızda, fenotipik ve genotipik tanılamaları yapılmış olan 9 adet *Y. enterocolitica* suşunun fenotipik patojenite testleri kapsamında otoaglutinasyon ve congo-kırmızısına bağlanma testleri gerçekleştirilmiştir. 9 adet *Y. enterocolitica* suşu fenotipik patojenite test analizleri sonucu patojenik olarak belirlenmiştir. Genotipik olarak; kromozom aracılı kodlanan; genellikle insanlarda enfeksiyona neden olan suşlarda saptanan, bağlanma ve invazyon lokus geni olan *ail*, sıcaklık stabil enterotoksin geni olan ve genellikle *Y. enterocolitica* suşlarının patojenik biyoserotiplerinde saptanan *ystA*, *Y. enterocolitica* 1A biyotiplerinde bulunan bir enterotoksin geni olan *ystB*; plazmit aracılı kodlanan transkripsiyonel aktivatör ve Tip III sekresyon sisteminde gerekli olan *yop* regülonu (*virF/lcrF*) ve bir adezyon proteinini kodlayan *yadA* geni standart PCR analizleri ile saptanmıştır. Dupleks PCR analizi sonucu tanılanmış olan *Y. enterocolitica* suşlarında *ail*, *ystA*, *yadA* ve *virF* virülens genleri saptanmıştır. PCR analizleri sırasında patojenik *Y. enterocolitica* O:5,27, O:9, O:3 ve O:8 serotipleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Domuz çiftliği ve atık su örneklerinden izole ettiğimiz virülens genlerinin dağılımı pozitif kontrol suşları ile korelasyon göstermektedir. Virülens plazmidi ve kromozom aracılı kodlanan virülens faktörler, *Y. enterocolitica* patogeneğinde oldukça önemlidir. Bu virülens faktörler, konak canlı içerisinde enfeksiyonun başlatılması ve ilerlemesinde büyük rol oynamaktadırlar (Fàbrega and Villa, 2012). Schneeberger et al. (2015); İsviçre’de 87 adet domuz ve insan orijinli *Y. enterocolitica* suşlarında virülens ilişkili (*yadA*, *virF*, *ail*, *inv*, *rovA*, *ymoA*, *ystA* ve *myfA*) gen bölgeleri araştırılmış, *ystB* enterotoksin gen bölgesi hariç %96 oranında *yadA*, *virF*, *ail*, *inv*, *rovA*, *ymoA*, *ystA* ve *myfA* gen bölgeleri saptanmıştır. Araştırmamızda da benzer şekilde *ystB* gen bölgesi dışında *Y. enterocolitica* patogeneğinde önemli olan *ail*, *ystA*, *yadA* ve *virF* virülens genleri saptanmıştır. Türkiye’de 2014 yılında gerçekleştirilmiş bir araştırmada; et ve süt ürünlerinden izolasyonu yapılan 18 adet *Y. enterocolitica* suşundan kromozomal (*ail*, *ystA* ve *ystB*) ve plazmit DNA’da (*yadA* ve *virF*) kodlanan genlerin varlığı bakımından genotipik olarak incelenmiştir. Ancak genotipik olarak virülens geni saptanamamış olmakla birlikte *Y. enterocolitica* suşlarının ikisinin *ystB* genine sahip olduğu rapor edilmiştir (Özdemir, 2014). *ystB* geni genellikle *Y. enterocolitica* suşlarının 1A biyotipinde saptanmaktadır ve klinik orijinli *Y. enterocolitica* suşlarında önemi vurgulanmaktadır (Thoerner et al., 2003; Schneeberger et al., 2015). Türkiye genelinde, virülens genlerinin genotipik olarak saptanması amaçlı literatür verilerini göz önünde bulundurduğumuzda; araştırmamızda *ail*, *ystA*, *yadA* ve *virF* genlerinin atık su ve domuz orijinli örneklerden saptanması Türkiye literatürüne büyük katkı sağlayabilir.

Kromozom aracılı kodlanan önemli virülens faktörlerinden birisi de LPS’dir (Hoare et al., 2006). LPS’in keşfinden günümüze kadar, LPS üzerine yapılmış olan araştırmalar iki amaca hizmet etmektedir; birincisi LPS’in mikrobiyal patogenezdeki önemidir; diğeri ise mikrobiyal orijinli birçok molekülün aktifleştirilmesine neden olmaktadır. TLR4 tanınması için *in situ* çalışmalarda LPS tepkisi ölçülmektedir (Beutler, 2002). LPS, Gram negatif bakterilerin hücre duvarının dış membranını oluşturmaktadır ve yapısal ve işlevsel olarak önemli bir bileşendir. LPS hidrofobik moleküllerin bakteri hücre duvarından geçişine aracı olmaktadır ve konak-mikroorganizma arasındaki ilişkilerde önemli bir yere sahiptir. LPS üç farklı domainden oluşmaktadır: a) Lipid A, bakteriyel membrana bağlıdır ve hidrofobik ve endotoksik kısımdan oluşmaktadır. b) Core oligosakkarit, lipid A yapısını O-antijene

bağlar ve iki kısımdan oluşur; inner core ve outer core c) LPS yapısının hidrofilik ve immünodominant kısmını oluşturan O-polisakkarittir (Chaput et al., 2013; Reyes et al., 2012). LPS; yapılan araştırmalarda önemli bir virülens faktör olarak rapor edilmektedir. Bakteriyel LPS yapısı birçok memeli hücrede patofizyolojik etki göstermektedir ve bu etkiler; endotoksik şok ve sonuç olarak çoklu organ bozukluğuna ve ölüme neden olabilmektedir (Najdenski et al., 2003). Ayrıca LPS *in vivo* koşullarda enfeksiyon sırasında konakçının immün sisteminin modülasyonuna neden olmaktadır ve enfeksiyon sırasında konak aracılı birçok biyolojik molekülü aktive etmektedir. LPS yapısının farklı kısımları da enfeksiyon sırasında önemli virülens faktörü olarak rapor edilmiştir (Skurnik and Bengoechea, 2003; Skurnik et al., 1999).

O-antijen; *Salmonella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa* gibi birçok Gram negatif bakteri türünde önemli bir virülens belirteci olarak bilinmektedir (Najdenski et al., 2003). O-antijen, konak hücrede enfeksiyon sırasında bakterinin kolonizasyonunda, immün sistemdeki komplement sistemine karşı direnç göstermede ve bakteri ile konak hücre ile ilk etkileşiminde önemli bir işleve sahiptir. Yapılan araştırmaları incelediğimizde, Chaput ve ark., O-antijenin histon saldırısına karşı bakteriyi koruduğunu göstermiştir (Chaput et al., 2013). O-antijen bakteriyel yüzeydeki negatif yükü nötralize etmektedir ve dolayısı ile katyonik antimikrobiyal peptidlere karşı çekim gücünü azaltmaktadır ayrıca O-antijen; Lipid A'yı maskeleyerek histonların lipid A'ya bağlanmasını engellemektedir (Chaput et al., 2013). Duer et al., *Salmonella* spp. suşlarının enfeksiyon sırasında O-antijenin bileşeninin LPS'in immün sistem tarafından tanınmasını geciktirdiğini rapor etmişlerdir (Duerr et al., 2009).

Yersinia suşlarında LPS; sıcaklık ile regüle edilmektedir. Örneğin, *in vitro* koşullarda; oda sıcaklığında O-antijen 37°C'ye göre daha fazla üretilmektedir. Ancak *in vivo* koşullarda O-antijen üretilmesinin sistemik enfeksiyon sırasında baskılanabileceği bildirilmiştir (Bengoechea et al., 2002). O-antijenin sıcaklık aracılı regülasyon mekanizması henüz aydınlatılmamıştır fakat iki öneri ortaya atılmıştır: O-antijen gen takımının oda sıcaklığında ifadesi için aktivatör bir protein olabileceği ve bu aktivatör proteinin 37°C'de işlevsel olmadığı yada 37°C'de aktifleşen bir represör proteinin bulunmasıdır (Lahtinen et al., 2003). *Y. enterocolitica* suşlarında outer-core yapısı da ayrıca konak immün sistemine karşı bakteriyi korumaktadır (Skurnik et al., 1999). Yapılan bir araştırmada O-antijen gen bölgesi silinmiş mutant *Y. enterocolitica*

O:3 ve O:8 serotiplerinin, yaban tip serotiplerine göre 50-100 kat daha az virulent oldukları saptanmıştır ve O-antijenin *Y. enterocolitica* virülansındaki önemi vurgulanmıştır (Zhang et al.,1997; Al-Hendy et al., 1992). *Y. enterocolitica* O:3 suşlarında outer core bileşeninin, enfeksiyon sırasında önemli bir virülens belirteci olan *ail* ile koordineli olarak çalıştığı rapor edilmiştir (Skurnik et al., 1999).

Y. enterocolitica suşlarının patogenezi göz önünde bulundurduğumuzda insanlarda bakteriyel enteritidis ve enterokolitis etkeni olarak gösterilmektedir. Ekstraintestinal ve sistemik enfeksiyonlar genellikle *Y. enterocolitica* suşlarının O:8 gibi yüksek virülense sahip serotiplerinde gözlenmektedir (Ruiz Bravo et al., 2001). Ayrıca karaciğer ve dalakta apseye neden olmasının yansıra mezenterik lenfadenit gibi sistemik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Kronik persistent enfeksiyonlarında *Y. enterocolitica* spesifik IgA antikorları hasta serumunda yüksek titrede saptanmaktadır. Bu yüzden *Y. enterocolitica* suşlarının patogenezi anlamak amacıyla hayvan modelleri ve genellikle fare model sistemleri kullanılmaktadır (Autenrieth et al., 1996). *Y. enterocolitica*'nın neden olduğu enfeksiyonu gözlemlemek için gerçekleştirilen bir fare deneyinde; *Y. enterocolitica* suşlarının folikül ilişkili olan peyer plak epitel hücrelerine bağlandığı ve peyer plaklarını işgal ettiği saptanmıştır ve peyer plaklarında piyojenik lezyon oluşumu ile birlikte interlökin-1 salgılandığı saptanmıştır (Autenrieth et al., 1996). Enfeksiyonun sonraki günlerinde *Y. enterocolitica* peyer plaklarından bağırsak ile ilişkili lenfoid dokulara hareket etmektedir. Sistemik enfeksiyon gözlenmesi durumunda ise; mezenterik lenf nodüllerinden dalak, karaciğer ve akciğerlere kadar taşınmaktadır. Bu aşamada *Y. enterocolitica*'ya karşı T-hücresi bağımlı immün yanıt aktifleştirilmektedir. (Autenrieth et al., 1996).

Mikroorganizmalar, konak canlı içerisinde kolonize oldukları doku veya organ içerisinde immün sistem gibi çeşitli faktörlere maruz kalmaktadır dolayısı ile özellikle patojen mikroorganizmalar konak canlı içerisindeki değişiklikleri hisseder ve adaptasyon için virülens faktörleri gibi çeşitli biyolojik aktivitelerini değiştirirler. Bu amaçla *in vivo* koşullardaki çevresel değişikliklere karşı mikroorganizmaların geliştirdikleri stratejileri araştırmak amacıyla transkripsiyonel reporter sistemler geliştirilmiştir. Reporter genler; hedef promotörün kontrolü altında analiz edilecek olan proteinin allelic-exchange ile yer değiştirmesi sonucu mRNA ifadesinin indirekt

olarak izlenmesine olanak sağlamaktadır. Virölens genlerinin de transkripsiyonunu sağlayan promotor reporter sistemi; enfeksiyon sırasında transkripsiyonel regülasyon süresince patojenin, konak hücrede nasıl bir tepki göstereceğinin izlenmesine olanak sağlamaktadır (Campbell-Valois and Sansonetti, 2014). En iyi bilinen örneklerden birisi *E. coli*'nin galaktoz üzerinde büyüme adaptasyonunu gösteren, Jacop ve Monod tarafından geliştirilen operon modelidir. Bu amaçla GFP proteinler de kullanılarak bakterilerin adaptasyon ve ifade çalışmaları gerçekleştirilmiştir. β -galaktosidaz füzyon reporter sistemi kullanılarak *Salmonella* spp.'de *RhoP*-bağımlı ifadesi gerçekleşen genlerin makrofajlar içerisindeki fagosomlardaki gen ifadesi değerlendirilmiştir (Aranda et al., 1992). Günümüzde popüler olan lusiferaz genleri biyoluminesens görüntüleme sisteminde kullanılmaktadır. Bu amaçla *Photorhabdus luminesens* bakterisine ait lusiferaz enzimi birçok bakteri grubunun izlenmesi amaçlı kullanılmaktadır. *Photorhabdus* türleri, böcek patojeni olarak bilinmektedir ve böcek, bir avcı tarafından öldürüldüğünde *Photorhabdus* bakterisi ortaya çıkar ve biyoluminesens ışımaya verir ve bu ışımaya quorum sensing mekanizması ile çalıştığı bilinmektedir. Biyoluminesens ışık üretimi *LuxCDABE* operonu tarafından kodlanmaktadır. *LuxA* ve *LuxB* heterodimerik bir enzim olan lusiferazı kodlamaktadır ve flavin mononükleotid (FMNH₂) varlığında indüklenen uzun zincirli yağ aldehitin oksidasyonunu katalizler ve yağ aldehiti *LuxCDE* tarafından kodlanmaktadır (Ghan, 2012; Campbell-Valois et al., 2014). *LuxAB* lusiferaz enziminin ışık üretebilmesi için substrata ihtiyacı olduğundan *LuxCDE* operonu; *LuxAB* için gerekli olan substratı kodlamaktadır. *LuxCDABE* reporter sisteminde, enzim ve substratı birlikte ifade edildiğinde biyoluminesens ışımaya vermektedir ve enfeksiyonun izlenmesi için sadece metabolik olarak aktif olan bir bakteri yeterlidir, kendi substratını üretmekte ve deney süresince dışarıdan bir substrat ilavesine gerek duyulmamaktadır. *LuxCDABE* reporter sistemi, spesifik virölens promotorlarının *in vivo* koşullardaki transkripsiyon seviyesinin izlemek amacıyla kullanılmaktadır (Campbell-Valois and Sansonetti, 2014).

Birçok bakteri grubunda *lux* operonun entegrasyonuna olanak sağlayan vektörler ve genetik sistemler geliştirilmiştir ve bu sistemler ilk başta *in vitro* koşullarda lüminemeter ile ölçülmekte ve CCD kamera teknolojisi aracılığı ile *in vivo* luminesens ölçümü gerçekleştirilmektedir. *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*)'den izole edilmiş olan lusiferaz, *E. coli*'ye klonlanmış ancak 37°C'de stabilitesini kaybetmiştir. *Vibrio*

harveyi suşunda ise 37°C’de stabil iken; *P. luminesens*’den izole edilmiş olan lusiferaz 42°C’de optimum aktivite göstermektedir bu yüzden bir çok patojen mikroorganizmanın izlenmesinde uygulama alanı bulmuştur (Gahan, 2012). Gerçekleştirdiğimiz araştırmamızda da, lusiferaz enzim kaynağı olarak *P. luminesens* kullanılmıştır. LPS bileşenlerinden outer-core ve O-antijen ifadesini *in vivo* ve *in vitro* koşullardaki ifadesi sıcaklık bağımlı olduğundan özellikle oda sıcaklığı ve 37 °C’deki *in vitro* koşullardaki korelasyon ve promotor aktivitesi denemelerinde stabilite sağlanmıştır. Çalışmamızda *in vitro* koşullarda; Outer core reporter suşu; 37°C’de oda sıcaklığına göre outer core ifadesinin daha fazla gerçekleştiği; O-antijenin ise oda sıcaklığında daha fazla ifade edildiği belirlenmiştir. Ancak; iki reporter suşun büyüme eğrisi incelendiğinde outer core suşunun O-antijene göre daha hızlı büyüdüğü belirtilebilir. Bial et al. (2012) ayrıca *Y. enterocolitica* O:3 doğal suşunun O-antijen yapısının oda sıcaklığında 37 °C’ye göre daha fazla üretildiğini rapor etmişlerdir. Bu rapor, araştırmamız ile uyumluluk göstermektedir. *Lux* operonun alıcı bakteride sürekliliğinin sağlanması için plazmit veya transpozon temelli sistemler kullanılmaktadır (Stewart and Williams, 1992). Ancak *lux* operonun bakteriyel kromozoma entegrasyonu; *in vivo* koşullardaki lokalizasyon ve dokuya bağlanma gibi uzun süreli sinyal gerektiren denemelerde büyük bir avantaj sağlamaktadır ve genoma entegrasyon faj rekombinaz yada homolog rekombinasyon ile gerçekleştirilmektedir. Örneğin; *Listeria monocytogenes* kullanılarak pPL2 plazmidi *Listeria* kromozomunda arginin tRNA bölgesine entegre edilmiştir (Bron et al., 2006). Araştırmamızda, pSW23T suicide klonlama vektörü kullanılarak *luxAB* gen kaseti *Y. enterocolitica* O:3 genomunun outer-core ve O-antijen promotorlarının akış yukarı bölgesine entegre edilirken; *luxCDE* operonu da pKNG101 vektörü kullanılarak, homolog rekombinasyon ile *Y. enterocolitica* O:3 genomunun sıcaklıktan bağımsız bölgesine entegre edilmiştir. Araştırmamıza benzer şekilde, *Lux* operonu ayrıca; *E. coli*, *Citrobacter rodentium*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* gibi birçok bakterinin genomuna başarılı bir şekilde entegre edilmiştir (Demidova et al., 2005; Francis et al., 2000; Mulcahy et al., 2008; Qazi et al., 2001; Wiles et al., 2006). Ayrıca anaerobik bir bakteri olan *Clostridium perfringens* suşunda uygun vektör kullanılarak luminesens sinyalleri gastrointestinal sistem boyunca izlenmiştir (Philips-Jones et al., 1993). Yapılan bir araştırmada GFP ve bakteriyel lusiferaz (*LuxAB*) reporter proteinleri birlikte kullanılarak *Y. enterocolitica* enfeksiyonları izlenmiştir (Sun et al., 2012). Araştırmamızda ise benzer şekilde, *luxCDE* gen kaseti *Y.*

enterocolitica O:3 genomuna entegre edilerek lusiferaz için devamlı bir substrat kaynağı sağlanmıştır. *luxAB* gen kaseti ise O-antijen ve Outer-core promotorlarının akış yukarı bölgesine homolog rekombinasyon ile entegre edilerek *in vivo* ve *in vitro* koşullarda bu promotorların aktivitesini izleme olanağı vermiştir.

In vivo biyolüminesens görüntüleme; deney faresi gibi küçük memeli hayvanlar aracılığı ile ışıma yayan hücrelerin saptanmasına olanak sağlamaktadır. Biyolüminesens görüntüleme ile araştırmacılar viral, parazitik ve bakteriyel patojenlerin enfeksiyon sürecini bir konak canlı içerisinde izlemekte ve enfeksiyon süresince belirli grup deney hayvanını istenilen sürede görüntülemektedir. Bu amaçla, *in vivo* görüntüleme sistemi (IVIS) kullanılmaktadır (Gonzalez et al., 2012). Yapılan bir araştırmada veba etkeni olan *Y. pestis*'in neden olduğu veba lusiferaz reporter sistemi kullanılarak; deney faresine farklı yollardan enjeksiyonu yapılmış ve enfeksiyonun dağılımı 6., 24., 48., 72. ve 96. saat aralıklarında IVIS spektrum ile takip edilmiştir (Gonzalez et al., 2012). Uluczka et al., transkripsiyonel ve translasyonel füzyon reporter sistemi geliştirmişler ve bu sistemi test etmek amacıyla *Y. pseudotuberculosis*'in *yadA* (*yadA_luxCDABE_1x109* bakteri) gibi virülens genlerini enfeksiyon süresince IVIS spektrum sistemi ile izlemişlerdir. Enfeksiyon, IVIS spektrum ile 3 gün boyunca izlenmiştir ve biyolüminesens değeri p/sec/cm²/sr birimi olarak verilmiştir. Enfeksiyonun izlenmesi sonrasında fareler öldürülerek mezenterik lenf nodu, sindirim sistemi, böbrek ve karaciğer dokularının da IVIS spektrum ile biyolüminesens ölçümleri gerçekleştirilmiştir ve böylece endirekt transkripsiyonel ölçüm yapılmıştır (Uliczka et al., 2011). Treck et al.(2010), *Y. enterocolitica* O:9 ve *Y. enterocolitica* O:8 suşlarının genomlarına bölge spesifik entegrasyon ile LuxCDABE operonu entegre etmişlerdir. Gerçekleştirilmiş olan bu çalışmada *Y. enterocolitica* serotiplerinin önemli bir virülens faktörü olan invazinin protomor aktivitesi enfeksiyon süresince IVIS spektrum aracılığı ile izlenmiştir. Invazin promotor aktivitesinin özellikle peyer plaklarında, lenf nodüllerinde, karaciğer ve dalakta gözlemlenmiştir (Trcek et al., 2010). Çalışmamızda, benzer şekilde; *Y. enterocolitica* O:3 serotipi kullanılarak luxCDABE reporter sistemi dizayn edilmiş ve *Y. enterocolitica* suşlarında önemli bir virülens faktörü olan LPS bileşeninin outer-core ve O-antijen kısımlarının promotor aktiviteleri enfeksiyon süresince IVIS spektrum ile 44 adet fare deneye dahil edilmiştir, ancak deney sırasında 4 tanesi yedek tutulmuş ve 3 tanesi (outer core grubu) ise bayıltma işlemleri sırasında yüksek eter

dozundan ex olmuştur. 1. saat, 1.gün ve 5. gün aralıklar ile enfeksiyonun izlenmesi 37 fare ile tamamlanmıştır. Enfeksiyon sonrasında outer core ve o-antijenin özellikle sindirim sisteminde aktif olarak ifadesini gerçekleştirdiği ve özellikle 5. gün sonrasında outer core ve o-antijen reporter suşlarının kemik iliğine kadar yayıldıkları ve ifade edildiği kaydedilmiştir. Aynı zamanda 5. gün enfeksiyon süresince sindirim sisteminin yanı sıra, dalak ve karaciğerde de outer core ve o-antijenin dolaylı mRNA transkripsiyonu gözlemlenmiştir. Biyoluminesens aktivitesi IVIS spektrum ile ölçülmüş ve p/sec/cm²/sr birimi olarak kaydedilmiştir.

Araştırmamızın ikinci amacı kapsamında; *Y. enterocolitica* O:3 suşu kullanılarak dizayn edilmiş olan outer core ve o-antijen reporter suşları ile, LPS bileşeninin patogenezdaki önemi gösterilmiştir. Bu çalışma, Türkiye'deki Ulusal Tez Merkezi veri tabanına göre mikrobiyoloji alanında; patojenik *Yersinia enterocolitica* suşuna ait virülens genlerinin dolaylı mRNA ifadesinin araştırılması üzerine gerçekleştirilmiş ilk araştırmadır ve Türkiye literatürüne büyük bir katkı sağlamaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alexander, C. & Rietschel, E. T.**,2001, Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity, *J Endotoxin Res*, 7: 167-202 pp.
- Aranda, C.M.A., Swanson, J.A., Loomis, W.P. and Miller, S.I.**, 1992, *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes, *PNAS*, 89: 10079-10083 pp.
- Atiqur Rahman, Tania S. Bonny, Siriporn Stonsaovapak & Ananchaipattana, A. C.**,2011, *Yersinia enterocolitica* : Epidemiological Studies and Outbreaks, *J Pathog*, 2011: 1-11pp.
- Atobla K., Karou T.G., Dadie A.T., Niamke L.S. & K.M., D.**,2012, Isolation and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pigs in Abidjan, Côte d'Ivoire, *J Appl Biosci* 50: 3540-3548 pp.
- Aulisio, C. C., Mehlman, I. J. & Sanders, A. C.**,1980, Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods, *Appl Environ Microbiol*, 39: 135-140 pp.
- Autenrieth, I. B., Kempf, V., Sprinz, T., Preger, S. & Schnell, A.**,1996, Defense mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrins and cytokines, *Infect Immun*, 64: 1357-1368 pp.
- Ayyadurai, S., Flaudrops, C., Raoult, D. & Drancourt, M.**,2010, Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, *BMC microbiology*, 10: 285pp.
- Baker, P. M. & Farmer 3rd, J. J.**,1982, New bacteriophage typing system for *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia frederiksenii*, and *Yersinia intermedia*: correlation with serotyping, biotyping, and antibiotic susceptibility, *J Clin Microbiol*, 15: 491-502 pp.
- Beczala, A., Duda, K. A., Skurnik, M. & Holst, O.**,2012, The structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Yersinia enterocolitica* serotype O:50 strain 3229, *Carbohydrate research*, 359: 97-101pp.
- Beczala, A. D., K. A. Skurnik, M. Holst, O.**,2012, The structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Yersinia enterocolitica* serotype O:50 strain 3229, *Carbohydrate research*, 359: 97-101pp.
- Bengoechea, J. A., Zhang, L., Toivanen, P. & Skurnik, M.**,2002, Regulatory network of lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Yersinia enterocolitica* includes cell envelope-dependent signals, *Molecular microbiology*, 44: 1045-1062pp.
- Beutler, B.**,2002, LPS in microbial pathogenesis: promise and fulfilment, *J Endotoxin Res*, 8: 329-335pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bhagat, N. and Viridi, J. S.**,2009, Molecular and biochemical characterization of urease and survival of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A in acidic pH in vitro, *BMC microbiology*, 9 pp.
- Bialas, N., Kasperkiewicz, K., Radziejewska-Lebrecht, J. & Skurnik, M.**,2012, Bacterial Cell Surface Structures in *Yersinia enterocolitica*, *Arch Immunol Ther Ex*, 60: 199-209pp.
- Biasizzo, M. V., S. Micunovic, J. Henigman, U. Kirbis, A.**,2013, Estimation of *Yersinia enterocolitica* prevalence in slaughtered pig tonsils in slovenia by using three cultural isolation procedures, *Slov Vet Res*, 50: 167-172 pp.
- Biedzka-Sarek, M., Salmenlinna, S., Gruber, M., Lupas, A. N., Meri, S. & Skurnik, M.**,2008, Functional Mapping of YadA- and Ail-Mediated Binding of Human Factor H to *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3, *Infection and Immunity*, 76: 5016-5027pp.
- Biedzka-Sarek, M., Venho, R. & Skurnik, M.**,2005, Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3, *Infect Immun*, 73: 2232-2244pp.
- Biomerieux-Diagnostics** <http://www.biomerieux-diagnostics.com/> (Erişim tarihi: 05.06.2015)
- Blasberg, R. G.**,2003, *In vivo* molecular-genetic imaging: multi-modality nuclear and optical combinations, *Nuclear medicine and biology*, 30: 879-888pp.
- Bonardi, S. A., I. Pongolini, S. Morganti, M. Tagliabue, S. Bacci, C. Brindani, F.**,2014, Detection, enumeration and characterization of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in pig tonsils at slaughter in Northern Italy, *Int J Food Microbiol*, 177: 9-15pp.
- Bonardi, S. B., L. Brindani, F. D'incan, M. Barco, L. Carra, E. Pongolini, S.**,2013, Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy, *Int J Food Microbiol*, 163: 248-257pp.
- Bottone, E. J.**,1997, *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues, *Clinical microbiology reviews*, 10: 257-276pp.
- Bron, P. A., Monk, I. R., Corr, S. C., Hill, C. & Gahan, C. G.**,2006, Novel luciferase reporter system for in vitro and organ-specific monitoring of differential gene expression in *Listeria monocytogenes*, *Applied and environmental microbiology*, 72: 2876-2884pp.
- Bulbuloglu, E., Ciralik, H., Kantarceken, B., Cetinkaya, A., Gul, M. & Ezberci, F.**,2010, *Yersinia pseudotuberculosis* colitis presented with severe gastrointestinal bleeding, *The Turkish journal of gastroenterology* :, 21: 179-182ss.
- Campbell-Valois, F. X. & Sansonetti, P. J.**,2014, Tracking bacterial pathogens with genetically-encoded reporters, *FEBS letters*, 588: 2428-2436pp.
- Chaput, C., Spindler, E., Gill, R. T. & Zychlinsky, A.**,2013, O-antigen protects gram-negative bacteria from histone killing, *Plos One*, 8: e71097pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cheyne, B. M., Van Dyke, M. I., Anderson, W. B. & Huck, P. M.,**2009, An evaluation of methods for the isolation of *Yersinia enterocolitica* from surface waters in the Grand River watershed, *Journal of water and health*, 7: 392-403pp.
- Cheyne, B. M. J. H.,** 2008. Detecting pathogenic *Yersinia enterocolitica* in surface water from the Grand River watershed: An evaluation and comparison of methods. M.Sc. Master University of Waterloo.,187pp.
- Contag, C. H. and Bachmann, M. H.,**2002, Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression, *Annual review of biomedical engineering*, 4: 235-260 pp.
- Cotter, P. A. and Miller, J. F.,**1998, In vivo and ex vivo regulation of bacterial virulence gene expression, *Current opinion in microbiology*, 1: 17-26pp.
- Demidova, T. N., Gad, F., Zahra, T., Francis, K. P. and Hamblin, M. R.,**2005, Monitoring photodynamic therapy of localized infections by bioluminescence imaging of genetically engineered bacteria, *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 81: 15-25pp.
- Denis, M., Houard, E., Labbe, A., Fondrevez, M. and Salvat, G.,**2011, A Selective Chromogenic Plate, YECA, for the Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica*: Specificity, Sensitivity, and Capacity to Detect Pathogenic *Y. enterocolitica* from Pig Tonsils, *J Pathog*, 2011: 296-275pp.
- Drummond, N., Murphy, B. P., Ringwood, T., Prentice, M. B., Buckley, J. F. and Fanning, S.,**2012, *Yersinia enterocolitica*: a brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain, *Foodborne pathogens and disease*, 9: 179-189pp.
- Dubois, D., Grare, M., Pree, M.,Segonds, C., Marty, N., Oswald, E.,** 2012, Performances of the Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System for Rapid Identification of Bacteria in Routine Clinical Microbiology, *Journal of Clinical Microbiology*,50: 2568-2576 pp.
- Duerr, C. U., Zenk, S. F., Chassin, C., Pott, J., Gutle, D., Hensel, M. & Hornef, M. W.,**2009, O-antigen delays lipopolysaccharide recognition and impairs antibacterial host defense in murine intestinal epithelial cells, *PLoS pathogens*, 5: e1000567pp.
- Efsa.,**2007, Scientific Opinion of the Panel on BIOHAZ on a request from EFSA on monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp., *EFSA Journal*, 595: 1-30pp.
- Efsa.,**2012, The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010, *EFSA Journal*, 10: 1-442pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- El Qouqa, I. A., El Jarou, M. A., Abu Samaha, A. S., Al Afifi, A. S. and Al Jarousha, A. M. K.**,2011, *Yersinia enterocolitica* infection among children aged less than 12 years: a case-control study, *Int J Infect Dis*, 15: E48-E53 pp.
- Falcao, J. P., Brocchi, M., Proenca-Modena, J. L., Acrani, G. O., Correa, E. F. and Falcao, D. P.**,2004, Virulence characteristics and epidemiology of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia* other than *Y.pseudotuberculosis* and *Y.pestis* isolated from water and sewage, *Applied and environmental microbiology*, 96: 1230-1236 pp.
- Falcao, J. P., Falcao, D. P., Pitondo-Silva, A., Malaspina, A. C. and Brocchi, M.**,2006, Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil, *J Med Microbiol*, 55: 1539-1548pp.
- Özdemir, F.**,2014, Et ve süt ürünlerinden *Yersinia* türlerinin izolasyonu, fenotipik ve genotipik yöntemlerle adlandırılması ve bazı patojenite özelliklerinin belirlenmesi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Doktora tezi, 138 s.
- Fierer, J., Eckmann, L., Fang, F., Pfeifer, C., Finlay, B. B. and Guiney, D.**,1993, Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene spvB in cultured macrophages and nonphagocytic cells, *Infect Immun*, 61: 5231-5236pp.
- Fondrevez, M., Minvielle, B., Labbe, A., Houdayer, C., Rose, N., Esnault, E. and Denis, M.**,2014, Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughter-aged pigs during a one-year survey, 2010-2011, France, *International journal of food microbiology*, 174: 56-62pp.
- Francis, K. P., Joh, D., Bellinger-Kawahara, C., Hawkinson, M. J., Purchio, T. F. and Contag, P. R.**,2000, Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in living mice using a novel luxABCDE construct, *Infect Immun*, 68: 3594-3600 pp.
- Fredriksson-Ahomaa, M.** 2010. In: Alzira Maria Paiva De Almeida & Leal, N.C. (eds.) *Advances in Yersinia Research*. Recife, Brazil: Springer.
- Fredriksson-Ahomaa, M. and Korkeala, H.**,2003, Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem, *Clin Microbiol Rev*, 16: 220-229 pp.
- Gahan, C. G.**, 2012, The bacterial lux reporter system: applications in bacterial localisation studies, *Current gene therapy*, 12: 12-19 pp.
- Ghunaim, H., Behnke, J.M., Aigha, I., Sharma, A., Doiphode, S.H., Deshmukh, A. And Madi, M.M.**, 2015, Analysis of Resistance to Antimicrobials and Presence of Virulence/Stress Response Genes in *Campylobacter* Isolates from Patients with Severe Diarrhoea, *Plos one*, 10:1-16 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gonul, S. A. and Karapinar, M.**,1991, The microbiological quality of drinking water supplies of Izmir City: the incidence of *Yersinia enterocolitica*, *Int J Food Microbiol*, 13: 69-73 pp.
- Gonzalez, R. J., Weening, E. H., Frothingham, R., Sempowski, G. D. and Miller, V. L.**, 2012, Bioluminescence imaging to track bacterial dissemination of *Yersinia pestis* using different routes of infection in mice, *BMC microbiology*, 12: 147pp.
- Goverde, R.L.J., Veld, J.H., Kusters, J.G. and Mooi, F.R.**, 1998, The psychrotrophic bacterium *Yersinia enterocolitica* requires expression of pnp, the gene for polynucleotide phosphorylase, for growth at low temperature (5°C), *Molecular Microbiology*, 28:555-569 pp.
- Gross, S. & Piwnica-Worms, D.**,2005, Monitoring proteasome activity in cellulo and in living animals by bioluminescent imaging: technical considerations for design and use of genetically encoded reporters, *Methods in enzymology*, 399: 512-530 pp.
- Handley, S. A., Dube, P. H., Revell, P. A. and Miller, V. L.**,2004, Characterization of oral *Yersinia enterocolitica* infection in three different strains of inbred mice, *Infect Immun*, 72: 1645-1656 pp.
- Hautefort, I. and Hinton, J. C.**,2000, Measurement of bacterial gene expression in vivo, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 355: 601-611pp.
- Havens, J. M., Montgomery, E., Greenson, J. K., Scott, M. A. and Lamps, L. W.**,2003, Pathogenic *Yersinia enterocolitica* DNA is detected in gastrointestinal malakoplakia, *Lab Invest*, 83: 263a-263a pp.
- Hayashidani, H.,Kanzaki, H., Kaneko, Y., Tomomitsu, A., Taniguchi,T., Kaneko, K. and Ogawa, M.**,2002, Occurrence of Yersiniosis and Listeriosis in wild boars in Japan, *Journal of Wildlife Diseases*, 38: 202-205 pp.
- Hayrettin Akdeniz, H. I., Turan Buzgan, Tahir Seçkinli, ve Demiröz, A. P.**,2001, Van ve Yöresinde *Yersinia enterocolitica* enfeksiyonunun kültür ve serolojik yöntemler ile araştırılması ve Brusellozla ayırıcı tanısındaki önemi *Türk Klin Tıp Bilimleri*, 21: 37-42 ss.
- Heroven, A. K. and Dersch, P.**,2014, Coregulation of host-adapted metabolism and virulence by pathogenic, *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4: 146 pp.
- Hoare, A., Bittner, M., Carter, J., Alvarez, S., Zaldivar, M., Bravo, D., Valvano, M. A. and Contreras, I.**,2006, The outer core lipopolysaccharide of *Salmonella enterica* serovar *typhi* is required for bacterial entry into epithelial cells, *Infect Immun*, 74: 1555-1564 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Imoto, A., Murano, M., Hara, A., Narabayashi, K., Ogura, T., Ishida, K., Abe, Y., Masuda, D., Inoue, T., Tokioka, S., Takii, M., Umegaki, E., Egashira, Y. and Higuchi, K.,**2012, Adult Intussusception Caused by *Yersinia enterocolitica* Enterocolitis, *Internal Med*, 51: 2545-2549 pp.
- Ioannidis, A., Kyratsa, A., Ioannidou, V., Bersimis, S. & Chatzipanagiotou, S.,**2014, Detection of Biofilm Production of *Yersinia enterocolitica* Strains Isolated from Infected Children and Comparative Antimicrobial Susceptibility of Biofilm Versus Planktonic Forms, *Mol Diagn Ther*, 18: 309-314 pp.
- Işeri, L., Apan, T.Z., Aksoy, A., Koç, F., Göçmen, J., Nuristani, D.,**2011, The prevalence of Enterotoxigenic *E. coli* isolated from the stools of children aged 0-10 years with diarrhea in Mid- Anatolia Region, Turkey, *Brazilian Journal of Microbiology*, 42:243-247 pp.
- Ito, T., Suzuki, T., Kawase, J., Fukushima, H. and Nanao, K.,**2012, *Yersinia enterocolitica* bacteremia and enterocolitis in a previously healthy 20-month-old girl, *J Infect Chemother*, 18: 756-759 pp.
- Iyer, M., Sato, M., Johnson, M., Gambhir, S. S. and Wu, L.,**2005, Applications of molecular imaging in cancer gene therapy, *Current gene therapy*, 5: 607-618 pp.
- Johnson, J. L.,**1998, Isolation & identification of pathogenic *Yersinia enterocolitica* from meat and poultry products, *Usda/fsis microbiology laboratory guidebook*, 3rd Edition: 9-28 pp.
- Khaghani, S., Shamsizadeh, A., Nikfar, R. and Hesami, A.,**2014, *Shigella flexneri*: a three-year antimicrobial resistance monitoring of isolates in a Children Hospital, Ahvaz, Iran, *Iranian Journal of Microbiology*, 4: 225:229.
- Ksiel, A.B., Samoraj, A.P., Turek, A.S., Syczylo, K. And Szveda, W.,**2015, The first pathogenic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 strain isolated from a hunted wild boar (*Sus scrofa*) in Poland, *Epidemiology & Infection*, 1-8 pp.
- Lahtinen, P., Brzezinska, A. and Skurnik, M.,**2003, Temperature and growth phase regulate the transcription of the O-antigen gene cluster of *Yersinia enterocolitica* O:3, *Adv Exp Med Biol*, 529: 289-292 pp.
- Langendorf, C., Le Hello, S., Moumouni, A., Gouali, M., Mamaty, A-A, Grais, R.F., Weill, F.X. and Page, A.L.,**2015, Enteric Bacterial Pathogens in Children with Diarrhea in Niger: Diversity and Antimicrobial Resistance, *Plos One*, 10:1-18 pp.
- Lasch, P., M. Drevinek, H. Nattermann, R. Grunow, M. Stammler, R. Dieckmann, And, T. S. and Naumann, D.,**2010, Characterization of *Yersinia* Using MALDI-TOF Mass Spectrometry and Chemometrics, *Anal. Chem.*, 82: 8464-8475 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Laukkanen, R., Hakkinen, M., Lunden, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Johansson, T. and Korkeala, H.,**2010, Evaluation of isolation methods for pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig intestinal content, *Applied and environmental microbiology*, 108: 956-964 pp.
- Laukkanen, R., Martinez, P. O., Siekkinen, K. M., Ranta, J., Maijala, R. and Korkeala, H.,**2009, Contamination of carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 originates from pigs infected on farms, *Foodborne Pathog Dis*, 6: 681-688 pp.
- Leibiger, R., Niedung, K., Geginat, G., Heesemann, J. and Trulzsch, K.,**2008, *Yersinia enterocolitica* Yop mutants as oral live carrier vaccines, *Vaccine*, 26: 6664-6670 pp.
- Liang, J. R., Bi, Z. Q., Shi, G. X., Xiao, Y. C., Qiu, H. Y., Kou, Z. Q., Hu, B., Jing, H. Q. and Wang, X.,**2014, Two novel ail-positive biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica* isolated in China with unequal adhesion and invasion properties, *Infect Genet Evol*, 27: 83-88 pp.
- Liang, Z., Ke, B., Deng, X., Liang, J., Ran, L., He, D., Huang, Q., Ke, C., Li, Z., Yu, H., Klene, J.D. and Wu, S.,** 2015, Serotypes, seasonal trends, and antibiotic resistance of non-typhoidal *Salmonella* from human patients in Guangdong Province, China, 2009–2012, *BMC Microbiology*, 2-9 pp.
- Longenberger, A. H., Gronostaj, M. P., Yee, G. Y., Johnson, L. M., Lando, J. F., Voorhees, R. E., Waller, K., Weltman, A. C., Moll, M., Lyss, S. B., Cadwell, B. L., Gladney, L. M. and Ostroff, S. M.,**2014, *Yersinia enterocolitica* infections associated with improperly pasteurized milk products: southwest Pennsylvania, March-August, 2011, *Epidemiol Infect*, 142: 1640-1650 pp.
- Mahesh Shanker Dhar, J. S. V.,**2014, Strategies used by *Yersinia enterocolitica* to evade killing by the host: thinking beyond Yops, *Microbes and Infection*, 16: 87-95 pp.
- Massey, S., Johnston, K., Mott, T. M., Judy, B. M., Kvitko, B. H., Schweizer, H. P., Estes, D. M. and Torres, A. G.,**2011, *In vivo* Bioluminescence Imaging of *Burkholderia mallei* Respiratory Infection and Treatment in the Mouse Model, *Frontiers in microbiology*, 2: 174 pp.
- Mercanoglu ve Aytaç, S.A.,**2006, Ankara piyasasında satışa sunulan tavuk etlerinde *Yersinia enterocolitica* ve *Escherichia coli* O157 varlığının araştırılması, *Türkiye 9. Gıda Kongresi*. Bolu.
- Mert, M., Kocabay, G., Ozulker, T., Temizel, M., Yanar, H., Uygun, O., Ozulker, F., Arman, Y., Cevizci, E. ve Olek, A. C.,**2011, Liver abscess due to *Yersinia* bacteremia in a well-controlled type I diabetic patient, *Endokrynol Pol*, 62: 357-360 ss.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Messelhauser, U., Kampf, P., Colditz, J., Bauer, H., Schreiner, H., Holler, C. and Busch, U.**,2011, Qualitative and quantitative detection of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in different food matrices at retail level in Bavaria, *Foodborne pathogens and disease*, 8: 39-44pp.
- Mulcahy, H., O'callaghan, J., O'grady, E. P., Macia, M. D., Borrell, N., Gomez, C., Casey, P. G., Hill, C., Adams, C., Gahan, C. G., Oliver, A. and O'gara, F.**,2008, *Pseudomonas aeruginosa* RsmA plays an important role during murine infection by influencing colonization, virulence, persistence, and pulmonary inflammation, *Infect Immun*, 76: 632-638 pp.
- Najdenski, H., Golkocheva, E., Vesselinova, A., Bengoechea, J. A. and Skurnik, M.**,2003, Proper expression of the O-antigen of lipopolysaccharide is essential for the virulence of *Yersinia enterocolitica* O : 8 in experimental oral infection of rabbits, *Fems Immunol Med Mic*, 38: 97-106 pp.
- Nesbakken, T.** 2013. *Yersinia*. Foodborne Infections and Intoxications.
- Neumayer, W., Groll, M., Lehmann, V., Antoneka, U., Kahler, S., Heesemann, J. and Wilharm, G.**,2004, *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycH. Recombinant expression, purification, characterisation, and crystallisation, *Protein Expres Purif*, 35: 237-247pp.
- Özden M, Gürel A, Tartar A, Ulu R ve A, D.**,2012, Resistant *Yersinia enterocolitica* Peritonitis in a Peritoneal Dialysis Patient, *Turk Neph Dial Transpl*, 21 310-312 ss.
- IVIS Series Pre-Clinical In Vivo Imaging Systems** www.perkinelmer.com (Erişim Tarihi: 05.06.2015)
- Portnoy, D. A. and Falkow, S.**,1981, Virulence-Associated Plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*, *J Bacteriol*, 148: 877-883pp.
- Qazi, S. N., Counil, E., Morrissey, J., Rees, C. E., Cockayne, A., Winzer, K., Chan, W. C., Williams, P. and Hill, P. J.**,2001, agr expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome, *Infect Immun*, 69: 7074-7082 pp.
- Rakin, A., Debora Garzetti, Hicham Bouabe and Sprague, L. D.** 2015. *Yersinia enterocolitica*. *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier.
- Reyes, R. E., González, C. R., Jiménez, R. C., Herrera, M. O. and Aquino Andrade, A.** 2012. Mechanisms of O-Antigen Structural Variation of Bacterial Lipopolysaccharide (LPS). In: KARUNARATNE, D. N. (ed.) *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*. Intech.
- Rosner, B. M., Werber, D., Hohle, M. and Stark, K.**,2013, Clinical aspects and self-reported symptoms of sequelae of *Yersinia enterocolitica* infections in a population-based study, Germany 2009-2010, *Bmc Infect Dis*, 13 p.
- Saha, S., Chowdhury, P., Mazumdar, A., Pal, A., Das, P. and Chakrabarti, M. K.**,2009, Role of *Yersinia enterocolitica* heat-stable enterotoxin (Y-STa) on differential regulation of nuclear and cytosolic calcium signaling in rat intestinal epithelial cells, *Cell Biol Toxicol*, 25: 297-308 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sanno, A., Aspan, A., Hestvik, G. and Jacobson, M.,**2014, Presence of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli* O157:H7 in wild boars, *Epidemiol Infect*, 142: 2542-2547pp.
- Schaake, J., Drees, A., Gruning, P., Uliczka, F., Pisano, F., Thiermann, T., Von Altrock, A., Seehusen, F., Valentin-Weigand, P. and Dersch, P.,**2014, Essential role of invasin for colonization and persistence of *Yersinia enterocolitica* in its natural reservoir host, the pig, *Infection and Immunity*, 82: 960-969 pp.
- Schiemann, D. A., Devenish, J. A. and Toma, S.,**1981, Characteristics of virulence in human isolates of *Yersinia enterocolitica*, *Infect Immun*, 32: 400-403 pp.
- Schneeberger, M., Brodard, I., Overesch, G.,** 2015, Virulence-associated gene pattern of porcine and human *Yersinia enterocolitica* biotype 4 isolates, *International journal of Food Microbiology*, 198: 70-74 pp.
- Schubert, S., Bockemuhl, J., Brendler, U. and Heesemann, J.,**2003, First isolation of virulent *Yersinia enterocolitica* O8, biotype 1B in Germany, *Eur J Clin Microbiol*, 22: 66-68 pp.
- Sharifi Yazdi M. K., Soltan-Dallal M. M., Zali M. R., Avadisians S. and R., B.,**2011, Incidence and antibiotic susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* and other *Yersinia* species recovered from meat and chicken in Tehran, Iran, *Afr. J. Microbiol. Res.*, 5: 2649-2653 pp.
- Shaw, J. J., Dane, F., Geiger, D. and Kloepper, J. W.,**1992, Use of bioluminescence for detection of genetically engineered microorganisms released into the environment, *Applied and environmental microbiology*, 58: 267-273 pp.
- Sihvonen, L. M.** 2014. clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* in Finland-identification and epidemiology. PhD Academic Dissertation 91pp.
- Sihvonen, L. M., Hallanvuo, S., Haukka, K., Skurnik, M. and Siitonen, A.,**2011, The ail Gene Is Present in Some *Yersinia enterocolitica* Biotype 1A Strains, *Foodborne pathogens and disease*, 8: 455-457 pp.
- Sihvonen, L. M., Jalkanen, K., Huovinen, E., Toivonen, S., Corander, J., Kuusi, M., Skurnik, M., Siitonen, A. and Haukka, K.,**2012, Clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A represent two phylogenetic lineages with differing pathogenicity-related properties, *BMC microbiology*, 12: 208 pp.
- Silva, ND., Taniwaki, M.H., Junqueira, V.C.A., Silveira, M.F.A., Nascimento, M.S. and Gomes, R.A.R.,**2013, *Yersinia enterocolitica*, microbiological examination methods of food and water, A laboratory manual, Chapter 21, ISBN: 978-0-415-69086-7, 267-275 pp.
- Skurnik, J. C. L., A. M.** 2011. adhesins of human pathogens from the genus *Yersinia*. In: Goldman, D. L. A. A. (ed.) *Bacterial Adhesion*. Springer.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Skurnik, M.**,1984, Lack of Correlation between the Presence of Plasmids and Fimbriae in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, *J Appl Bacteriol*, 56: 355-363 pp.
- Skurnik, M. and Bengoechea, J. A.**,2003, The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersiniae*, *Carbohydrate research*, 338: 2521-2529 pp.
- Skurnik, M. and Toivonen, S.**,2011, Identification of distinct lipopolysaccharide patterns among *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-like bacteria, *Biochemistry. Biokhimiia*, 76: 823-831pp.
- Skurnik, M., Venho, R., Bengoechea, J. A. and Moriyon, I.**,1999, The lipopolysaccharide outer core of *Yersinia enterocolitica* serotype O : 3 is required for virulence and plays a role in outer membrane integrity, *Molecular microbiology*, 31: 1443-1462 pp.
- Skurnik, M., Venho, R., Toivanen, P. and Al-Hendy, A.**,1995, A novel locus of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 involved in lipopolysaccharide outer core biosynthesis, *Mol Microbiol*, 17: 575-594 pp.
- Soderqvist, K., Boqvist, S., Wauters, G., Vagsholm, I. & Thisted-Lambertz, S.**,2012, *Yersinia enterocolitica* in sheep-a high frequency of biotype 1A, *Acta Vet Scand*, 54: 39 p.
- Stephan, R., Cernela, N., Ziegler, D., Pfluger, V., Tonolla, M., Ravasi, D., Fredriksson-Ahomaa, M. and Hachler, H.**,2011, Rapid species specific identification and subtyping of *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF mass spectrometry, *Journal of microbiological methods*, 87: 150-153 pp.
- Steven L. Percival and Williams, D. W.** 2014., Microbiology of waterborne diseases. *Yersinia. Microbiology of Waterborne Diseases*. Elsevier Ltd.
- Stewart, G. S. and Williams, P.**,1992, lux genes and the applications of bacterial bioluminescence, *Journal of general microbiology*, 138: 1289-1300 pp.
- Tamer, A. Ü., Karaboz, İ., Uçar, F., Bursalıoğlu, M., Oğultekin ve R. Ünver,** 1989., *Mikrobiyoloji laboratuvar kılavuzu*, Eskişehir, T.C., Anadolu Üniversitesi Eğ. Sağ. ve Araş. Ça. Vakfı yayınlar.
- Türkiye Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı,** www.tarim.gov.tr (Erişim Tarihi:15.05.2015).
- Tan, L. K., Ooi, P. T. & Thong, K. L.**,2014, Prevalence of *Yersinia enterocolitica* from food and pigs in selected states of Malaysia, *Food Control*, 35: 94-100 pp.
- Thoerner, P., Bin Kingombe, C. I., Bogli-Stuber, K., Bissig-Choisat, B., Wassenaar, T. M., Frey, J. & Jemmi, T.**,2003, PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution, *Applied and environmental microbiology*, 69: 1810-1816 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Trcek, J., Fuchs, T. M. & Trulzsch, K.,**2010, Analysis of *Yersinia enterocolitica* invasin expression in vitro and in vivo using a novel luxCDABE reporter system, *Microbiol-Sgm*, 156: 2734-2745 pp.
- Turhanoglu, M., Gulsun, S., Onur, A., Bilman, F.,** 2012, The frequency of *Escherichia coli* (EPEC, ETEC, EIEC and serotypes) *Shigella*, rotavirus and parasite agents among children with acute gastroenteritis in Southeast Anatolia, Turkey, *African Journal of Microbiology Research*, 6:5020-5024 pp.
- Uliczka, F., Pisano, F., Kochut, A., Opitz, W., Herbst, K., Stolz, T. and Dersch, P.,**2011, Monitoring of Gene Expression in Bacteria during Infections Using an Adaptable Set of Bioluminescent, Fluorescent and Colorigenic Fusion Vectors, *Plos One*, 6 pp.
- Valentin-Weigand, P., Heesemann, J. and Dersch, P.,**2014, Unique virulence properties of *Yersinia enterocolitica* O:3 - An emerging zoonotic pathogen using pigs as preferred reservoir host, *International journal of medical microbiology : IJMM*.
- Van Damme, I., Berkvens, D., Botteldoorn, N., Dierick, K., Wits, J., Pochet, B. & De Zutter, L.,**2013, Evaluation of the ISO 10273:2003 method for the isolation of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig carcasses and minced meat, *Food Microbiol*, 36: 170-175 pp.
- Vanantwerpen, G., Van Damme, I., De Zutter, L. and Houf, K.,**2014, Within-batch prevalence and quantification of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in tonsils of pigs at slaughter, *Vet Microbiol*, 169: 223-227 pp.
- Waage, A. S., Vardund, T., Lund, V. and Kapperud, G.,**1999, Detection of low numbers of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in environmental water and sewage samples by nested polymerase chain reaction, *Applied and environmental microbiology*, 87: 814-821pp.
- Wannet, W. J., Reessink, M., Brunings, H. A. and Maas, H. M.,**2001, Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive duplex PCR assay, *J Clin Microbiol*, 39: 4483-4486 pp.
- Wauters, G., Kandolo, K. and Janssens, M.,**1987, Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*, *Contributions to microbiology and immunology*, 9: 14-21 pp.
- Wesley, I. V., Bhaduri, S. and Bush, E.,**2008, Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in market weight hogs in the United States, *Journal of food protection*, 71: 1162-1168 pp.
- Wiles, S., Pickard, K. M., Peng, K., Macdonald, T. T. and Frankel, G.,**2006, In vivo bioluminescence imaging of the murine pathogen *Citrobacter rodentium*, *Infect Immun*, 74: 5391-5396 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ye, Y. W., Ling, N., Han, Y. J. and Wu, Q. P.**,2014, Detection and prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in refrigerated and frozen dairy products by duplex PCR and dot hybridization targeting the *virF* and *ail* genes, *J Dairy Sci*, 97: 6785-6791 pp.
- Youn, H. and Hong, K. J.**,2012, *In vivo* noninvasive small animal molecular imaging, *Osong public health and research perspectives*, 3: 48-59 pp.
- Yucel, N. ve Ulusoy, H.**,2006, A Turkey survey of hygiene indicator bacteria and *Yersinia enterocolitica* in raw milk and cheese samples, *Food Control*, 17: 383-388 pp.
- Zadernowska ,Wioleta Chajęcka-Wierzchowska andŁaniewska-Trokenheim, Ł.**,2014, *Yersinia enterocolitica*: A Dangerous, But Often Ignored, Foodborne Pathogen, *Food Reviews International*, 30: 53-70 pp.
- Zhang, T. Y., Li, S. Y. and Nuermberger, E. L.**,2012, Autoluminescent *Mycobacterium tuberculosis* for Rapid, Real-Time, Non-Invasive Assessment of Drug and Vaccine Efficacy, *Plos One*, 7 pp.
- Ziegert and Diesterweg**, 1990, The occurrence of *Yersinia enterocolitica* in sewage, *Zentralbl Mikrobiology*, 145:367-375pp.

ÖZGEÇMİŞ

20 Temmuz 1985 yılında Afyonkarahisar’da doğan Elif BOZÇAL, ilk öğrenimini 100.Yıl İlk Öğretim Okulu’nda tamamlamış, 1999 yılında Talatpaşa İlköğretim Okulu’nda Orta eğitimini bitirmiştir. Lise eğitimini İzmir, Emlakbank Süleyman Demirel Lisesi’inde 2002 yılında tamamlamıştır. Aynı yıl girdiği Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünü’nden 2007 yılında mezun olmuştur. 2007 yılında, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır.“Hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının metallo- β -laktamaz aktivitesinin fenotipik ve genotipik yöntemler ile saptanması” adlı yüksek lisans tezi hazırlamıştır.

2009-2015 Yılları arasında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı’nda ve Helsinki Üniversitesi, İmmünobiyoloji Araştırma Programı, *Yersinia* Araştırma Laboratuvarında 15 ay süre ile ziyaretçi doktora öğrencisi olarak doktora eğitimini tamamlamıştır." Türkiye’de patojenik *Yersinia enterocolitica* izolasyonu ve *in vivo* koşullardaki lipopolisakkarit genlerinin ekspresyonu" adlı doktora tezi hazırlamıştır.