



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

KANATLI HAYVAN VE ÜRÜNLERİ KAYNAKLI SALMONELLALARIN
SEROTİPLENDİRİLMESİ VE GENOTİPLENDİRİLMESİ

Zafer ATA

(DOKTORA TEZİ)




Danışman: Prof. Dr. Ayşegül EYİGÖR

Bursa-2016

Bu tez, Kara Kuvvetleri Komutanlığı ve Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığı tarafından UAP(V)-2010/43 numaralı proje ile desteklenmiştir.

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Dr.Zafer ATA tarafından hazırlanan 'Kanatlı Hayvan ve Ürünleri Kaynaklı Salmonellaların Serotiplendirilmeleri ve Genotiplendirilmeleri' konulu Doktora tezi 23/Şubat/2016 günü, 10:00-12:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof.Dr. Ayşegül EYİGÖR	
Üye	Prof.Dr. Tayfun ÇARLI	
Üye	Prof.Dr. Seran TEMELLİ	
Üye	Prof.Dr.Mehmet ÇALICIOĞLU	
Üye	Doç.Dr. Muammer GÖNCÜOĞLU	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nuntarihve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ülgen GÜNAY

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TÜRKÇE ÖZET	IV
İNGİLİZCE ÖZET	V
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	6
Salmonellaların Klasifikasyonu	6
Salmonella Nomenklatürü	7
Etiyoloji	9
Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	9
Üreme İhtiyaçları	10
Koloni Morfolojileri	10
Biyokimyasal Özellikleri	10
Antijenik Yapı	11
Kimyasal ve Fiziksel Ajanlara Duyarlılığı	12
Salmonellozis'in Epidemiyolojisi	13
Konakçıları	13
Dağılım ve İnsidansı	14
Bulaşma	14
Salmonellaların Gıdalarda Bulunuşu	15
Salmonellozis'in Patolojisi	15
Salmonellozis'in Patojenezi	16
Patojenite Adaları	17
Virulans Faktörler	22
Virulans Plazmidler	22
Toksinleri	23
Fimbria	24
Flagella	24
Etken İzolasyon ve İdentifikasyonu	24
Salmonella Saptanmasında Standart Kültür Metodları	25
Besiyerleri	25
Serotip ve Genus Belirlenmesi	26
İmmunolojik Tanı	27
Hızlı Tanı Teknikleri	28
<i>Salmonella</i> Tiplendirme Metotları	28
Fenotipik Metotlar	28
Aglütinasyon Temelli Serotiplendirme	28
Diğer Serotiplendirme Metotları	29
Moleküler Metotlar	30
Pulsed-Field Gel Electrophoresis	30
Flagellar ve LPS Temelli Moleküler Serotiplendirme	30
Genomik Marker Temelli Moleküler Serotiplendirme	30
Tüm Genom Karşılaştırmasına Dayalı Moleküler Tiplendirme	31
Multilocus Sequence Typing	31

Single Nükleotid Polimorfizm ve Tiplendirme	32
Multilocus Variable Analysis	32
High Resolution Melting Analizi	32
GEREÇ ve YÖNTEM	34
Standart Suşlar	34
Salmonella İzolatları	34
Çalışmada Kullanılan Cihazlar	34
Antiserumlar	35
Polivalan Antiserumlar	35
Monovalan Grup Antiserumları	35
Grup Faktör Antiserumları	35
Faktör Antiserumları	35
H Antiserumları	36
Spicer-Edwards Antiserumları	36
Polivalan Antiserumlar	36
Kompleks Antiserumlar	36
Single Factor Antiserumlar	36
Diğer Faktör Antiserumları	36
Konvansiyonel Serotiplendirme	36
İzolatların Otoaglutinasyon Özelliğinin Test Edilmesi	36
Serogruplandırma	37
Aglütinasyon Reaksiyonlarının Değerlendirilmesi	38
Serotiplendirme	38
S. Enteriditis spesifik Real Time PCR için Templeyt Hazırlama	39
S. Enteriditis spesifik Real Time PCR	39
İstatistiksel Analiz	40
Multilocus Sequence Typing DNA İzolasyonu	40
Multilocus Sequence Typing Amaçlı İlk Real-Time PCR	41
Multilocus Sequence Typing Amaçlı İkinci rPCR ve HRM Analizi	42
Multilocus Sequence Typing Amaçlı DNA Dizi Analizi	44
BULGULAR	45
SE-rPCR ve Konvansiyonel Serotiplendirme Bulguları	45
MLST Amaçlı İkinci rPCR Bulguları	48
DNA Dizi Analizi Bulguları	59
HRM Analizi Bulguları	73
MLST Bulguları	78
TARTIŞMA ve SONUÇ	82
EKLER	88
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	88
KAYNAKLAR	91
TEŞEKKÜR	101

ÖZET

Bu çalışmanın ilk hedefi, hayvan ve hayvansal kaynaklı gıdalarda *Salmonella* serotipleri içinde en fazla görülen *S. Enteritidis*'in hızlı saptama imkanı veren, SE-rPCR yöntemi ile konvansiyonel serotiplendirme sonuçlarını karşılaştırarak, laboratuvar hizmetlerinde kullanma potansiyelini değerlendirmektir. İkinci hedefi ise moleküler tiplendirme metodu olan Multilocus Sequence Typing (MLST) yöntemi ile çalışmada kullanılan *Salmonella* izolatlarını tiplendirerek, elde edilen sonuçların literatürde ilk kez denenecek olan MLST sonrası yapılan High Resolution Melting (HRM) analizi sonuçlarıyla karşılaştırmak ve HRM analizinin MLST tiplendirmesinde kullanım olasılığını araştırmaktır.

Çalışmada piliç eti, hindi eti, yumurta ve kanatlı orijinli 58 *Salmonella* izolatı kullanılmıştır. SefB127L ve SefB661R primer çiftlerinin kullanıldığı bir real-time PCR protokolü ilk kez oluşturulmuş ve *S. Enteritidis* spesifik real-time PCR (SE-rPCR) sonuçları konvansiyonel serotiplendirme sonuçları ile karşılaştırıldığında Cohen kappa değeri 0,86 bulunmuştur. Bu sonuç iki test arasında neredeyse mükemmel bir uyum olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada analiz edilen izolatlardan sadece 3 adedinin (izolat no 6, 122 ve 151) MLST veri tabanındaki Sequence Type (ST)'lere %100 benzediği saptanmıştır. Her üç izolatın da ST11'e %100 benzediği tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen izolatların 43 farklı genotipte olduğu belirlenerek, MLST'nin *Salmonella enterica* tiplendirmesinde çözünürlüğünün çok yüksek olduğu saptanmıştır. MLST yönteminin bir parçası olan DNA dizileri, HRM analizi sonucu, 40 adet birbirinden farklı DNA dizisine ayrılmıştır. HRM analizinin DNA dizi analizi ile aynı sonuçları vermesi nedeni ile sadece HRM analizinin yapılması ile farklı çıkan DNA'ların dizilenmesi sonrası, analiz maliyetinin %83 oranında azaltılacağı belirlenmiştir.

SE-rPCR hızlı diagnostik survey ve araştırma çalışmalarında geleneksel serotiplendirme testlerine gereksinimini azaltan, zaman ve maliyet açısından kazanç sağlayan güvenilir bir alternatif metot olarak düşünülmüştür. Buna ek olarak, literatürde ilk kez HRM analizi, MLST ile genotiplendirmede kullanılmış ve HRM kullanımının maliyet düşürücü avantajı ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: *Salmonella* Enteritidis, rPCR, *Salmonella* serotiplendirme, MLST, HRM

SUMMARY

SEROTYPING AND GENOTYPING OF SALMONELLAE OF POULTRY AND POULTRY PRODUCT ORIGIN

The first aim of this study was to identify the serogroup/serotype of the *Salmonella* spp. isolates of animal and animal-derived food origin in our laboratory by conventional serotyping, as well as to perform a *S. Enteritidis*-specific realtime PCR (SE-rPCR), then to determine their performance and evaluate their relevance. The second aim of this study was to genotype the same *Salmonella* isolates by a multilocus sequence typing (MLST), and to compare these results with high resolution melting (HRM) analysis performed after MLST, and to finally determine the usefulness of HRM analysis in MLST.

For this, a total of 58 isolates of chicken meat, turkey meat, egg, and poultry origin was used. SE-rPCR, which was performed for the first time by using *SejB*-gene specific primers, was almost in perfect agreement with conventional serotyping (Cohen's kappa index = 0,86). Only 3 of the 50 isolates (isolate number 6, 122 ve 151) showed 100% similarity to sequence type (ST)11 in the STs in MLST database. All of the isolates used in this study showed 43 different genotypes, where MLST had high resolution in *Salmonella enterica* typing. As a part of the MLST, DNA sequences were classified under 40 different sequences after HRM analysis. Since HRM analysis resulted the same as the DNA sequence analysis, by only sequencing the DNA with different HRM analysis results, the analysis cost would be reduced by 83%.

Results of this study indicate that SE-rPCR is a rapid alternative diagnostic tool to be used in surveillance and research purposes, which would reduce the requirement for agglutination tests performed by specific antisera, thus the time and the cost. Additionally, this study reports the use of HRM analysis in combination with MLST for the first time in literature as an advantageous approach in reducing the overall cost of the test.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, rPCR, *Salmonella* Serotyping, MLST, HRM

GİRİŞ

Salmonellalar hayvanlardan gıda ürünleri aracılığıyla insanlara geçebilen zoonotik bakterilerdir. Bu bakteri genusu tüm dünyada insan sağlığı açısından ve ekonomik yönden önemli iki gıda kökenli bakteriyel infeksiyondan biri olan salmonellozu oluşturur. *Salmonella* genusunda iki tür bulunmaktadır. *S. enterica* türü içinde yer alan 6 alt türden biri olan *S. enterica* subsp. *enterica* hayvan ve insanlarda infeksiyon oluşturan binlerce serovarı içermektedir. Bu serovarların tespiti tüm dünyada olduğu gibi, özellikle ülkemizde Avrupa ülkeleri ile gıda ve hayvan ticareti kapsamında Avrupa Birliği bağlamında bu infeksiyonlardan korunma ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesi için temel teşkil eder. Serotiplendirme *Salmonella* izolatlarının tam karakterizasyonunda ilk ve en önemli basamağı oluşturur. Bu nedenle *Salmonella* izolatlarının serotiplendirilmesi halk sağlığı, gıda hijyeni ve hayvan sağlığı yönlerinden ülkemizde kritik öneme sahiptir (1).

Enterobacteriaceae familyasında bulunan *Salmonella* genusunun tüm üyeleri insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde bulunan patojenik bakterilerdir. *Salmonella* genusunda iki tür bulunur. Bunlar *Salmonella enterica* (*S. enterica*) ve *Salmonella bongori* (*S. bongori*)'dir. *S. enterica* 6 adet alt türe sahiptir. Alt türlerden klinik öneme sahip olan *S. enterica* subsp. *enterica* insanlarda tifo, kanatlılarda kanatlı tifosu gibi önemli sistemik hastalık etkenlerini içerir (1).

Salmonella türleri insanlarda ve hayvanlarda genellikle gastrointestinal bir infeksiyona ek olarak ishal ve düşünlük gibi semptomlarla karakterize hastalık durumlarına neden olur. Ancak bu durumun bazı istisnaları görülür. Konakçılarına özgü olan ve başka türlerde hastalık oluşturmeyen bazı serotipler, örneğin, insanlarda tifo, kanatlılarda kanatlı tifosu ve koyunlarda abortus etkeni olan sırasıyla *S. Typhi*, *S. Gallinarum* ve *S. Abortus Ovis* istisna bir durum oluşturarak, sistemik hastalık tablolarına neden olurlar. Tifo infeksiyonunda sadece insanlar taşıyıcıdır ve infekte bireyler asemptomatik taşıyıcı konumundadırlar. Bundan dolayı sadece insan teması veya dışkı ile kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu infeksiyon için bulaş meydana gelebilir. Tavuklar için kanatlı tifosu ve pullorum hastalığında da durum aynıdır. Diğer *S. enterica* subsp. *enterica* serovarları veya serotipleri evcil ve yabani hayvanlarda bulunabilir ve insanlara genellikle kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu bulaşır (1-4).

2004 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC)'nin Gıda Kaynaklı Hastalıklar Aktif Tarama Ağının (foodnet) Yeni Ortaya Çıkan Enfeksiyonlar Programı (Emerging Infections Program) 10 farklı eyalette gıda kaynaklı hastalık durumlarına bağlı olarak 6.464 *S. enterica* subsp. *enterica* izolatu bildirmiştir (5). Yine CDC' den alınan 2003 yılına ait raporda tüm ülkede halk sağlığı laboratuvarlarında kaydedilen 33.589 *Salmonella* izolatu olduğu belirtilmiştir (6). Bu ve benzeri veriler incelendiğinde, ABD'de her yıl 1.3 milyon insanın salmonellozis vakası olduğu ve 15.000 vakanın hospitalize edildiği ve 400'ünün ölüm ile sonlandığı belirlenmiştir. Bu durum *Salmonella* enfeksiyonlarının ne derece önemli ekonomik bir kayıba neden olduğunu ve halk sağlığı açısından oldukça önemli olduğunu ortaya koymaktadır. İnsanlardaki bu tablonun yanı sıra *Salmonella* enfeksiyonlarının hayvan sağlığı kapsamında verdiği ekonomik kayıplar ve önlenmesi ile ilgili yapılan biyogüvenlik kavramı içindeki uygulama giderleri bu bakteriyel enfeksiyonu çok daha önemli hale getirmektedir. Kanatlı damızlık hayvanların *Salmonella* arı olmaları şartı devlet tarafından yönetmeliklerle belirlenmiş durumda oluşu bu duruma iyi bir örnek teşkil etmektedir (7).

Serovarların tespiti, tüm dünyada gıda ve hayvan ticareti kapsamında, *Salmonella* enfeksiyonlarından korunma ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesi için temel oluşturur (8). Serovarların belirlenmesi, uluslararası epidemiyolojik araştırmalarda geniş biçimde kullanılır. Ancak, bu amaç için kullanılan serotiplendirmenin düşük verimli ve yüksek masraflı olması; yorumlanmasının subjektif olması, konusunda uzman personele gereksinim duyulması ve immunize edilen tavşanlardan üretilen çok fazla antikora ihtiyaç göstermesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (9, 10). Serotiplendirmenin hassas bir biçimde izolatları fingerprinting (DNA [Deoksiribonükleik asit] parmak izi) etme kapasitesi bulunmamasına rağmen sörveyans programlarında faydalı olarak kullanılmaktadır (11). İnsanlardaki *Salmonella* enfeksiyonlarının sıklığını minimum düzeye indirmenin birincil şartı hayvanlardaki bu enfeksiyonları en aza indirmektir. Bu bağlamda, hayvanlarda *Salmonella* enfeksiyonlarının düzeyinin ve tipinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu enfeksiyonların tanısı amacıyla birçok serolojik, genetik tabanlı yöntemler geliştirildiyse de, teşhiste gold standard yöntem kültür yöntemidir. Genellikle hayvanlarda ve insanlardaki anti-*Salmonella* antikörlerini arayan testler ve Polymerase Chain Reaction (PCR) hızlılıkları açısından talep görmekte, kültür yöntemini tamamlayıcı nitelik taşımaktadırlar.

Kültür sonucu izole edilen *Salmonella*'nın fenotipik biyokimyasal identifikasyonundan sonra tam karakterizasyonu gerek insan ve gerekse hayvan hekimliği açısından bu enfeksiyonlardan korunma ve izlemede epidemiyolojik önem taşır. *Salmonella*'nın tam identifikasyonunun temeli antijenik yapısının belirlenmesi ile atılır. Günümüzde *Salmonella enterica* subsp. *enterica* izolatlarının tiplendirilmesindeki en temel yöntem O (yüzey polisakkarid) ve H (flagellar) antijenik özelliklerini temel alarak izolatları ayırt etmektir. O antijeninin tiplendirilmesi serogrubu belirleme, flagellaların tiplendirilmesi ise serotip belirleme anlamına gelir. Vi veya kapsüler antijen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotip Typhi'ye özgüdür. Günümüzde serogrupsu ile 150'ye fazla grup saptanmıştır. H antijenlerinin karakterizasyonu ile yapılan serotiplendirme işlemi ile 2500'ün üzerinde serotip veya serovar mevcut olduğu bilinmektedir (6,12). Bu serotiplerden 1531 adedi *Salmonella enterica* subsp. *enterica*'ya aittir (13). Bu alt türde insanlarda tifo, kanatlılarda kanatlı tifosu gibi önemli sistemik hastalık etkenleri bulunur (1, 13). *S. enterica*'nın diğer alt türleri ve *S. bongori*'de bulunan serovar sayısı 1000'in üzerinde olup genellikle doğadan veya reptiller gibi soğukkanlı hayvanlardan izole edilir ve klinik açıdan önemli değildir (12, 13). Tipik olarak bir serotipin adı ve antijenik bir formülü mevcuttur. Bu formülde hem serogrup hem de serotip ifade edilir. Bir *Salmonella* izolatının identifikasyonu amacıyla en azından 3 antijen-antikor reaksiyonu ile aglutinasyon testine gereksinim vardır. Bazı izolatların tam ve doğru tiplendirilmesi için başka testler de uygulanır. Antijenik formüllerin oluşturulması için Kaufmann-White Le Minor Şeması kullanılır ve bu şema her yıl Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından güncellenir (12, 14). Yaygın kullanımına rağmen serotiplendirmenin bazı sınırlayıcı yönleri bulunmaktadır. Genellikle sonuca ulaşmak için en az 3 gün gereklidir. Bu yöntem ile izolatların %5-8'i kısmen tiplendirilir veya hiç tiplendirilemeyebilir. Serotiplendirmede yaşanan sorunların nedenleri mukoid koloni veya değişik O antiserumlarıyla kros reaksiyon verebilen 'rough' koloni oluşturan izolatlardaki yüzey polisakkaritlerine ulaşmayı engelleyen faktörler olabilir. Bu tip izolatlar H antijenleri yönünden kısmi olarak tiplendirilebilirler. H antijen tiplendirmesi ile her iki flagella fazı belirlenmelidir. Ancak bir kerede bir antijenik faz saptanabilir. *S. Gallinarum* gibi non-motil suşlar sadece O antijenleri yönünden kısmi bir şekilde tiplendirilebilir. Serotiplendirme ile ilgili başka problemler de görülebilmektedir. İzolatın çok fazla sayıda pasajı antijenik özelliklerini etkileyebilir. İdentifikasyonun gecikmesi hastalık salgınının zamanında belirlenememesine ve dolayısıyla epidemiyolojik sorveyin aksamasına yol açabilir (12).

Klasik serotiplendirme ile yaşanan bu tip sorunlar nedeniyle PCR -tabanlı serotiplendirme (15, 16) ve microarray-tabanlı serotiplendirme (17, 18, 19) gibi destekleyici yöntemler geliştirilmektedir. Serotiplemenin yanı sıra, bazı durumlarda direkt genotiplendirme ile suşların ayrımı ve yakınlık/uzaklıklarının tespiti de epidemiyolojik yönden önemli veriler sağlayabilir. Bu genotiplendirme yöntemleri arasında, ribotiplendirme (20), ribozomal DNA intergenik spacer amplification (21), DNA polimorfizminin random amplifikasyonu (22), IS200 analizi (23, 24), PCR-single strand conformation polimorfizm analizi (25), amplified fragment length polimorfizm (26), dizi analizi (27) yer alır. Multilocus sequence typing (MLST) ile 7 farklı house-keeping gen dizisi çift yönlü okunmakta, elde edilen diziler her bir gen için MLST veri bankasında mevcut allel tipleriyle karşılaştırılarak 7 farklı gen için 7 farklı allel tipinden oluşan profil elde edilmekte, böylelikle suş tipinin belirlenmesi ve ayrımı yapılmaktadır (26). Son yıllarda yapılan çalışmalar *Salmonella* spp. genotiplendirmesinde High Resolution Melting (HRM) analizinin dizi analizi kadar hassas sonuçlar verebildiğini göstermiştir (24). HRM analizi ile dizi analizi için gerekli maliyet ve sürenin önemli derecede azaltılması mümkündür (5, 28). HRM analizi, DNA çoğalmasının eş zamanlı izlenebildiği real-time PCR (rPCR) ile HRM boyalarının kombine edilmesi ile birlikte ortaya çıkmıştır. RPCR sonrası 5-10 dk'lık bir süreçte tamamlanabilen HRM analizi ile farklı DNA dizilimlerinin farklı HRM profilleri vermesi temeline dayanarak, analiz edilen yüzlerce DNA dizisi çok kısa bir sürede, hassas bir şekilde ayırt edilebilmekte ve gruplandırılabilir. HRM analizi mikrobiyel çeşitlilik çalışmalarında yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (29-30). Genetik metodların yanı sıra diğer bazı laboratuvarların *Salmonella* tiplendirilmesinde, protein-arrayler veya kütle spektrofotometri gibi protein-temelli yöntemlere de başvurduğu gözlenmektedir (17). Bu yöntemlerin uygulanmasında özellikle ekonomik olumsuzluklar, laboratuvarlar arası yaşanan sonuç farklılıkları (reproducibility) ve eğitilmiş teknik eleman gereksiniminden kaynaklanan sorunlar gibi durumlarla karşılaşılabilir. Ancak klasik serotiplendirme temel olup, bunun yanında her laboratuvar kendine özgü gereksinimleri doğrultusunda farklı yöntem veya yöntemleri ek ve veya tamamlayıcı olarak kullanmaktadır.

Bu çalışmanın iki temel amacı bulunmaktadır. Bunlardan birincisi; hayvan ve hayvansal kaynaklı gıdalardan elde edilen *Salmonella* spp. izolatları içinde insan ve hayvan hekimliğinde majör öneme sahip *S. Enteritidis*' in ilk kez tasarlanan, *S. Enteritidis* spesifik real-time PCR (SE-rPCR) yöntemi ile tiplendirilmesi yapılarak, elde edilen sonuçların

konvansiyonel serogruplandırma/serotiplendirme sonuçları ile karşılaştırmaktır. İkinci amacı ise aynı *Salmonella* izolatlarını MLST ile tiplendirilmesini yaparak, elde edilen sonuçların literatürde ilk kez test edilen MLST sonrası HRM analizi bulgularının MLST tiplendirilmesinde zamana ve masraflara hız ve ekonomi yönünden bir etkisinin bulunup bulunmadığının araştırılmasıdır. Ayrıca MLST bulguları ile konvansiyonel serotiplendirme bulguları karşılaştırılarak *Salmonella* tiplendirilmesinde bu iki sonucun korelasyonu ile ilgili yeni bilgiler edinilecektir.

GENEL BİLGİLER

2000-2010 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı laboratuvarında izole edilen *Salmonella* spp. izolatlarının moleküler ve konvansiyonel serotiplendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen ‘Hayvan ve hayvansal gıda kaynaklı salmonellaların serotiplendirilmesi ve *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis'in PCR ile tespiti’ adlı araştırmaya ait genel bilgiler aşağıda sunulmuştur.

Salmonellaların Klasifikasyonu

Salmonella ABD’li mikrobiyolog D. E. Salmon tarafından isimlendirildikten sonra tüm türleri tek bir genus adı altında toplanmıştır. Salmonellalar, lipopolisakkarid yapısında somatik (O) antijenine ve protein yapısında olan flagellar (H) antijenine sahiptirler. *S. Typhi* aynı zamanda virulens (Vi) veya kapsüller bir antijene sahiptir. Biyokimyasal olarak genellikle tümünde laktoz ve sükroz negatifdir (31). Salmonellalara ait olan özellikler Tablo-1’de verilmiştir.

Salmonella cinsi bakteriler ilk kez 1884’de Gaffky (*Bacterium typhosum*) tarafından izole edilmiş ve 1886’da Salmon ve Smith’in (*Salmonella Choleraesuis*) bu bakterileri bildirmesinden sonra *Salmonella* nomenklatürü oldukça karmaşık ve tartışmalı bir mesele haline almıştır. Kauffman White şemasına göre 2579 serovarı bulunmaktadır (13). 1983 öncesinde üç türü bulunduğu kabul edilmekte olan Salmonellalar: *S. Choleraesuis*, *S. Typhi* serotipinin ait olduğu *S. Enteritidis* serotipi altında sınıflandırılmaktaydı. Günümüzde *Arizona*, *Salmonella* altgrupları ve bütün önceki türler aynı tür olarak düşünülmektedir ve altı farklı altgrupun bulunduğu yedi bölüme ayrılır. Eskiden altgrup V olarak bilinen *S. bongori*’nin, DNA–DNA hibridizasyon yöntemi ile farklı bir tür olduğu kabul edilmiştir (32). Bu nedenle *S. enterica* altı alttüre ayrılmakla birlikte artık *Salmonella*’nın iki türü bulunmaktadır (Tablo-2). *Salmonella* türlerinin ve alttürlerinin farklı özellikleri Tablo-3’de verilmiştir (31).

Tablo-1. Salmonellaların kültürel ve biyokimyasal özellikleri (31)

Salmonella	Kia	Gaz	H ₂ S	Mr	Vp	İnd	Sit	Pad	Üre	Har	Lys	Arj	Orn	Onpg
Cins:	Alk/													
Salmonella	A	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+/-	+	-
Kia, Kligler's iron agar; H ₂ S, hidrojen sülfür; mr, metil red; vp, voges preskauer; ind, indol; sit, sitrat; pad, fenilalenindeaminaz; üre, üreaz; har, hareket; lys, lisin; arj, arjinin; orn, ornitin; onpg, ortho-nitrofenil-β-D-galactopyranoside														

Tablo-2. *Salmonella* türlerinin ve alttürlerinin klasifikasyonu (31)

Salmonella enterica

- S. enterica* subsp. *enterica* (I)
- S. enterica* subsp. *salamae* (II)
- S. enterica* subsp. *arizonae* (III)
- S. enterica* subsp. *diarizonae* (IV)
- S. enterica* subsp. *houtenae* (V)
- S. enterica* subsp. *indica* (VI)

Salmonella bongori (eskiden alttür V olarak bilinirdi)

Salmonellaların iki türü bulunmaktadır : Altı alttüre sahip *S. enterica* ve *S. bongori*

***Salmonella* Nomenklatürü**

1966 yılı başlarında WHO sadece alttür I'deki serotipleri adlandırmaya başlamıştır ve diğer tüm alttürlerdeki serotip adlarından vazgeçmiştir. CDC bu pratiği uygulamış ve alttür I' deki serotip isimlerini, 1966' dan sonra tanımlanmış alttür II, IV, V ve *S. bongori*'nin adlandırılmamış serotipleri için antijenik formüllerini kullanmıştır.

Tablo-3. *Salmonella* türleri ve alttürlerinin ayırıcı özellikleri (31)

Türler	<i>S. Enterica</i>						<i>S. Bongori</i>
Alt türler	I <i>Enterica</i>	II <i>Salamae</i>	III A <i>Arizonae</i>	III B <i>Diarizonae</i>	IV <i>Houtenae</i>	V <i>Indica</i>	
Biyokimyasal özellikleri							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2sa)	-	-	+	+	-	d	+
Malonat	-	+	+	+	-	-	-
Jelatinaz	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	-/+	-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+
D-Tartrate	+	-	-	-	-	-	-
Galakturoneyt	-	+	-	+	+	+	+
β -Glukoronidaz (MUG)	D	D	-	+	-	D	-
Mukat	+	+	+	-(%70)	-	+	+
Salisin	-	-	-	-	+	-	-
Laktoz	-	-	-(%75)	+(%75)	-	D	-
(+) : %90 veya çoğu izolatta pozitif; (-) : %90 veya çoğu izolatta negatif; D : farklı izolatlar tarafından farklı reaksiyon							

Serotip yazılımlarında izlenen yol şu şekilde belirlenmiştir: İlk olarak bir serotipin cins ismi daha sonra serotip kelimesinin kısaltılmış hali olan “ser” yazılır. Bundan sonra serotip adı yazılır (*Salmonella* serotip veya ser Typhimurium veya *S. Typhimurium*) (Tablo-4) (31).

İnsan ve hayvanlardan izole edilen salmonellaların birçoğu *S. enterica* subsp. *enterica* (I) alt grubuna dahil olup bu grup bir serovar veya serotip içermektedir. Genellikle, ilk izole edildikleri şehrin ya da ilk izole edildikleri canlı türünün adını alırlar. Örneğin *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin, ya da *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum denildiğinde Dublin serovarı ilk kez Dublin’de, *Typhi* serovarı tifoid ateş belirtisiyle seyreden bir hastalıktan ve Gallinarum serovarı ise tavuktan izole edildikleri

Tablo-4. CDC’de kullanılan *Salmonella* Nomenklatürü (33)

Taksonomik durum	Güncel Nomenklatür
Cins (İtalik)	<i>Salmonella</i>
Tür (İtalik).....	<ul style="list-style-type: none">• <i>enterica</i> (I, II, IIIa, IIIb, IV ve VI)• <i>bongori</i> (önceleri alttür V olarak bilinirdi)
Serotip (İlk harf büyük , italik değil)	<ul style="list-style-type: none">• Serotip metinde ilk kez kullanıldığında; serotip adı ‘serotip’ya da ‘ser.’ kısaltmasından sonra yazılır.• Alttür I’e ait serotipler adları ile; alttür II, III, IV, VI ve <i>S. bongori</i>’ye ait serotipler antijenik formülleri ile tanımlanır.(Örnek, <i>Salmonella</i> serotip (ser.) Typhimurium, <i>Salmonella</i> II 50:b:z₆, <i>Salmonella</i> IIIb 60:k:z)• Alttür II, IV, VI ve <i>S. bongori</i>’ye ait serotiplerden 1966’dan önce adlandırılanlar varsa adları da yazılır. (Örnek, <i>Salmonella</i> ser. Marina (IV 48:g:z₅₁:).)

için bu şekilde isimlendirilmişlerdir. Ancak çoğu kitap ve yayında bunlar kısaca *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Gallinarum diye adlandırılırlar ve tür isimleri de serotipi belirtmek için büyük harfle yazılır (34).

Etiyoloji

Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Salmonellalar *Enterobacteriaceae* familyasının bir üyesi olup (35) Gram negatif boyanan, sporsuz, kapsülsüz çomakçıklardır (36). Boyutları 0.7–1.5x2.0–5.0 µm’dir (34-37). Paratifoid suşların çoğu peritrik flagellaları vasıtasıyla hareketli olmasına karşın, (35) Pullorum hastalığının etkeni *S. Pullorum* ve tavuk tifosunun etkeni *S. Gallinarum* hareketsizdir (38-39). *Salmonellalar* Gram negatif olmalarına rağmen metilen mavisi ve karbol fuksin boyaları ile boyanabilirler (37).

Üreme İhtiyaçları

Salmonellalar fakültatif anaerobiktirler ve hem anaerobik hem de aerobik koşullar altında iyi üreme özelliğine sahiptirler. Üremeleri için gerekli olan optimum sıcaklık 37°C olup, üreme aralığı 5–45°C arasında değişir. Salmonellalar pH 4–9.0 aralığında üreyebilmelerine rağmen optimum üreme pH' ları 7.0'dır. Uygun olmayan pH koşullarında salmonellalar flagella ve fimbriya gibi bazı özelliklerini kaybederler. Salmonellaların besin ihtiyaçları oldukça basittir ve üremelerini destekleyen karbon ve nitrojen ihtiva eden çoğu besiyerinde üreyebilirler (37). *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* nutrient agar veya buyyonda kolayca ürer. Bu organizmalar selektif zenginleştirme besiyeri olan Selenite-F ve Tetrathionat buyyonda diferensiyel besiyeri olan Brilliant Green, Bismuth Sülfite ve MacConkey agarda üreyebilirler (40-41).

Tetrathionat buyyon, içerdiği pepton ve safra gibi maddelerle salmonellaların üremesini sağlarken, yine içerdiği kalsiyum karbonat, sodyum tiyosülfat, iyot ve potasyum iyodür ile özellikle dışkıda bulunan *Escherichia coli*' lerin üremesini inhibe eder (34).

Koloni Morfolojileri

Salmonella kolonileri agarda tipik olarak yaklaşık 2–4 mm çapında, küçük, yuvarlak, S-tipli ve parlak özellik gösterirler (34-37). *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum*' un kolonileri bu özelliklere ek olarak nutrient agar üzerinde mavi-gri ile grimsi-beyaz renkte, homojen, 3–4 mm veya daha büyük çapa sahiptirler (41).

Biyokimyasal Özellikleri

Tipik paratifo etkeni olan salmonellalar mannitol, maltoz, dulsitolu fermente ederken, glikozdan hem asit hem de gaz oluştururlar. Malonat, sükroz, salisin ve laktozu ise fermente edemezler. H₂S, lizin ve ornitin dekarboksilat pozitif olup, nitratı nitrite indirgerler ve sitratı kullanırlar. Paratifo etkeni olan salmonellalar üreyi ve jelatini hidrolize edemez ve indol negatif(42) olup, Metil-Red pozitif ve Voges-Proskauer negatiftir (35). *S. Gallinarum*' un dulsitolü fermente etmesine karşılık *S. Pullorum*' un fermente edememesi bu iki mikroorganizma arasındaki en önemli biyokimyasal farklılıktır.

Aynı zamanda *S. Pullorum*, genellikle, maltozu da fermente edemez. Bu mikroorganizmalar arasındaki en büyük fark *S. Pullorum*'un ornitini hızlı bir şekilde dekarboksile etmesine karşılık, *S. Gallinarum*'un dekarboksile edememesidir. Bu biyokimyasal farklılıkları nedeniyle bu iki suş birbirinin biovaryantı olarak tanımlanmaktadır (41).

Antijenik Yapı

Salmonellalarda önem taşıyan dominant üç çeşit antijen bulunmaktadır. Bunlar; somatik "O" antijenleri, flagellar "H" antijenleri ve yüzey antijenlerdir. Salmonellalar O antijenleri ile gruplara, H antijenleriyle de serovarlara ayrılır. O somatik antijenleri, bakterilerin hücre duvarındaki lipopolisakkarit katmanın polisakkarit biriminden ibarettir. Sıcaklık uygulamasına, alkole (%96'luk alkole 4 saat) ve asite dirençlidirler. Formol etkisi ile aktiviteleri kaybolur veya çok azalır. Hareketli olsun veya olmasın tüm salmonellalarda en az bir, çoğu kez birden çok sayıda O antijeni bulunur. *Salmonella* cinsi bakterilerde saptanmış 60'dan çok ve değişik yapıda O antijenik grup vardır. Salmonellalardaki O antijenlerinin bazıları *Escherichia*, *Citrobacter*, *Shigella* ve *Proteus* spp. gibi başka bakterilerde de bulunabilir (36).

Somatik "O" antijenik yapısı, salmonellaların 60'dan fazla serogruba ayrılmasına neden olan değişik faktörler içermektedir. Bu faktörler; 1, 2, 3, 4, 5, gibi sayılarla ifade edilmekte ve ortak antijenik faktörleri içeren salmonellalar aynı grup içerisinde toplanarak grup adları alfabetik harflerle (A, B,Z) isimlendirilmektedir. Şimdiye kadar 67 grup ortaya konulmuş olup harfler yeterli gelmediğinden sonraki gruplar harf + rakamla belirtilmiştir. Örneğin "O" somatik antijenin 9 ve 12 faktörlerini ortak içeren *S. Typhi*, *S. Enteritidis*, *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* bu gruplandırmada D1 serogrubunda yer almışlardır (34).

"H" flagellar antijenleri protein yapısındadır. 60°C'nin üzerinde ısıtılmakla, alkol, asit ve proteolitik enzimlerin etkisi ile yıkımlanırlar. Formole dirençlidirler. "H" antijenleri birbirlerinden ayrı yapı ve karakterde değişik komponentlerden oluşurlar. Bu antijenlerin bir kısmı salmonellalar için özgündür ve değişmez. Bunlara spesifik faz veya Faz: 1 antijenleri adı verilir (36). Bu antijenik faktörler a, b, c'den,z'ye kadar küçük harflerle ve alfabe harfleri yeterli olmadığından z₁, z₂,..... olarak adlandırılmışlardır

(34). H antijenlerinden diğeri bir kısmını ise kültürlerde üreme esnasında değişerek yerlerine yeni yapıda antijenler belirir. Bu tür antijenler birçok *Salmonella*'da rastlanabildiklerinden bunlara non-spesifik veya Faz-2 antijenleri adı verilir. Bunlar sayılarla (1, 2, 3,) ve bazen harflerle gösterilirler (n, x gibi antijenler hem birinci hem de ikinci safhada bulunurlar) (36). Salmonellaların "H" antijen grubundan sadece bir çeşit Faz antijen faktörünü içerenler monofazik; hem Faz-1 ve hem de Faz-2 antijenlerini birlikte taşıyanlar ise difazik bakteriler olarak adlandırılırlar (34).

Salmonellalarda bulunan "Vi" antijeni, somatik O antijeninin en dışında glikolipid yapısında yüzeysel bir antijendir. Tüm salmonellalarda bulunmaz. Bulunması halinde bakterilerin anti-O bağışık serumları ile aglütinasyonu önlenir. 60 °C'de bir saat ısıtılan bakterilerden ayrılarak etkinliğini kaybeder. Salmonellaların yüzeysel antijenlerinden polisakkarit yapıda olan M antijeni nadir olarak, mukoid koloni oluşturan *S. Schottmuelleri* kökenlerinde görülebilir. Bu "O" antijenini maskeleyerek aglütinasyonunu önler (36).

Pilus antijenleri (özellikle "Tip-1 Fimbria" antijenleri) bazı *Salmonella* türlerinde bulunmaktadır (34). Salmonellalardaki yüzeysel fimbriya antijenlerinin önemi, bu antijenlere karşı antikor içeren aglütinan serumlarla, bakterilerin aglütine olmaları, bu suretle O, H ve Vi antijenlerinin araştırılmasını engellemeleri yönündedir (36).

İzole edilen salmonellaların serotiplendirilmesi bulundukları O ve H antijenlerinin belirlenmesi ile olur (37). İdentifikasyonda öncelikle "O" grubu antiserumların karışımı kabul edilen *Salmonella* polivalan antiserumu ile yapılan aglütinasyon testinde pozitif sonuç elde edilir ise, incelenen etkenin *Salmonella* spp. olduğu kabul edilip, daha sonra "O" spesifik grup antiserumları (A, B, C, D,.....) ile bu etken tekrar aglütinasyona tabi tutulur. Hareketli *Salmonella* etkenlerinde, bu testlere ilaveten Faz-1 ve Faz-2'ye ait antiserumlar da kullanılarak izole edilen etken serotip düzeyinde identifiye edilir (34).

Kimyasal ve Fiziksel Ajanlara Duyarlılığı

Genel olarak, *S. Pullorum*, *S. Gallinarum* ve paratifoid etkenlerin dış etkenlere karşı duyarlılıkları aynıdır. Salmonellalar uygun çevre koşullarında birkaç yıl canlılıklarını sürdürürler, ancak *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* uygun olmayan çevre koşullarına, kimyasallara ve sıcaklığa paratifo etkenlerine göre daha az dayanıklıdır. Örnek olarak *S.*

Gallinarum 60°C de 10 dakikada, direkt güneş ışığına maruz kalması durumunda birkaç dk, 1:1000'lik fenol'de, %1'lik potasyum permanganatta 3 dk ve %2'lik formalinde 1 dk içerisinde canlılığını yitirir (41).

Agarda üreyen *S. Gallinarum* kültürleri çok hızlı bir şekilde virülansını kaybedebilir. *S. Gallinarum* tavukların dışkılarında kapalı kümeslerde, 10 gün; açık kümeslerde ise 2 günden daha kısa süre canlı kalabilmektedir (41). Bu bakteriler dış etkenlere karşı oldukça dayanıklı olmaları nedeniyle, kanatlı işletmelerinde sürekli tekrarlayan *Salmonella* varlığı durumlarında ortamın su aktivitesinin belirlenmesi önem arz etmektedir (43). Bunlara ek olarak hem *S. Enteritidis* hem de *S. Typhimurium*'un havada birkaç saat canlı kaldığı da bildirilmiştir (44).

Salmonellozis'in Epidemiyolojisi

Konakçıları

S. Pullorum ve *S. Gallinarum*'un doğal konakçıları tavuklardır. Tavuklardan başka hindilerde, bıldırcınlarda, güvercin, serçe ve papağanlarda da bu hastalıklar görülmektedir (40-45). Ayrıca *Pullorum* infeksiyonlarının kanaryalarda, kanatlı tifosunun da devekuşlarında görüldüğü bildirilmiştir. Ördeklerin bu patojenlere karşı dirençli olduğu ortaya konulmuştur (46-47).

Konakçı spesifik serovarların (*S. Pullorum*, *S. Gallinarum*) tersine, konakçı spesifik olmayanların (paratifoid serovarların) epidemiyolojileri komplekstir. Bu nedenle de konak canlıda konakçı spesifik olmayan serovarlar hiçbir hastalık belirtisi göstermeksizin çok sayıda mikroorganizmanın sindirim kanalı vasıtasıyla çevreye yayılmasına yol açabilirler. Kanatlılar için temel ve öncelikli bulaşma kaynakları kendileri, yem ve çevre olup, diğer bazı infeksiyon kaynakları da belirlenmiştir (35).

Kanatlılarda paratifo infeksiyonuna neden olan serotipler, aynı zamanda insanlarda görülen non-tifoid *Salmonella* infeksiyonlarına neden olurlar. CDC'ye göre 2001 yılında salmonellaların en çok izole edilen 3 serotipi tüm izolatların %50'sini oluşturmuş ve sırasıyla *S. Typhimurium*'un %22, *S. Enteritidis*'in %18 ve *S. Newport*'un %10 olarak tespit edildiği bildirilmiştir (31).

Dağılım ve İnsidansı

S. Pullorum ve *S. Gallinarum* dünya çapında sporadik bir dağılıma sahiptir (48-51). İdentifiye edilmiş olan *Salmonella* serotiplerinin %10 kadarı kanatlılardan izole edilmiştir (37). United State Department of Agriculture (USDA) Ulusal Veteriner Laboratuvarı'nın Temmuz 1998- Temmuz 1999 arasında klinik ve çevre örneklerinden en çok identifiye ettiği paratifo *Salmonella* serovarları, *S. Heidelberg*, *S. Kentucky*, *S. Senftenberg*, *S. Enteritidis*; tavuklardan, *S. Thompson*; hindilerden ise *S. Senftenberg*, *S. Heidelberg*, *S. Hadar*, *S. Muenster* ve *S. Typhimurium*'dur. CDC 1998'de ABD'de insanlardan en çok izole edilen 10 serotip içinde (*S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis*) 7'sinin tavuk ve hindilerden izole edilenlerle aynı olduğunu bildirmiştir. Bu sonuçlar da *Salmonella*'nın insan ve kanatlı rezervuarları arasında önemli bir epidemiyolojik bağlantısının olduğunu işaretlerinden biri olarak gösterilebilir (37).

Bulaşma

Tavuklarda *Salmonella* türleri çok farklı kaynaklardan bulaşabilir. Özellikle, hayvansal protein içeren kontamine yemler *Salmonella* bulaşmasında önemlidir (52). Horizontal bulaşmaya kanatlılar arası direkt temas (infekte tavuklar arası kanibalismus ve infekte derideki yaralarla temas); kontamine dışkı ve su aracılık eder (37). *Salmonellalar*, dışkı ve kirli alanların üzerinde uzun süre canlı kalabilmektedirler. Aynı zamanda kanatlı hayvan dışkılarında 28 ay kadar canlılıklarını koruyabilmektedirler (53).

Kümes çalışanları ve ziyaretçiler korunma önlemleri alınmadığı takdirde, çizmeleri, elleri ve üzerindeki kıyafetler vasıtasıyla etkenleri bir kümesten diğerine hatta bir işletmeden diğerine bulaştırabilirler. Benzer olarak işletmelere girip çıkan araçlar, yabani kuşlar, memeliler ve insektler infeksiyonun taşınmasına yol açarlar (37). Vertikal bulaşma özellikle *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* infeksiyonlarında önem taşımakta ve sadece infekte olan kanatlılar değil aynı zamanda sonraki jenerasyonların da infekte olmasına neden olmaktadır. Vertikal bulaşma mikroorganizmaların ovuma yerleşmesi ve yerleşme sonrası oluşan ovulasyonda yumurtayı infekte etmesi ile oluşabilir. Yumurta bulaşmasında yumurta sarısında bulunan antikor seviyesi bulaşmayı etkilemektedir (41). İnsanlardaki

nontifoid infeksiyonların yaklaşık yarısının nedeninin kontamine tavuk ve ürünlerinin olduğu bildirilmiştir. Bu da insanlara nontifoid etkenlerin bulaşmasında tavukların önemli bir rolünün olduğunu göstermektedir (41).

Salmonellaların Gıdalarda Bulunuşu

Hayvansal gıdalar içerisinde başta kontamine kanatlı hayvan etleri ve yumurta ile bunlardan yapılan ürünler, kırmızı et ve et ürünleri, kontamine süt, pastacılık ürünleri, krema, dondurma ve soslar ile kabuklu deniz ürünleri, çoğu insan infeksiyonlarına neden olan en önemli kaynakları oluştururlar (54).

Tavuk, hindi, kaz ve ördek etleri, intestinal sistem veya tüy ve ayaklardaki fekal materyallerden dolayı sıklıkla *Salmonella* ile kontamine olabilmektedir. Çapraz kontaminasyon özellikle tüy yolma, iç organ çıkartma ve soğutma gibi kritik aşamalarda önem taşımaktadır. Ayrıca işçi elleri, alet ve ekipmanla da çapraz kontaminasyonun şekillendiği bildirilmektedir (54).

Kanatlı Salmonellozis'in Patolojisi

Ciddi paratifo infeksiyonlarında, hızlı gelişen septisemi nedeniyle yumurta çıkımında, hiçbir lezyona rastlanmaksızın yüksek mortalite oranı ile ölümler meydana gelir. Hastalığın uzun sürmesi durumunda ince bağırsak mukozasında fokal nekrotik lezyonlar ve önemli enteritidis tablosu görülür. Sekumda peynirimsi odaklar gözlenir. Dalak, karaciğer ve böbrek konjeste ve büyümüştür. Fibrino-prulent perihepatitis ve perikarditis vardır (37).

Genç hayvanlarda pullorum ve tifo infeksiyonlarında, perakut vakalarda, hiçbir ciddi lezyon görülmezsizin ani ölümler meydana gelir. Akut vakalarda paratifo infeksiyonlarındaki gibi karaciğer, dalak ve böbrekler büyümüş ve konjesyon bulunur. Genellikle, solunum sistemi belirtileri olan hayvanlarda kalp kasında ve akciğerlerde Marek hastalığındaki tümörlere benzeyen beyaz nodüller bulunabilir (41).

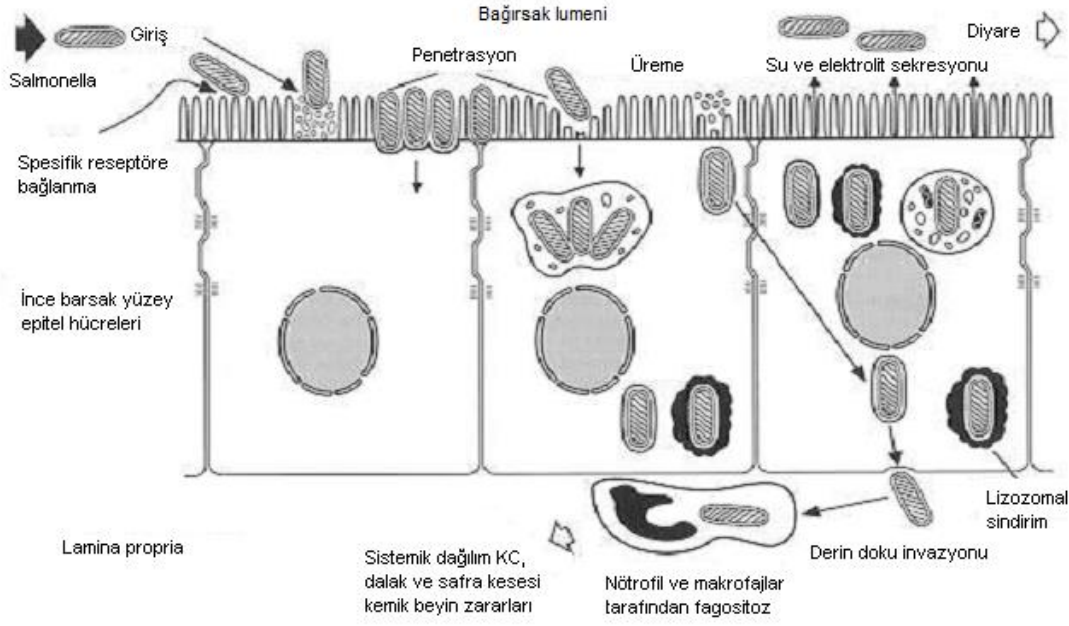
Ergin hayvanlarda en sık görülen lezyonlar şunlardır: perikarditis, pankreasta ve testislerde görülen beyaz nodüller, ovaryumlardaki patolojik bozukluklar ve son olarak akciğer ile hava keselerinde bulunabilen kazeöz granülomlardır (41).

Kanatlı Salmonellozis'in Patojenezi

S. Pullorum ve *S. Gallinarum* dahil olmak üzere, *Salmonella* cinsi bakterilerin, konak canlıının iç organlarında (özellikle dalak ve karaciğer) hayatta kalma yetenekleri arasındaki farklılık mononukleer fagositik sistemdeki bilinmeyen bir mekanizmaya bağlanmaktadır (41).

S. Gallinarum infeksiyonunun tavuklarda IL-6'da değişiklik yapmaksızın IL-1 beta'da azalmaya neden olduğu bir çalışmada gösterilmiştir. IL-1 beta'daki azalma *S. Gallinarum*'un sistemik infeksiyonuyla sonuçlanan inflamasyon cevabındaki bir eksiklik olarak yorumlanmaktadır. Başka bir çalışmada *S. Pullorum*'un bağırsaklarda inflamasyona neden olmadan önce Bursa Fabricius'u hedef aldığı gösterilmiştir. Tavuklarda *S. Gallinarum* infeksiyonunun üçüncü gününde leukositozise neden olduğu ve leukopeninin ise takip eden yedi günde sona erdiği bildirilmiştir. Ayrıca *S. Gallinarum* kanda sialik asitte bir artışa ve anemiye sebep olabilir (41).

Paratifo etkeni olan salmonellalar, özellikle, iliiosekal kavşak noktasına affinite gösterirler ve bütün bağırsak kanalı boyunca epitelyum hücrelerini istila ederler (37). Salmonellaların bağırsak epitelyum hücrelerine invazyonu, sıvı ve elektrolit regülasyonunu etkileyen bir seri patolojik değişikliğe yol açar (Şekil-1). Bunun sonucu olarak, diyare ve hücre ölümü gelişir (55-56). Salmonellaların epitel hücrelerine invazyonu makrofajların bakterileri lamina propria tabakasına geçirmesine yol açabilir (37).



Şekil-1. Salmonellaların intestinal mukozaya invazyonu (57)

Patojenite Adaları

Salmonellaların virulans genlerinin çoğunluğu *Salmonella* patojenite adaları (SPA) olarak adlandırılan kromozomun üzerindeki bölgelere dağılmış olarak bulunmaktadır (58-59). Bu gen topluluklarının horizontal gen transferi vasıtasıyla *Salmonella* cinsi olmayan diğer cinslerden edinilmiş olduğu düşünülmektedir. Bu hipotez sıklıkla patojenite adalarının uçlarındaki transpozon insersiyon sekansların veya bakteriyofaj kalıntıları gibi rezidüel genomların bu adalarda bulunan farklı GC içeriği ile karışması esasına dayanmaktadır (58).

E. coli ve *Salmonella* arasındaki genlerin karşılaştırılmasında birçok farklılık bulunmaktadır. Bu farklılıklardan biri, *Salmonella* spesifik genlerin kromozom üzerinde dağılmış olarak bulunmamasıdır. Bu genler, “adalar” olarak adlandırılan bakteriyel kromozom içinde özel bir bölümde toplanmıştır (Şekil-2). Bu gen adalarının büyüklükleri genel olarak değişmektedir ve yaklaşık tRNA gen haritasına benzemektedir (60).

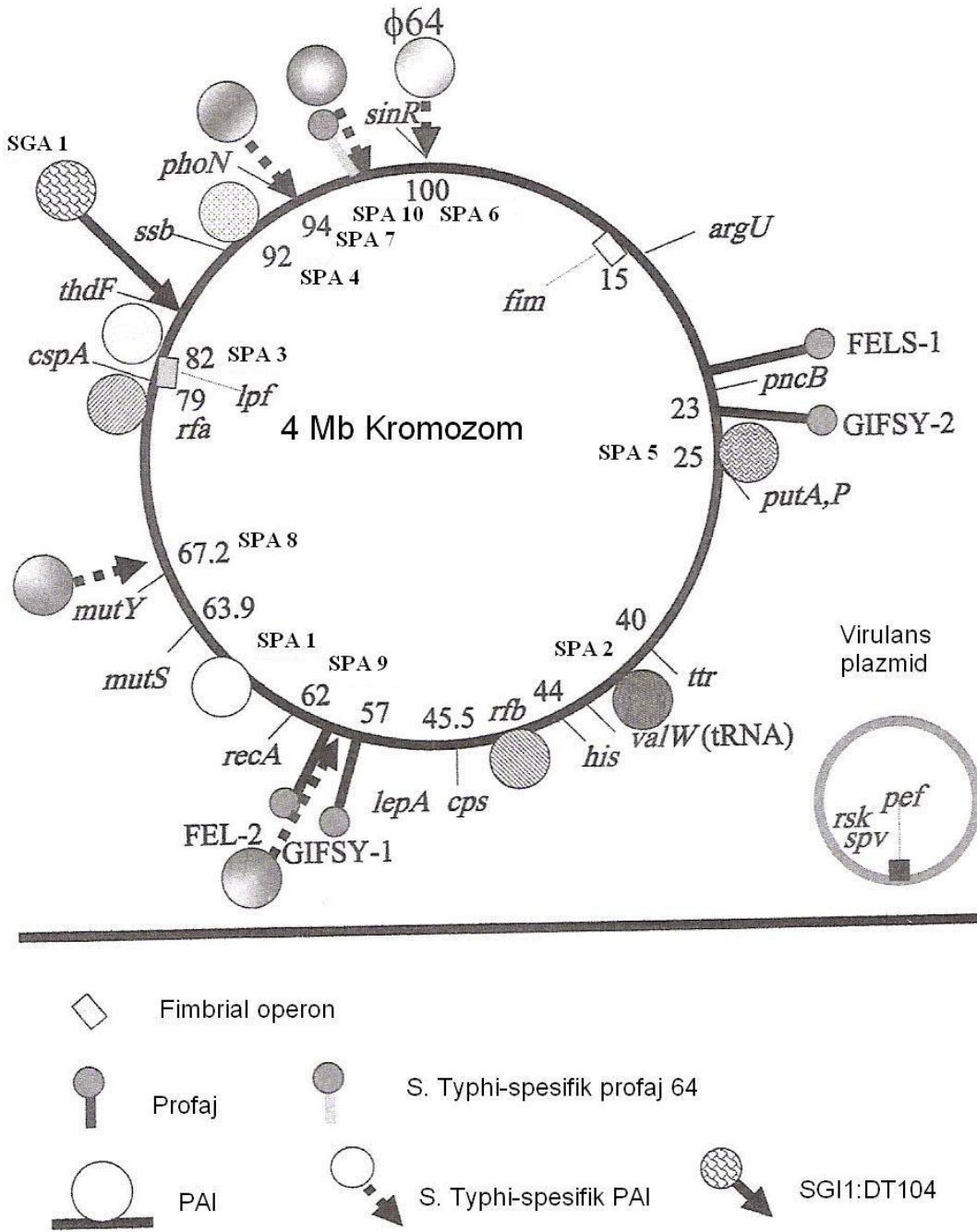
Salmonella enterica’da bulunan gen adalarının çoğu patojenite için esansiyel olan önemli fonksiyonları kodlar ve bu lokuslar tür ve cinslerde tanımlanmıştır (Tablo-5) (60). Günümüze kadar salmonellaların kromozomları üzerinde beş *Salmonella* patojenite adası (*salmonella* patojenite adası-1, ..., *salmonella* patojenite adası-5 olarak isimlendirilen)

identifiye edilmiştir (Şekil-3). Bu patojenite adaları sırasıyla sentrizom 63, 31, 82, 92 ve 25’de lokalize olmuşlardır (59). *Salmonella* patojenite adası-1 üzerinde tip III sekresyon sistemini kodlayan DNA’nın 40 kilobaz (kb)’lık bölgesi bulunmaktadır. Tip III bakteriyel transport sistemi; hücreler tarafından bakterilerin içeri alınmasına yol açan hedef hücre aktinine bağlanan SopE ve SptP bakteriyel proteinleri kodlamaktadır (61).

Salmonellaların konak epitel hücrelerindeki kolonizasyonu flagellalarının sağladığı hareket yeteneği ve invazyon proteinleri ile gerçekleşir. Salmonellalarda inv (“invazyon”) lokusunun rolü invazyon mekanizmasında özel bir öneme sahiptir. Bu proteinler M hücrelerinin ve enterositlerin Ca⁺² içeri almalarına ve sitoplazmalarında değişikliğe yol açarak, anatomik yapının bozulmasını neden olur. Adheze Salmonellalar aktin polimerizasyonunu etkileyen önemli bir sinyal ile memeli hücreleri içine luminal Ca⁺² alınmasını gerçekleştirir. Salmonellalar ökaryotik hücrelere Sip A, Sip B, Sip C, Spt P, Sop E2 ve Sop B invazyon proteinlerini gönderir. Bu proteinler istilacı patojenlerin etrafında mikroflamentlerin içinde konak hücre aktininin polimerizasyonuna dolayısıyla bakteriyel istilaya sebep olurlar (Şekil-4) (60).

İkinci tip III sekresyon sistemini 40 kb’lik *Salmonella* patojenite adası-2’deki lokus kodlamakta olup, hem epitelyum hücrelerinde hem de makrofajların içinde salmonellaların canlı kalması için bu sisteme gereksinim duyulmaktadır. 17 kb’lik bölgede aralarında *mgtC* geninin ve 10 okunabilir sekansın var olduğu *Salmonella* patojenite adası-3 bulunmaktadır. (62).

Salmonella patojenite adası-4 makrofajlar içinde canlı kalmayı sağlar, 25 kb’lik bölgede bulunur ve toksin sekresyonunu gerçekleştiren tip-I sekresyon sistemini desteklediği tahmin edilmektedir (63). *Salmonella* patojenite adası-5’in diyareye sebep olan patojenite yeteneğinden sorumlu olduğu ortaya konulmuştur. Bu lokus salmonellalar arasında oldukça iyi muhafaza edilmiştir. Bakterinin sistemik infeksiyona sebep olması için gerekli olmayan ancak, inflamasyonel yanıtı ve intestinal sekresyona neden olması için esansiyel olan pip A, -B, -C, -D ve sop B’yi içeren bir çok gen identifiye edilmiştir (60).



Şekil-2. *S. enterica*'nın virulans lokuslarının genetik haritası. Gen adalarının spesifik tRNA'ları veya toparlayıcı genlerin pozisyonları kısmi olarak kromozomlar üzerinde tarif edilmiştir. Sadece enterik ateş ile ilgili *Salmonella* serovarlarında bulunan kesik çizgili oklar yoluyla haritaya yerleştirilen serovar Typhi gen adaları olan SPA6-10 da kapsayan tüm 10 salmonella patojenite adaları çemberde resimlenmiştir. Profaj genomları da haritada bulunmaktadır ve lolipop şeklinde gösterilmiştir. Adhezin/fimbrial operonlar kare olarak şematize edilmiştir (60).

Tablo-5. *Salmonella* gen adaları, profaj ve virulans plazmid (60).

Lokus	Regülasyon	Fonksiyon(lar)	Dağılım
rfa/waa	waaH	Distal uçta LPS sentezi; serumda canlı kalma	<i>S. enterica</i> ; <i>S. bongori</i>
rfb/wba		O-antijeni biyosentezi; serumda canlı kalma	<i>S. enterica</i> ^a ; <i>S. bongori</i> ^a
SPA1	phoP/Q; ompR/envZ; sirA	Hücre invazyonu (enteritis)	<i>S. enterica</i> ^b ; <i>S. bongori</i>
SPA2	phoP/Q; ompR/envZ; rpoS	Makrofajlarda canlı kalma; hücre invazyonu	<i>S. enterica</i>
SPA3		Makrofajlarda canlı kalma	<i>S. enterica</i> ^b ; <i>S. bongori</i>
SPA4	waaH?; sirA	Makrofajlarda canlı kalma?; memelilerde kolonizasyon	
SPA5	sirA	Akışkan sekresyon (enteritis)	<i>S. enterica</i> ^b ; <i>S. bongori</i>
SPA6		Fimbrial operonlar <i>safA-D</i> , <i>tcsA-R</i>	<i>S. enterica</i> “enterik ateş” serovars ^c
SPA7		Vi antijeni; Tip IV pili	<i>S. enterica</i> “enterik ateş” serovars ^d
SPA8		Bakteriosin immunité	<i>S. enterica</i> “enterik ateş” serovars
SPA9		Tip I sekresyon; RTX homologu	<i>S. enterica</i> “enterik ateş” serovars
SPA10		Fimbrial operon <i>sefA-R</i>	<i>S. enterica</i> “enterik ateş” serovars
SGA1		DT104 MDR lokus	<i>S. enterica</i> serovars ^e
Virulans Plazmid	rpoS	Retiküloendotelial sistem içerisinde proliferasyon	<i>S. enterica</i> serovars ^e

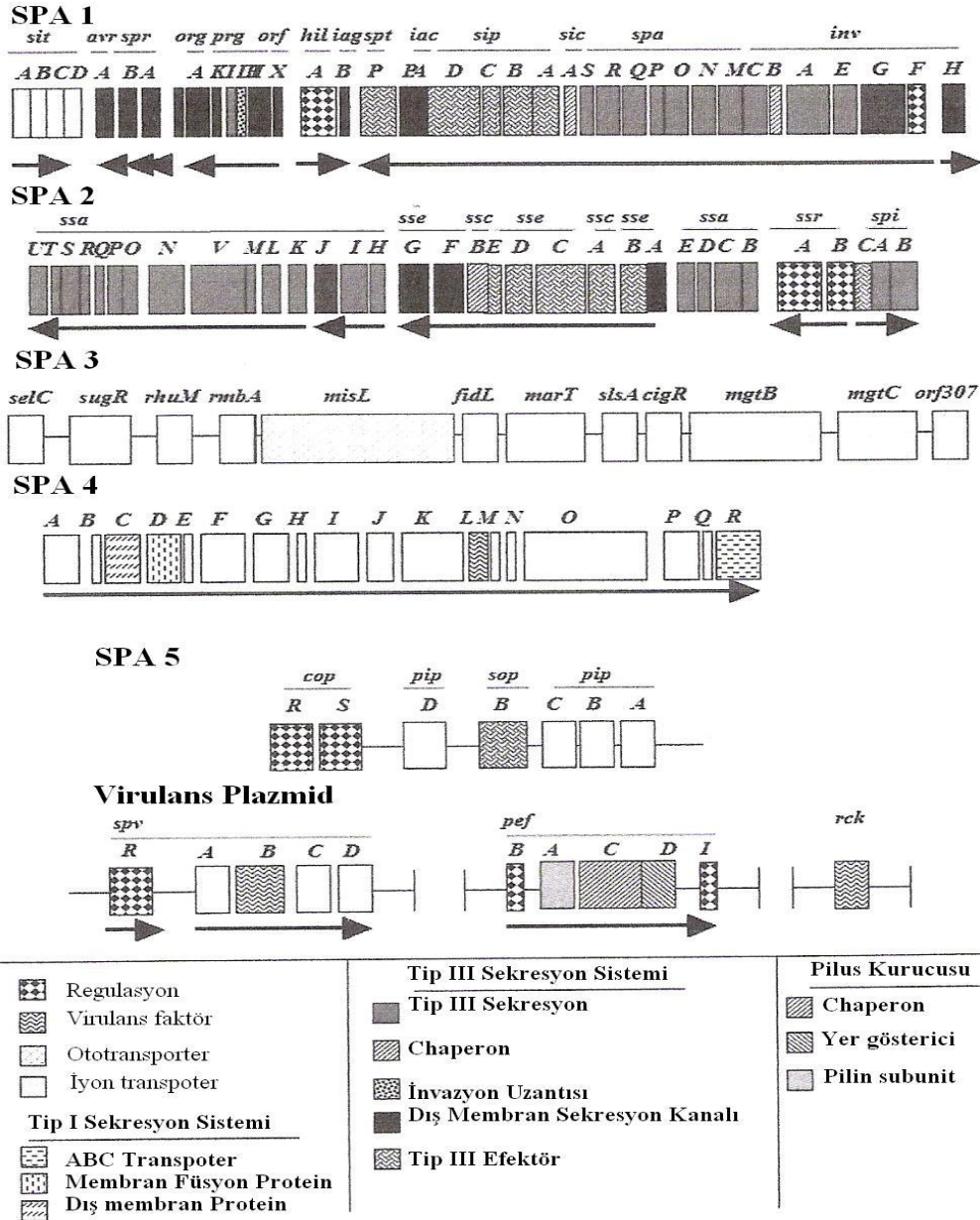
^a Operonların genetik kompozisyonunda dağılımı

^b *Salmonella* serovarları arasındaki lokus içerisinde genetik çeşitlilik

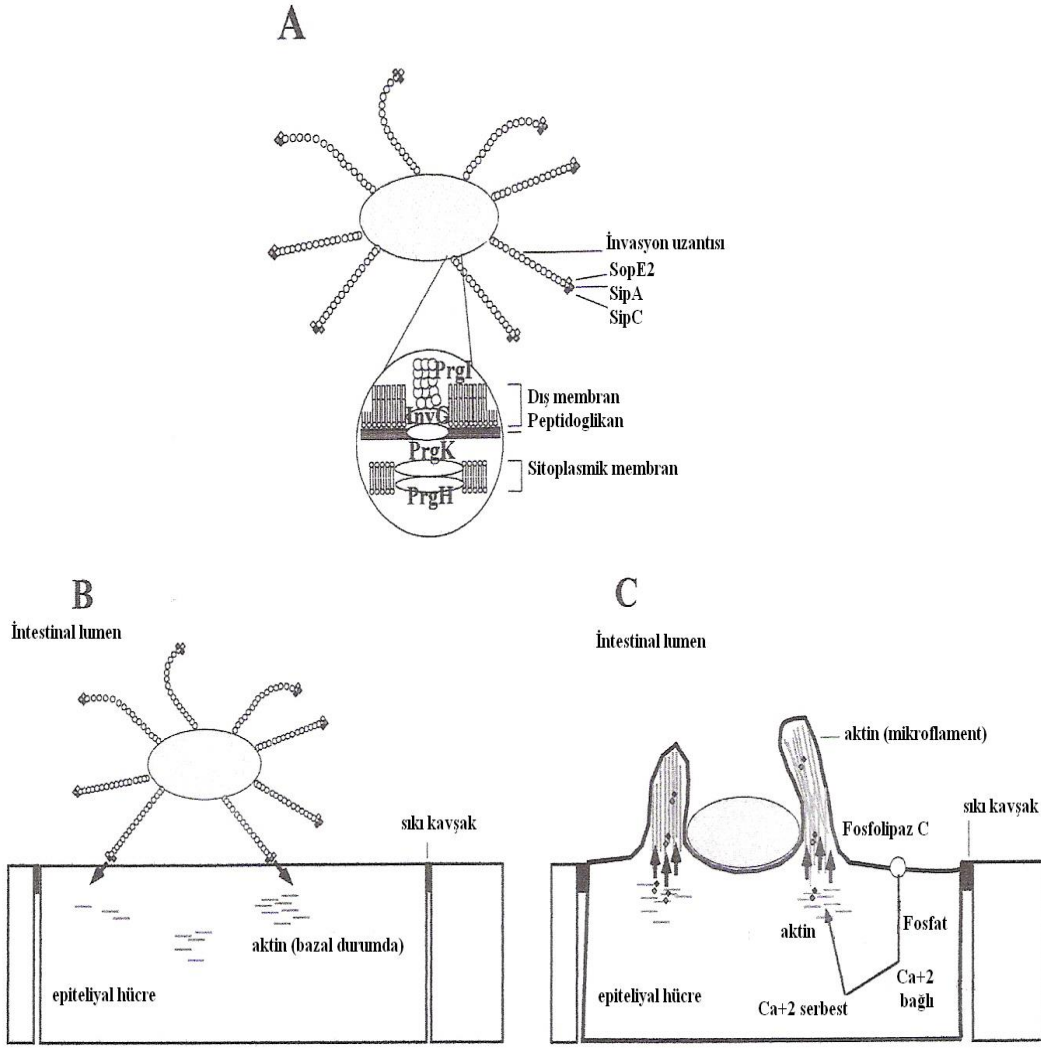
^c *S. enterica* serovar Choleraesuis de bulunma

^d *S. enterica* serovar Typhi, Paratyphi ve Dublin de bulunma

^e *Salmonella* serovarları arasında değişken dağılım



Şekil-3. Virulans genlerin genetik organizasyonu SPA1-5 ve virulans plazmidini kapsar bir şekilde sunulmuştur. Operonlar içinde organizasyonları ve bu genlerin transkripsiyon yönleriyle operonlarını ayıran oklarla birlikte gösterilmiştir. Genlerin bilinen fonksiyonları şeklin altındaki anahtarla tanımlanmış olan şablonlar ile tabloda açıklanmıştır. Bu genlerin bilinmeyen fonksiyonları beyaz kutularda belirtilmiştir. Tip III effektörler tip III sekresyon sistemi yoluyla konak hücre sitoplazması içine giren bakteriyel proteinlerdir (60).



Şekil-4. Konak epitel hücrelerine salmonellaların invazyon mekanizması (60).

Virulans Faktörler

Virulans Plazmidler

Salmonella'nın en az altı serotipinde (serotip Abortusovis, Choleraesuis, Dublin, Enteritidis, Gallinarum/Pullorum ve Typhimurium) bir virulans plazmid bulunduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak, bu serotiplerin tüm izolatları virulans plazmidleri taşımaktadır (64-65).

Salmonella'nın bütün plazmidleri 7.8 kb spv (salmonella plasmid virulence) lokusunda bulunmaktadır. Bu lokusta spv RABCD olarak adlandırılan beş gen bulunmaktadır. Spv genlerinin ekspresyonu intraselüler *Salmonellae* sayısının artışında önemli rol

oynamaktadır (65). Spv R geninin eksprese ettiği protein, diğer spv genlerinin ekspresyonu için pozitif regülatör etkisi olan esansiyel bir proteindir. Spv B ADP-riboz-aktin proteinini oluşturmakta, bu yolla ökaryot hücrelerin anatomisinde bozukluğa yol açabilmektedir. (62).

Toksinleri

Salmonellalar endotoksin, enterotoksin ve sitotoksin olmak üzere üç ayrı toksin sentezlemektedirler (34). Sentezledikleri bu üç toksin salmonellaların patojenitelerinde önemli rol oynamaktadır (37).

Endotoksin salmonellaların lipopolisakkarid hücre duvarında bulunan lipid-A kısmı ile ilgilidir. Bakteri hücresinin lize olması durumunda açığa çıkan endotoksin kan dolaşımına karışır ise ateşe neden olur. *S. Enteritidis*'den elde edilmiş endotoksinin 2 haftalık civcivlere intravenöz olarak verilmesi durumunda dalak ve karaciğerde lezyonlar oluşur (37). Lipopolisakkarid, aynı zamanda bakteri hücrelerini konak savunma sistemindeki fagositler tarafından fagosite edilmelerine karşı korumaktadır (66).

Salmonellaların sentezlediği enterotoksinler bağırsak epitel hücrelerinden aşırı sıvı salgınımına sebep olmakta, bu da bağırsak lümeninde sıvı birikimi ve diareye neden olmaktadır (67). Hayvanlardan izole edilen 123 *S. Typhimurium*'un %44'ünde enterotoksin belirlenmiştir (68). Enterotoksin sentezlemeyen mutant izolatlar hücre kültürlerinde daha az mukozal hasara neden olurken, farelerde de daha düşük mortalite oluşturmuştur (69). Salmonellaların sitotoksinleri protein sentezini inhibe ederek bağırsak epitel hücrelerinde yapısal hasarlara neden olur (37).

Salmonella'nın toksinleri üzerinde yapılan en iyi çalışmalar, (70-71) stn geni tarafından kodlanan sıcaklık-labil *Salmonella* enterotoksininin (Stn) üzerinedir. *Salmonella Typhimurium*'un stn geni 749 bp'den oluşur. Bu stn geni PCR ve Southern blotting teknikleriyle tekrar isimlendirilen *Salmonella Typhi* ve *Salmonella Enteritidis*'in de içinde bulunduğu *S. enterica*'nın 14 serovarını kapsayan, 84 suşta varolduğu saptanmıştır (71).

Fimbria

Fimbria (aynı zamanda pilus olarak da isimlendirilir) 2-8 nm genişliğinde ve 0.5-10 µm uzunluğunda temelde fibrin olarak adlandırılan proteinlerin tekrarlayan heliks şeklinde düzenlenmesiyle oluşan filamentöz yüzeysel yapılardır (72). Derleyici, toparlayıcı, yapısal ve biyosentezi de kapsayan proteinleri kodlayan 8-11 gen, genel olarak, 7-9 kb genişliğinde toplanır (73). Salmonellalarda fimbriaların hedef hücre ve kolonizasyonda görev aldığı gösterilmiş olmasına rağmen (72), patojenezindeki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır (74).

Flagella

Birçok *Salmonella*'da motiliteyi sağlayan organel flagelladır. *Salmonella*'nın flagellar gen sistemi tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Flagellasız serotiplerin flagellasının ve hareketinin bulunmayışının sebebini genetik bilgiyle kavramak mümkündür. Flagellaya sahip olmayan, hareketsiz serotiplerle ilgili yapılan en iyi çalışmalar *Salmonella Gallinarum/Pullorum* üzerinedir (62). *Salmonella Gallinarum/Pullorum* serotiplerinin her ikisinin genomik yapılarının üzerinde Faz 1 flagellin proteinini kodlayan gen olan *fliC*'nin bulunduğu gösterilmiş olmasına karşın, Faz 2 flagellin proteinini eksprese eden gen olan *fliB* saptanamamıştır (75).

Flagellaya sahip olan salmonellaların çoğunun faydalandığı flagellin varyasyonu, konakçı savunma sisteminden kaçmayla ilgidir (62). *Salmonella* kaynaklı infeksiyonlarda, flagellanın rotasyon yönüyle ve flagella vasıtasıyla sağlanan hareketteki flagellanın rolü, salmonellaların patojenezinde, ökaryotik hücrelere invazyonunda ve onların adhezyonunda varsayılan rolleri hakkında birçok çalışma bulunmaktadır (76-77).

Etken İzolasyon ve İdentifikasyonu

Günümüzde gıdalardan salmonellaların izolasyon ve identifikasyonu için; klasik kültür tekniği, immunolojik yöntemler, impedans, DNA-DNA hibridizasyon, DNA amplifikasyon, Immunomayetik Separasyon (IMS), enzime bağlı antikor-hidrofobik grid

membran filtre (Enzyme Linked Antibody Hydrophobic Grid Membrane Filter) gibi farklı analiz metodlarından yararlanılmaktadır (78).

***Salmonella* Saptanmasında Standart Kültür Metodları**

Salmonella izolasyonu ve identifikasyonu için çok farklı kültür metotları önerilmesine rağmen, çoğu standart metot başlıca dört safhayı gerektiren genel bir planı takip eder. Birinci safha; selektif olmayan ön zenginleştirme, zarar görmüş *Salmonella* hücrelerinin kendilerini yenilemesini ve sayıca az ise üreyerek sayılarının artırması için kullanılır. İkinci safha; selektif zenginleştirme, diğer bakterilerin üremesini baskılamak, *Salmonella* popülasyonunun artmasını sağlar. Üçüncü safha; diferensiyel bir besi yerine ekim, her biri tek bir hücreden köken alan izole kolonileri elde etmek için kullanılır (37). İç organlardan alınan örnekler için selektif olmayan besi yeri olan kanlı agar, MacConkey agar v.b. yapılan ekimler de izolasyonda yarar sağlayabilir (38). Dördüncü safhada; karakteristik *Salmonella* kolonisi görünüşüne sahip olan kolonilerin serotip ve genus identifikasyonu için serolojik ve biyokimyasal testler yapılır. Aslında, son iki aşama bütün metotlarda ihtiyaç gösterir ancak, zenginleştirme gereksinimi örneklerin niteliğine göre değişir (37).

Gıdalardan salmonellaların belirlenmesi için ISO (The International Organization for Standardization), AOAC (Association of Official Analytical Chemists), APHA (American Public Health Association), FDA (U.S. Food and Drug Administration), HPB (Health Protection Branch-Canada), ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), NAS (National Academy of Sciences), USDA gibi çeşitli kuruluşlar tarafından hazırlanan standartlar/protokoller bildirilmekte ve bu amaçla kullanılan zenginleştirme sıvı ve katı besi yerleri de farklılıklar göstermektedir (79).

Besiyerleri

Besiyerleri genel olarak 37°C'de 24 saat inkübe edilir. Salmonellaların izolasyonu ve identifikasyonu için birbirinden farklı besiyerleri geliştirilmiştir. Selektif olmayan ön zenginleştirme besiyerleri için tamponlanmış peptonlu su ve trypticase soy buyyon önerilmektedir (37).

Selektif zenginleştirme için son yıllarda en çok kullanılan besiyerleri tetrathionate ve Rappaport–Vassiliadis buyyonlardır. Tetrahionate buyyon ve Rappaport–Vassiliadis buyyon; kloakal svap, intestinal doku, yumurta içeriği ve kanatlı yemlerini de kapsayan farklı tipteki örneklerde, *Salmonella* belirlenmesi bakımından daha hassas bulunmuştur. Rappaport–Vassiliadis buyyon çığ kanatlı eti ve yumurta içeriğinden *Salmonella* izole etmek için etkili bir şekilde kullanılmaktadır (37).

Kullanılan çeşitli diferensiyel besiyerleri arasında daha çok tercih edilenler; Brilliant Green Agar, XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) Agar, XLT4 (Xylose Lysine Tergitol 4) Agar, Bizmut Sulfite Agar ve Hektoen Enteric Agar'dır (37). XLT4 agar drag svaplardan ve kümes içi materyalden *Salmonella* izolasyonunda başarıyla tatbik edilmektedir (43). XLT4 Agar ile Hektoen Enteric Agar'ın dışkıdan *Salmonella* izolasyonu bakımından karşılaştırılmasında %100'e yakın ölçüde spesifite tespit edilmiş ve XLT4 Agar Hektoen Enteric Agar'a alternatif olarak düşünülmüştür (80).

XLT4 Agar, XLD Agar'dan farklı olarak içinde sodyum dezoksikolat yerine iyonik olmayan surfaktan bir madde olan tergitol-4 bulunan selektif bir agardır. Bu agar Gram-negatif birçok bakteriyi (*Proteus*, *Providencia* ve *Pseudomonas* dahil), mantarı ve Gram pozitif bakterilerin tamamının üremesini inhibe eder. Buna ek olarak *Citrobacter* türlerinin bir kısmının üremesini engellerken, diğer kısmının nadiren siyah merkezli koloniler oluşturmasına izin verir. H₂S-pozitif *Salmonella* kolonileri 18–24 saatlik inkübasyondan sonra siyah veya siyah merkezli periferi sarı renkli koloniler tarzındadır. İnkübasyona devam edilirse, tamamen siyah veya periferi pembe kızıya değişen siyah merkezli koloniler oluşur. Nadir olarak H₂S üretmeyen nadir salmonellalar pembemsi sarıdan pembeye kadar değişen renkte koloniler meydana getirirler. *Salmonella* olmayan bakteriler ise bu besiyerinde sarı renkte koloniler oluşturmaları ile ayırdedilirler (31).

Serotip ve Genus Belirlenmesi

Selektif agarlarda karakteristik görünümleri ile üreyen *Salmonella* şüpheli kolonilerin serotiplerinin belirlenmesi ve cins identifikasyonunun doğrulanması için başka testler de yapılmaktadır. Bunlar Triple Sugar Iron Agar ve Lysine Iron Agarın kullanımı ile kombine edilen, muhtemel salmonellaları ortaya koyan testlerdir (37). Bu besiyerlerinde

37°C’de 24 saat inkübasyondan sonra tipik koloni gösteren *Salmonella* kolonilerini identifiye etmek için biyokimyasal ve diğer testler yapılır (7, 41, 81).

Salmonellaların biyokimyasal özelliklerini gösteren, örneklerden elde edilen izolatlar, bütün altgrupların antikorlarını bulunduran polivalan antiserum kullanılarak *Salmonella* olduğu doğrulanır (31). Serotiplendirme, spesifik “O” antijenine karşı monovalan antiserumlar ile lam aglütinasyon ve flagellar “H” antijenine karşı tüp aglütinasyon testleri yapılarak tamamlanır (36-37).

Saf kültürden Gram boyama, hareket muayenesi (36, 38) ve bazı biyokimyasal testler yapılır: Bunlar; dekstroz, laktoz, sükröz, mannitol, maltoz, dulcitol, malonat, jelatin, üre, sitrat kullanımı, ornitin dekarboksilaz, Metil-Red ve Voges-Proskauer, Potasyum siyanür (KCN) ve O-nitrophenyl-beta-D-galaktopyranoside (ONPG) oluşumu, indol, hidrojen sülfür testleridir (7).

İmmunolojik Tanı

Salmonellaların immunolojik tabanlı testlerle tanısı için kullanılan en önemli metot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)’dır. Otomatize edilmiş ELISA temelli hızlı test sistemlerinin, çok sayıda örneğin bir arada test edilebilmesi ve daha az laboratuvar yoğunluğu gibi avantajlarının bulunduğu bildirilmektedir. Ticari olarak günümüzde kullanılan ELISA tabanlı sistemlere örnek olarak EIAFoss (Foss Electronics, Hillorod, Denmark) ve VIDAS (Biomerieux) verilebilir, bu sistemler kanatlı endüstrisinde ve kanatlı etlerinde bakteriyel kontaminasyon varlığını araştırmak için kullanılmaktadır (82-84).

Salmonella belirlenmesinde antikorları kullanan diğer bir uygulama, Immunomanyetik Separasyon (IMS) dur (85). Selektif agara ekimden önce IMS kullanımı, yem, kloakal svap, yumurta kabuğu, kanatlı eti ve doku örneklerindeki *Salmonella* kontaminasyonunu geleneksel selektif zenginleştirmeden daha yüksek bir hassasiyetle belirlemektedir (86). IMS aynı zamanda hem kültür hem de ELISA vasıtasıyla yumurta içeriğindeki düşük olan *S. Enteritidis* kontaminasyonunu belirlemek için kullanılmaktadır (87).

Hızlı Tanı Teknikleri

Konvansiyonel kültür teknikleri ile negatif sonuçların alınması çoğu örnek için birkaç güne ihtiyaç gösterirken, pozitif sonuçların doğrulanması daha da uzun sürmektedir. Günümüzde geliştirilen birçok hızlı teknik *Salmonella* tanısında geniş ölçüde kullanım alanı bulmamıştır. Hızlı tekniklerin çoğu sonuçlandığı için tanı zamanını kısaltmakta ve bir dereceye kadar otomasyona adapte edilebilmektedir (37).

Kanatlılarda salmonellaların hızlı tespiti için diğer bir yaklaşım da cins ve türe özgü özel DNA sekans problemlerinin kullanılması ile yapılmaktadır. Örneklerden ekstrakte edilen DNA ile probun hibridizasyonu ile pozitif sonuçlar gösterilir. DNA problemleri yüksek spesifitede olup kümes içi örneklerden ve kanatlı dışkılarından *Salmonella* belirlenmesinde kullanılmaktadır (88).

PCR tekniğinin gelişmesi hedef DNA segmentlerinin spesifik amplifikasyonuna izin vermektedir. Bu teknik ile çok yüksek hassaslıkta su, (89) dışkı, drag swap (90) ve yumurta (91-92) gibi çok farklı örneklerden *Salmonella* tespiti mümkün olmaktadır (93).

Dikkatli bir şekilde seçilen DNA problemleri; yüzeysel yapılardan fimbria (92), biyokimyasal veya virülans özellikleri taşıyan genler gibi spesifik karakterlere sahip salmonellaların belirlenmesi için PCR ile birlikte kullanılabilir (37). Gıda orijinli patojenlerin spesifik olarak saptanmasında, real-time PCR gıda üretim zincirinin her safhasında kontamine olan ürünlerin kontrolü için güvenilir, hızlı bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Real-time PCR'ın hızlı sonuç vermesi gibi avantajlarının yanında, konvansiyonel PCR'la karşılaştırıldığında, kross kontaminasyon riskinin düşük ve otomasyona yönelik olması ile rutin laboratuvarlar için uygun bir metot özelliğinde olduğu bildirilmektedir (94).

***Salmonella* Tiplendirme Metotları**

A. Fenotipik Metotlar

1. Aglütinasyon Temelli Serotiplendirme (Kauffmann-White-Le Minor Şeması)

Aglütinasyon temelli *Salmonella* serotiplendirilmesinde 1930'lu yıllardaki

Kauffmann-White-Le Minor Şeması modifiye edilerek kullanılmaktadır (13, ,95, 96). Serotiplendirme (O) somatik ve (H) flagellar antijenlerin oluşturduğu varyantları tanımlayan spesifik antiserumlarla aglütinasyon esasına dayanmaktadır. Bu antijenler çok yüksek düzeyde değişken olup 64 O ve 114 H varyantı bulunabildiği bildirilmektedir (13, 97). O antijenleri bakteri yüzeyinde bulunan lipopolisakkarid (LPS) yapıdadır. Bakteri yüzeyini oluşturan LPS yapısı spesifik antiserumlarla reaksiyonu sonucu *Salmonella* serotiplendirme şemasının temelini oluşturur (13). Birçok O antijeni tek bir bakteri hücresi yüzeyinde birlikte eksprese olabilir. O antijeninin bu özelliğine karşı flagellar proteinler farklı özellik gösterirler. Bu bakteriler, flagellar proteinleri kodlayan farklı iki gen kopyasına sahip olmalarına karşın, aynı zaman dilimi içinde sadece bir özellikteki geni eksprese edebilirler (97). Bu nedenle çoğu izolat difazik (Faz I ve Faz II veya H1 ve H2) olarak isimlendirilir (98). Bunlara ek olarak, hem H1 hem de H2 antijenine sahip bakterilerin tek bir H antijenini eksprese edebilirken saf kültürlerde iki fazı da belirlenebilmektedir. Belirlenmeyen H fazının saptanabilmesi için faz inversiyonu kullanılır. Bu durumda spesifik antiserumlar ile bir H fazının inhibisyonu oluşturulurken, diğer taraftan bakterinin özel besiyerlerinde (Sven Gard) diğer H fazının eksprese edebilmesine imkan sağlanır (13). Tiplendirme metotları arasında aglütinasyon testleri yeni olmayan bir teknolojiye sahiptir. Aglütinasyon reaksiyonlarında yalnız pozitif, zayıf ve nonspesifik sonuçlar görülebilmektedir (99). Otoaglütinasyon ve antijen ekspresyonundaki kayıp daha çok mukoid, rough ve hareketsiz izolatların oluşturduğu kolonilerde görülebilmektedir. Bunun sonucu olarak, epidemiyolojik önemi olan izolatların tiplendirilememesi gibi durumlarla karşılaşmaktadır. Aglütinasyon metodu fingerprinting ve filogenetik analizler kadar güçlü bir metot olmayıp ayrıca tüm işlemler için 150'nin üzerinde spesifik antiseruma, çok dikkatli ve tecrübeli personele gereksinim göstermektedir. Tüm bunlara rağmen serotiplendirme halen moleküler metotların alttıplendirmesini takip eden, izolatla ilgili başlangıç bilgisini veren ve yaygın bir şekilde kullanılan referans metot olarak tanımlanmaktadır (100).

2. Diğer Serotiplendirme Metotları

Bu grupta fajların kullanıldığı tiplendirme metotları yer almaktadır. Aynı *Salmonella* izolatına ait olan serovarları ayırmakta kullanılmaktadır (101).

B. Moleküler Metotlar

1. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

1990'larda *Salmonella* tiplendirilmesi için adapte edilen moleküler bir metoddur (102). Bu teknik konvansiyonel serotiplendirme metoduna göre daha ekonomik bir metoddur ve salgın durumlarında izolatların fingerprinting tiplendirilmesi için kullanılmaktadır. PFGE metodunun farklı serovarlara ait *Salmonella* infeksiyon kaynaklarını başarılı bir şekilde belirlediğini bildiren araştırmalar bulunmaktadır (103). Ancak, PFGE'nin çok zaman alıcı ve farklı serovarlara karşı aynı hassasiyeti gösteremeyebildiğini ortaya koyan çalışmalar da bulunmaktadır. Bunlara ek olarak analizlerin tekrarlanabilirliğinin sağlanabilmesi için standart bir protokole ihtiyaç vardır. Laboratuvarlar arası PFGE paternlerinin karşılaştırılması PulseNet network (104) tarafından yürütülmektedir. Tarihsel olarak en eski DNA alttıplendirme metotlarından olan PFGE salgınların araştırılmasında kullanılmakla birlikte, moleküler tiplendirmede altın standart olarak düşünülmektedir (100).

2. Flagellar ve LPS Temelli Moleküler Serotiplendirme

Bu tip serotiplendirme konvansiyonel serotiplendirmenin daha yüksek seviyeli, moleküler temellere oturtulmuş, alternatifi bir metod olarak geliştirilmektedir. Bu nedenle DNA bazlı serotiplendirme olarak da adlandırılmaktadır. Geçtiğimiz yıllarda *Salmonella enterica* O ve H antijenlerini kodlayan genlere özgü, çoğunlukla mutipleks PCR şeklinde uygulanan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (105).

3. Genomik Marker Temelli Moleküler Serotiplendirme

Salmonella alttürlerinin değişken yüzey antijenlerinin moleküler yöntemle belirlenmesi temeline dayanan birbirinden bağımsız tasarlanmış bir çok çalışma bildirilmiştir (97). Genetik determinant O ve H antijenleriyle ilişkili olmayan bu çalışmalar, *Salmonella*

izolatlarını belirlemek için genetik marker bazlı moleküler metotlar olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmaların içinde PCR metotlarının tekli ve multipleks şeklinde uygulananları bulunmaktadır. Genetik markerları kullanan bu sistem, yaygın olarak görülen *Salmonella enterica* subsp. *enterica*'nın serovar ve cins düzeyinde belirlenmesini sağlamaktadır. Metodun temeli hibridizasyon profillerinin gösterilmesine dayalıdır (100).

4. Tüm Genom Karşılaştırmasına Dayalı Moleküler Tiplendirme

Salmonella izolatlarının genomik yapılarının detaylı olarak araştırılmasına olanak sağlayan metot, *S. enterica* subsp. *enterica*'nın genom bilgisinin karşılaştırmasıyla tiplendirme yapmaktadır. Bu metot ABD'de tüm genom içeriği bilinen *S. enterica*'ya ait serovarlar arasında prevalansı yüksek *Salmonella* Typhi CT18 ve *Salmonella* Typhimurium LT2 gibi suşlar için karakterize edilmekte ve bu suşlara ait tüm genomik bilgiye ulaşma hedeflenmektedir (100).

5. MLST

İlk MLST şeması 7 housekeeping (hizmetçi) gen fragmentine özgü olarak 2002 yılında *Salmonella* Typhi ile *S. enterica* alttürünü birbirlerinden ayırmak için oluşturulmuştur. Bu housekeeping genler (aroC, dnaN, hemD, hisD, purE, sucA ve thrA) kromozom üzerinde yayılmış pozisyonlarda bulunan ve bakterilerin çeşitlilik profillerini en iyi gösteren bölgeler olarak bilinmektedir (106). MLST şemalarına <http://pubmlst.org/databases.shtml> adresinden (107) ulaşılabilmektedir ve MLST bilgisi bu internet kaynağına veri girilerek tiplendirme bilgileri edinilebilmektedir. Tüm gen parçaları için aynı allel bilgilerine ait olan izolatlar öncelikle yaygın olarak bulunan sekans tiplerine (ST) atanmaktadır. ST'ler ST-bazlı klonal kompleks içinde bir veya iki olarak gruplandırılırlar ki bu gruplara da eBurst adı verilmektedir (108-109).

Yedi housekeeping gen (aroC, dnaN, hemD, hisD, purE, sucA ve thrA) baz alınarak Achtman ve arkadaşları (26) tarafından oluşturulan MLST veri bankasında (110) tiplendirilen *Salmonella* izolatlarına ait konakçı, hastalık ve sağlık bilgilerine ek olarak kaynak ve çevre bilgisi de verilmektedir. Yine aynı araştırmacılar Nisan 2011'de *Salmonella* tiplendirme veri bankasında 4257 izolat bulunduğunu ve bunlardan *S. enterica*

subspecies *enterica*'nın 554 serovarına ait 1092 ST atandığını bildirmişlerdir.

MLST ile yedi housekeeping geninin dışında, başka bölgeler kullanılarak, farklı *Salmonella* izolatlarının tiplendirmesine yönelik çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalar MLST'de 16S RNA, pduF, glnA, and manB (111) ve manB, fimA, and mdh (100) gen bölgelerini temel almaktadır. Son olarak, yukarıda ifade edilen farklı gen bölgeleri arasında en verimli tiplendirme yapabilecek bölgenin yedi housekeeping gen bölgesinin olduğu bildirilmektedir ve bu bölgeleri kullanan MLST'nin konvansiyonel serotiplendirmenin yerine geçebileceği düşünülmektedir (26).

6. Tek Nükleotid Polimorfizm (SNP) ve Tiplendirme

SNP'nin keşfi, farklı veya aynı serovara ait olan bir çok bakteri suşunun DNA dizi bilgisine ulaşmayı kolaylaştırmıştır. Bu yöntem daha çok *S. Typhi*'ye yönelik olarak uygulanmaktadır (100).

7. Several Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)

S. Typhimurium, *S. Enteritidis*, *S. Typhi*, *S. Infantis* gibi farklı serotiplere karşı MLVA tabanlı tiplendirme çalışmaları bulunmaktadır (112). Bu metodun yakın genomik ilişkili izolatları ayırma kapasitesi bulunmaktadır ve çıkan salgınların araştırılmasında ve belirlenmesinde faydalı olduğu bildirilmektedir. Fakat, her bir araştırmadan sonra ikinci kez yapılan tiplendirmelerde yöntem faydalı olmamakta, bu nedenle, geniş filogenetik çalışmalarda yetersiz kalmaktadır (113).

HRM Analizi

Son yıllarda yapılan çalışmalar *Salmonella* genotiplendirmesinde HRM analizinin DNA dizi analizi kadar hassas sonuçlar verebildiğini göstermektedir (24). HRM analizi ile dizi analizi için gerekli maliyet ve sürenin önemli derecede azaltılmasının mümkün olduğu bildirilmektedir (5). HRM analizi, DNA çoğalmasının eş zamanlı izlenebildiği rPCR ile HRM boyalarının kombine edilmesi ile birlikte ortaya çıkmıştır. PCR sonrası 5-

10 dk'lık bir süreçte tamamlanabilen HRM analizi ile farklı DNA dizilimlerinin farklı HRM profilleri vermesi temeline dayanarak, analiz edilen yüzlerce DNA dizisi çok kısa bir sürede, hassas bir şekilde ayırt edilebilmekte ve gruplandırılabilir. HRM analizi mikrobiyel çeşitlilik çalışmalarında yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanılmıştır (29-30). Bununla birlikte, HRM analizi MLST ile *Salmonella enterica* türlerinin tiplendirilmesinde halen kullanılmamaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Referans Suşlar

SE-rPCR, konvansiyonel serogrupsama/serotiplendirme, MLST ve HRM analizi işlemlerinde *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) 64K (M.Y. Popoff, Institut Pasteur, Paris Cedex 15, France) ve *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium NCTC 12416 (Refik Saydam, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara) standart bakteri suşları pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Salmonella İzolatları

Çalışmada, 2000-2010 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı laboratuvarında izole edilen 58 *Salmonella* spp. [18 tavuk eti (tavuk kanat, bütün piliç, tavuk pizola, piliç baget), 4 hindi eti (hindi boyun, hindi but, hindi kuşbaşı, hindi jambon), 13 yumurta (içi ve kabuk) olmak üzere hayvansal gıda kökenli toplam 35 izolat ve 9 tavuk dışkısı, 3 kloakal svap, 1 karga barsak, 3 civciv barsak, 1 tavuk göz, 6 drag svap olmak üzere hayvan kökenli toplam 23 izolat)] izolatu kullanıldı.

Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Real time PCR sistemi (ABI 7500)
- LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, 03531414201)
- ABI Prism 377 DNA Dizileme Cihazı (Applied Biosystems, ABD)
- Kuru ısıtıcı blok (Techne, DB-2D - FDB02DD)
- İnkübatör (Thermo Scientific, OMH60)
- Otoklav (Nüve, OT 40L/90L)
- Santrifüj (Thermo Scientific, MicroCL 17)
- Nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, ND-1000)
- Derin dondurucu (-86°C) (Thermo Scientific, HFU Basic)

- Buzdolabı (Arçelik)
- Su banyosu (Nüve)
- Ultra saf su cihazı (Millipore Mili-Q Q-Gard1)
- Mikropipetler (Eppendorf, Nichipet) (1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
- Vortex (Biosan, Litvanya)
- Hassas terazi (Precisa 220 M SCS, İsviçre)
- pH metre (Jenco microcomputer pH meter conductivity temperature meter 6307)
- Klas II güvenlik kabini (Esco , Singapur)

Antiserumlar

Serogruplandırma (Somatik - O antijenik yapılarının belirlenmesi) ve serotiplendirme (Flagellar - Faz1 ve Faz 2 antijenik yapıların belirlenmesi) için kullanılan ticari antiserumlar:

O Antiserumları:

1. Polivalan Antiserumlar: *Salmonella* O Antiserum Poly A (Groups A, B, D, E1, E2, E3, E4, L); Poly B (Groups C1, C2, F, G, H); Poly C (Groups I, J, K, M, N, O);

2. Monovalan Grup Antiserumları: *Salmonella* O Antiserum Grup A; Grup B, Grup C1, Grup C2, Grup D, Grup E, Grup F, Grup G, Grup H, Grup I;

3. Grup Faktör Antiserumları: *Salmonella* O Antiserum Grup A Faktör 1, 2, 12; Grup B Faktör 1, 4, 5, 12; Grup B Faktör 1, 4, 12, 27; Grup C1 faktör 6, 7; Grup C2 Faktör 6, 8; Grup C3 Faktör (8), 20; Grup D1 Faktör 1, 9, 12; Grup D2 Faktör (9), 46; Grup E Faktör 1, 3, 10, 15, 19, 34; Grup E1 Faktör 3, 10; Grup E2 Faktör 3, 15; Grup E3 Faktör (3), (15), 34; Grup E4 Faktör 1, 3, 19;

4. Faktör Antiserumları: *Salmonella* O Antiserum faktör 2; faktör 4; faktör 4,5; faktör 5; faktör 7; faktör 8; faktör 9; faktör 10; faktör 12; faktör 14; faktör 15; faktör 19; faktör 20; faktör 22; faktör 23; faktör 25r; faktör 27; faktör 34;

H Antiserumları:

1. Spicer-Edwards Antiserumları: 1, 2, 3, 4;

2. Polivalan Antiserumlar: *Salmonella* H Antiserum Poly a-z; Poly A; Poly B; Poly C; Poly D; Poly E;

3. Kompleks Antiserumlar: EN, G, L, Z4;

4. Single Factor Antiserumlar: 1 complex, 2, 5, 6, 7;

5. Diğer Faktör Antiserumları: a, b, c, d, eh, f, h, i, k, m, p, r, s, t, w, x, y, z, Z6, Z10, Z13, Z15, Z23; O antiserum Vi (Becton Dickinson) H:G(H: f,g g,m g,p u g,q g,s,t,m,t g,z51 g,z62 g,z63), H:L(H:l,v l,w l,z13 l,z28 l,z40), H:e,n,x, H:v, H:e,n,z15, HDM:1,2 1,5 1,6 1,7 Z6, HMF:Z27,Z36,Z52,Z53,Z54,Z55,Z57, H:Z6, H:35, H:39, H:p, H:q, H:s, H:s, H:t, H:u, H:z51, H:Rz66, H:z57 (Statens Serum Institut) kullanılmıştır. Serotiplendirme işlemlerinde kalite kontrol antijenleri (QC Antigen *Salmonella* O Group A, B, C1, C2, D, E1, E2, E4, ve *Salmonella* Vi) pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Konvansiyonel Serotiplendirme

Bu işlemde, White-Kauffmann-Le Minor Şeması Grimont ve arkadaşları (13) ve Guibourdenche ve arkadaşları (96) temel alınarak, serogruplandırma (somatik - O antijenik yapılarının belirlenmesi) ve serotiplendirme (flagellar - Faz1 ve Faz 2 antijenik yapıların belirlenmesi) için ticari anti-serumlar kullanılarak gerçekleştirildi. Somatik antijen analizleri için lam aglütinasyon testi, flagellar faz antijen analizleri için ise hem tüp aglütinasyon hem de lam aglütinasyon testi uygulandı.

İzolatların Otoaglütinasyon Özelliğinin Test Edilmesi

Nutrient Agar (Oxoid, CM0003)'da saf olarak üretilen izolattan bir öze dolusu alınarak lam üzerine daha önceden damlatılmış olan 1 damla % 0.85'lik NaCl (Merck, K25659900.925) içerisinde emülsifiye edildi. Lam 1 dakika dairesel hareketlerle çevrildikten sonra, aglütinasyon olup olmadığı incelendi. Aglütinasyon meydana

geldiğinde, (otoaglutinasyon), bu izolatın kültürü ‘Rough’ (R) olarak kabul edildi ve sero gruplandırmaya geçilmeyerek, test tekrar edildi. Tekrar aglutinasyon oluşmaması sonrasında, kültürün tiplendirilmesine geçildi. Otoaglutinasyon göstermeyen izolatlar ise direkt olarak sero gruplandırmada kullanıldı.

Sero gruplandırma

Sero gruplandırma işleminde izolatın O antiserumları - 1. Polivalan antiserumlar bölümünde belirtilen antiserumlar ile aglutinasyonu test edildi. Öncelikle Poly A ve Poly B ile test edilmiş olan izolat eğer bunlardan biri ile aglutinasyon vermişse, O antiserumları - 2. Monovalan Grup antiserumları ile test edilerek hangi sero gruba ait olduğu belirlendi. Grup antiserum testinde de önce O Grup Antiserum B, D ve C1 (en sık rastlanan sero gruplar olduğu için)’e karşı aglutinasyon test edildi. Poly A ve Poly B ile test edilen izolat bu iki antiserum ile de aglutinasyon vermezse *Salmonella* Antiserum Vi ile test edildi. Bu antiserum ile pozitif aglutinasyon veren izolat ısıtıldıktan sonra yeniden aynı antiserum ile test edildi. İzolatın ısıtma sonrasında *Salmonella* Antiserum Vi ile aglutinasyon vermemesi beklenerek ve bu doğrultuda bir sonraki adım olarak bu izolat diğer kalan Poly C antiserumu ile test edildi, bu sonuçlardaki pozitifliğe göre yukarıda belirtilen O antiserumları – 2. Monovalan Grup antiserumları ve O antiserumları - 3. Grup Faktör antiserumları ve 4. Faktör antiserumları ile test edilerek hangi sero gruba ait olduğu belirlendi. Sero gruplandırma işlemleri ve Vi antijen tespiti lam aglutinasyon testi ile yapıldı. Bir lam üzerine 1 damla antiserum konulduktan sonra Nutrient Agar (Oxoid, CM0309) üzerinde üreyen izole koloniden bir öze dolusu alınarak ve antiserum ile karıştırıldı. Negatif kontrolde bir damla antiserum 1 damla % 0.85’lik NaCl ile; pozitif kontrolde ise bir damla antiserum bir damla uygun kalite kontrol antijeni (QC Antigen *Salmonella*) ile karıştırıldı. Lamlar 1 dakika dairesel hareketlerle çevrildikten sonra aglutinasyon olup olmadığı incelendi ve bir dakika içerisinde görülen aglutinasyonlar pozitif olarak değerlendirildi.

Aglütinasyon Reaksiyonlarının Değerlendirilmesi

Lam ve tüp aglütinasyonlar +4 (%100 aglütinasyon; zemin açık veya yok denecek kadar puslu), +3 (%75 aglütinasyon; zemin çok az puslu), +2 (%50 aglütinasyon; zemin orta deveceli puslu), +1 (%25 aglütinasyon; zemin tam puslu) ve aglütinasyon negatif şeklinde derecelendirilerek üretici firma protokolüne uygun şekilde değerlendirme yapıldı. Pozitif kontrol suşları +3 ve üzeri derecede aglütinasyon verdi. Negatif kontrolde aglütinasyon görülmedi. Test edilen izolatların +3 ve yukarı aglütinasyonları pozitif, +2 ve aşağı derecede aglütinasyon gösteren izolatlar ile aglütinasyon süresi bir dakikayı geçenler negatif olarak değerlendirildi. Bu işlemlerin ardından H antijen identifikasyonu için ileri serotiplendirme aşamalarına geçildi.

Serotiplendirme

Faz 1 ve Faz 2 antijenlerinin belirlenmesi amacı ile yapılan, serotiplendirme işlemleri için tüp aglütinasyon testi uygulandı. İlk serotiplendirme işlemleri en sık izole edilen *Salmonella* serotiplerinin tespitine yönelik olarak Spicer-Edwards antiserumlarıyla yapıldı. Bu işlem sonuçlarına göre Polivalan Salmonella H Antiserumları Poly a-z; Poly A; Poly B; Poly C; Poly D; Poly E; Kompleks antiserumlar EN, G, L, Z4; Single Factor antiserumlar: 1 complex, 2, 5, 6, 7; ve Diğer faktör antiserumları: a, b, c, d, eh, f, h, i, k, m, p, r, s, t, w, x, y, z, Z6, Z10, Z13, Z15, Z23 ile test edildi. Bu aşamadan sonra faz döndürme işlemi yapılarak diğer faz antijenlerinin belirlenmesine yönelik testler gerçekleştirildi. Serotiplendirmede kullanılan tüp aglütinasyon testi ön aşaması, tüp aglütinasyon testi, faz dönüşüm işlemi ile Spicer-Edwards aglütinasyon işlemleri aşağıdaki şekilde yapıldı: Tüp aglütinasyon testi öncesinde hazırlık olarak % 0.6'lık formalinize % 0.85'lik NaCl solüsyonu hazırlandı. Test edilecek izolatın hareketliliğinin artırılması amacı ile birkaç kez içinde cragie tüpü bulunan Motility GI Medium (Becton Dickenson, 286910)'da pasaj yapılmış ve hareketliliği belirlendikten sonra Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Oxoid, CM1115)'da üretilen izolat eşit miktarda % 0.6 formalinize % 0.85'lik NaCl ile suspanse edilerek turbiditesi McFarland No.3'e ayarlandı. Tüp aglütinasyonu ve Spicer-Edwards aglütinasyon testi için üretici firma protokolüne uygun şekilde dilue edildi ve farklı tüplerde hazırlanan 0.5 ml antiserumlar ile test edilecek izolatın kültürü 50 ± 2 °C'deki su banyosunda 1 saat inkübe edildi. Tüplerin su banyosu içindeyken veya su banyosundan

çıkarılma esnasında ayrıca, okunmadan önce sallanmamasına ve çalkalanmamasına dikkat edildi. Tüp test aglütinasyon sonuçları lam aglütinasyon değerlendirmesi esaslarıyla aynı esaslara göre yorumlanarak test sonuçları okundu. Her testte ayrı bir tüpte 0.5 ml kültür ile 0.5 ml % 0.85'lik NaCl solusyonu karıştırılarak negatif kontrol olarak değerlendirildi. Faz döndürme işlemi için istenenin aksi olan antiserum hazırlandı. Örneğin, Motility GI Medium'da *S.Typhimurium* Faz 1[i] olan ile *S.Typhimurium*, içerisinde i antiserumu olan ortama konularak Faz 2 [1,2]'nin üremesi ve yayılması sağlandı. Faz dönüşümü için hazırlanan Motility GI Medium'un 25 ml'sine karşı faz antiserumunun 1:10 dilusyonundan 1 ml katıldı, iyice karıştırılarak steril petrilere döküldü. Kültür, besiyerinin kenar kısmına inokule edildi ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnoküle edildiği noktanın ters tarafındaki üremesinden BHI Broth'a ekim yapıldı ve bu faz için tüp aglütinasyonu tekrar edildi.

SE-rPCR Templeyt Hazırlama

PCR öncesi templeyt hazırlama amacı ile Çarlı ve arkadaşlarının (114) hücre patlatma metodu modifiye edilerek uygulandı. Eppendorf tüpleri içerisinde -80 °C derin dondurucuda saklanan örnekler, Nutrient agar'da 37 °C de 24 saatlik inkübasyon ile üretildikten sonra 100 µL % 0.85'lik NaCl fizyolojik tuzlu suda 2 kez yıkandı. Elde edilen pelet 20 µL deiyonize suda vorteksle homojenize edildikten sonra 95°C blok ısıtıcıda (Techne, DB-2D - FDB02DD) 10 dakika inkübasyonun ardından 18,000 × g'de 3 dakika santrifüj (Thermo Scientific, MicroCL 17) edildi. Tüpte üstte kalan sıvı PCR'da templeyt olarak kullanılmak üzere steril DNaz içermeyen bir eppendorf tüpüne aktarıldı. İzole edilen DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu Nanodrop Spektrofotometre (Thermo Scientific, ND-1000) kullanılarak DNA örneklerinin saflıkları ve konsantrasyonları ölçüldü. Miktarı 20 ng/µl, ABS260/ABS280 değeri 1.6-2.0 aralığında olan DNA izolatları analizlerde kullanıldı.

SE-rPCR

SE-rPCR için Wang ve arkadaşlarının (22) *S. Enteritidis* fimbria genine (sefb accession number L11009) spesifik ve tarafımızdan dizayn edilmiş olan bir forward primer olan ZA_596614 (5'-ATATTAAATCTGGTAATTT-3') ve bu literatürde belirtilen

ve dizide 661 ile 680. Bazlar arasına denk gelen reverse primer SefB661R (5'-TGTACTIONCACCAAGGTAATTG- 3') ile bu iki dizi arasında bir Taqman probu olarak dizayn edilen ZA_640660 (5' - FAM - GCATATCCAAATGGCTCAAT- TAMRA - 3') kullanıldı. SE-rPCR'da yer alan internal amplifikasyon kontrol (IAC) dizisi *Escherichia coli*'nin Lambda fajına spesifik bir dizi olan CGTCAGTGTGAAGCGGTTATAAATCTGCTCTTTTCGCGGTATCCGTACCGATTTC GGTAAGGTAAACCCCGTTTTTGTTCGCTTACGTGGCAT olup buna spesifik IAC probu dizisi 5' - HEX-TGCTCTTTTCGCGGTATCCGTACCGAT-TAMRA - 3' ile forward ve reverse primerler sırasıyla 5'- CGTCAGTGTGAAGCGGTTATAA - 3' ve 5'- ATGCCACGTAAGCGAAACA -3' olarak belirlendi (Way2Gene, BN 15-0001-01, Genmar, Türkiye). LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, 03531414201) cihazında gerçekleştirilmiş olan *Salmonella* 5' nükleaz (TaqMan) rPCR reaksiyon karışımı (Way2Gene, BN 15-0001-01, Genmar, Türkiye) toplam 10 µl olup 2.5 µl S.detection mix (primerler ve problemleri içeren parametre-spesifik reaktifler), 1 µl IC DNAsı, 2 µl PCR-grade su, 2 µl enzim karışımı (enzim, dNTP mix, reaksiyon bufferı) ve 2.5 µl templeyt DNA (pozitif kontrol ve örnekler için DNA, negatif kontrol için su)'dan oluştu. Reaksiyon parametreleri 11 dakika 95 °C'de ön denaturasyon sonrasında, 40 siklus 95°C'de 10 saniye denaturasyon, 58°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 5 saniye uzama olarak belirlendi. *Salmonella* hedef DNA'sı floresan sinyali 530 nm kanalında, IAC floresan sinyali ise 560 nm kanalında tespit edilerek okundu.

İstatistiksel Analiz

Relatif doğruluk, duyarlılık, özgüllük değerleri ISO 16140 protokolünün tarif ettiği şekilde hesaplandı (115). Karşılaştırılan testler arasındaki uyuşmanın güvenilirliğini ölçen Cohen'nin kappa testi ile relatif doğruluk, duyarlılık, özgüllük hesaplamaları yapıldı (116).

MLST DNA İzolasyonu

Salmonella kolonileri içerisinde 200 mg 0.5 mm çaplı cam boncuk ve 400 µl 0.1 M Tris-HCl pH 8,0 bulunan tüplere transfer edildi. Homojenizatör kullanılarak örnekler (*Salmonella* kolonileri) 4032×G'de, 1 dk homojenize edildi. Örneklerin üzerine 400 µl

bağlama çözeltisi (4 M Guanidine thiocyanate, 20 mM Tris-HCl, pH 8) eklendi ve 10 dk 95 °C’de inkübe edildi. Oda sıcaklığına getirilen örneğe 400 µl 2-propanol eklenerek silika kolona yüklendi. 11200×G’de 1 dk santrifüj ile kolondan geçirilen örnekteki DNA’lar silika kolonda tutuldu, daha sonra iki defa yıkama çözeltisi (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 8; 80% v/v Etanol) ile yıkandı. Silika kolon santrifügasyonla kurutuldu. Silika kolonda tutulan DNA’lar 100 µl nükleaz içermeyen, steril, deiyonize su (pH 7) ile kolondan toplandı. Nanodrop Spektrofotometre kullanılarak DNA örneklerinin saflıkları ve konsantrasyonları ölçüldü. Miktarı 20 ng/µl, ABS₂₆₀/ABS₂₈₀ değeri 1.6-2.0 aralığında olan DNA izolatları analizlerde kullanıldı.

MLST Amaçlı İlk Real-Time PCR (rPCR)

ThrA (aspartokinase+homoserine dehydrogenase), purE (phosphoribosylaminoimidazole carboxylas), sucA (alpha ketoglutarate dehydrogenase), hisD (histidinol dehydrogenase), aroC (chorismate synthase), hemD (uroporphyrinogen III cosynthase) ve dnaN (DNA polymerase III beta subunit) hizmetçi genleri Tablo-6’da verilen primer çiftleri ve kalıp DNA’ların kullanıldığı rPCR ile çoğaltıldı. MLST veri tabanında gen çoğaltımı için önerilen primer çiftleri kullanıldı (117). rPCR için *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 organizmasına ait proof-reading aktiviteli KOD DNA polimeraz enziminin yüksek aktiviteli rekombinant bir modifikasyonu kullanıldı. QPCR 10 s 95°C (ilk döngüde 10 dk), 5 s primerlere özgü bağlanma sıcaklığında (53-60°C), 10 s 72°C koşullarında gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 1x Reaksiyon Tamponu, 0.1U High Fidelity KOD DNA Polimeraz, 1x SybrGreen-I, 5 ng/µl kalıp DNA ve her bir primerden 0.5 µM içeren 20 µl’lik hacimlerde gerçekleştirildi. RPCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 65°C - 95°C arasında erime eğrisi analizi yapıldı. Bütün reaksiyonlarda ABI® 7500 Fast Real-Time PCR cihazı (Applied Biosystems, Amerika) kullanıldı. rPCR verileri ABI® 7500 Fast cihazının yazılımı kullanılarak analiz edildi.

Tablo-6. MLST amaçlı ilk rPCR reaksiyonlarında kullanılan primer çiftleri

Primer Adı	5'-3' DNA dizisi
thrA-F	GTCACGGTGATCGATCCGGT
thrA-R	CACGATATTGATATTAGCCCG
purE-F	GACACCTCAAAAGCAGCGT
purE-R	AGACGGCGATAACCCAGCGG
sucA-F	CGCGCTCAAACAGACCTAC
sucA-R	GACGTGGAAAATCGGCGCC
hisD-F	GAAACGTTCCATTCCGCGC
hisD-R	GCGGATTCCGGCGACCAG
aroC-F	CCTGGCACCTCGCGCTATAC
aroC-R	CCACACACGGATCGTGGCG
hemD-F	GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG
hemD-R	ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA
dnaN-F	ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA
dnaN-R	AATTTCTCATTTCGAGAGGATTGC

MLST Amaçlı İkinci rPCR ve HRM Analizi

rPCR ile çoğaltılan genlerin kalıp olarak kullanıldığı ve ilk rPCR reaksiyonu ile çoğaltılan gen bölgesinin içinde, MLST tiplendirmesi için gerekli daha küçük gen bölgesinin hedeflendiği ikinci rPCR gerçekleştirildi. İkinci rPCR reaksiyonları ve sonrasında yapılan HRM analizi ile genler DNA dizilerine göre gruplandırıldı. MLST veri tabanında DNA dizi analizi için önerilen primer çiftleri, ikinci rPCR reaksiyonlarında kullanıldı (Tablo-7) (117). PCR 10 s 95°C (ilk döngüde 3 dk), 5 s primerlere özgü bağlanma sıcaklığında (53-60°C), 10 s 72°C koşullarında gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 1x Reaksiyon Tamponu, 0.1U High Fidelity KOD DNA Polimeraz, 1x EvaGreen-I HRM boyası, 5 ng/μl kalıp DNA ve her bir primerden 0.5 μM içeren 20 μl'lik hacimlerde gerçekleştirildi. PCR sonrasında yapılan HRM analizinde

sıcaklık 50°C'den 95°C'ye 0.05°C/sn hızla çıkartılırken, bu sırada sürekli floresan okundu ve yüksek çözünürlükte erime eğrileri elde edildi. ABI® 7500 Fast Real-Time PCR cihazı'na ait yazılım kullanılarak elde edilen yüksek çözünürlükte erime eğri verileri bir Excel dosyasına aktarıldı. Bu dosya tez kapsamında Reja ve arkadaşları (28) tarafından tanımlanan istatistiksel yaklaşım temel alınarak, TUBITAK 113Y179 projesi kapsamında geliştirilen HRM analiz yazılımına yüklendi. HRM yazılımı sıcaklık-floresan şiddeti ham verilerini sıcaklık - % floresan değişimi olacak şekilde normalize etti. Elde edilen normalize erime eğrisi profillerinin, bir gen amplikonu referans alınarak erime eğrisi profilinden farkları alındı. Bu şekilde farklılık profilleri oluşturuldu. Bu farklılık profilleri analiz edilen DNA'nın dizisine spesifik olacağı için, profiller proje kapsamında oluşturulan ve yazılımın içine gömülü bir veri bankasında saklandı.

Tablo-7. İkinci rPCR ve HRM reaksiyonlarında kullanılan primer çiftleri

Primer Adı	5'-3' DNA dizisi
thrAHRM-F	ATCCCGGCCGATCACATGAT
thrAHRM-R	ACCGCCAGCGGCTCCAGCA
purEHRM-F	ACAGGAGTTTTAAGACGCATG
purEHRM-R	GCAAACCTTGCTTCATAGCG
sucAHRM-F	CCGAAGAGAAACGCTGGATC
sucAHRM-R	GGTTGTTGATAACGATACGTAC
hisDHRM-F	GTCGGTCTGTATATTCCCGG
hisDHRM-R	GGTAATCGCATCCACCAAATC
aroCHRM-F	GGCGTGACGACCGGCAC
aroCHRM-R	AGCGCCATATGCGCCAC
hemDHRM-F	GCCTGGAGTTTTCCACTG
hemDHRM-R	GACCAATAGCCGACAGCGTAG
dnaNHRM-F	CCGATTCTCGGTAACCTGCT
dnaNHRM-R	ACGCGACGGTAATCCGGG

MLST Amaçlı DNA Dizi Analizi

İzole edilen genomik DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı, hedef *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* ve *thrA* gen bölgelerinin çoğaltıldığı rPCR sonucunda tüpte bulunan nükleotidler, floresan boyalar vb. PCR bileşenleri silika DNA kolonları ve DNA bağlama tamponları kullanılarak dizi analizi öncesi reaksiyon sıvısından uzaklaştırıldı. DNA dizi analizleri Sanger dideoksi zincir terminasyonu yöntemiyle, ABI Prism 377 DNA Dizileme cihazı (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen diziler 4peaks yazılımı (118) ile analiz edildi. Dizilerin gen bankasında en çok benzer olduğu DNA dizileri National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST (119) programı kullanılarak belirlendi. Dizi analizi sonucu elde edilen diziler *Salmonella enterica* MLST veri bankasında mevcut allel tipleriyle karşılaştırılarak dizi analizi tabanlı tiplendirme yapıldı (110).

BULGULAR

SE-rPCR ve Konvansiyonel Serotiplendirme Bulguları

Çalışmada piliç eti, hindi eti, yumurta ve kanatlı orijinli 58 *Salmonella* izolatu, konvansiyonel serotiplendirme/serogruplandırma yapılmadan, öncelikle SE-rPCR ile değerlendirildi. ZA_596614 ve SefB661R primer çiftleri kullanılarak ilk defa SE-rPCR tasarlandı. LightCycler PCR koşulları altında geliştirilmiş SE-rPCR yöntemi ile serotiplendirilen 58 *Salmonella* izolatının 36 (%62)'si *S. Enteritidis* pozitif, 22 (%38)'si de *S. Enteritidis* negatif olarak belirlendi. Konvansiyonel serotiplendirme ile 58 *Salmonella* izolatının 32 (%55)'si *S. Enteritidis* olarak serotiplendirilirken, 2 (%3)'si B grubu, 9 (%16)'u C₁ grubu, 1 (%2)'i C₂-C₃ grubu olarak serogruplandırılmış olmasının yanında, kalan 14 (%24) izolat serogruplandırılmadı/serotiplendirilemedi. *S. Enteritidis*, çalışmadaki her iki yöntemde de tüm izolatlar içinde baskın serotip olarak tespit edilmiştir. White-Kauffmann-Le Minor şemasına göre serotiplendirilen izolatların SE-rPCR ve konvansiyonel serotiplendirme sonuçları Tablo-8'de gösterildi.

Salmonella spp. izolatlarının SE-rPCR ve konvansiyonel serotiplendirme sonuçları 4 (20,75,76 ve 250 numaralı) izolat dışında tam bir uyum gösterdi. Hindi boyun eti kaynaklı 75, 76; piliç eti (bütün piliç) kaynaklı 20; kanatlı (karga barsak) kaynaklı 250 numaralı izolatlar SE-rPCR ile *S. Enteritidis* olarak serotiplendirilirken, konvansiyonel serotiplendirme (mevcut antiserumlarla) ile serogruplandırılmamış / serotiplendirilememiştir.

S. Enteritidis serotiplendirilmesinde SE-rPCR (moleküler yöntem) sonuçlarının konvansiyonel serotiplendirme (serolojik yöntem) sonuçlarıyla karşılaştırıldığı istatistiksel analizler sonrasında testler arasındaki relatif doğruluk, duyarlılık ve özgüllük oranlarına önemli derecede etkisi olan, hiçbir yanlış negatif sonuçla karşılaşılmaı. Testler arası relatif doğruluk, duyarlılık ve özgüllük oranları sırasıyla %93, %100 ve %85 olarak belirlendi (Tablo-9). SE-rPCR ile konvansiyonel serotiplendirme arasındaki karşılaştırmalı uyumun güvenilirliğini ölçen Cohen'nin kappa katsayısı 0.86 olarak tespit edildi. Bu oranın

0.86 olarak bulunması sonuçlar açısından, her iki test arasında neredeyse mükemmel bir uyum olduğunu gösterdi.

Test sonuçlarının alınmasına kadar geçen süre açısından, her iki yöntem arasında belirgin farklılık tespit edildi. İzolatların saklandığı koşullardan (-80 C° lik saklama sıcaklığı) üretilmelerinin ardından, DNA ekstraksiyonu, SE- rPCR işlemi ve sonuçların değerlendirilmesi 5 saatlik sürede gerçekleştirildi. Buna karşın izolatların saklandığı koşullardan (-80 C° lik saklama sıcaklığı) üretilmelerinin ardından konvansiyonel serotiplendirme sonuçları en kısa olarak 3 günde tamamlanabildi.

Tablo-8. Tavuk eti, hindi eti, yumurta ve kanatlı orjinli *Salmonella* izolatlarının SE-rPCR ve konvansiyonel serotiplendirme sonuçları

Örnek tipi	Örnek sayısı (örnek adı)	SE-PCR		Serogrup				Serotiplendirilmedi
		Negatif	Pozitif	B (O:4)	C1 (O:7)	C2-C3 (O:8)	D1 (O:9)	
<i>Tavuk eti</i>								
kanat	5 (5, 6, 8, 12, 99)	1 (99)	4 (5, 6, 8, 12)	0	1 (99)	0	4 (<u>5, 6, 8, 12</u>)	0
bütün tavuk	3 (20, 21, 28)	1 (21)	2 (20, 28)	0		0	1 (<u>28</u>)	2 (20,21)
kalçalı but	6 (47, 54, 94, 95, 96, 97)	4 (94, 95, 96, 97)	2 (47, 54)	0	2 (95, 96)	0	2 (<u>47, 54</u>)	2 (94, 97)
drumstick	4 (90, 92, 98, 100)	4 (90, 92, 98, 100)	0	0	2 (90, 92)	0	0	2 (98, 100)
Toplam tavuk eti	18	10	8	0	5	0	7	6
<i>Hindi eti</i>								
boyun	4 (75, 76, 78, 88)	1 (78)	3 (75, 76, 88)	0	0	1 (78)	1 (<u>88</u>)	2 (75,76)
Toplam hindi eti	4	1	3	0	0	1	1	2
<i>Yumurta</i>								
iç	8 (122, 131, 148, 151, 152, 153, 154, 155)	1 (131)	7 (122, 148, 151, 152, 153, 154, 155)	0	1 (131)	0	7 (<u>122, 148, 151, 152, 153, 154, 155</u>)	0
kabuk	5 (126, 127, 139, 146, 147)	2 (126, 127)	3 (139, 146, 147)	0	0	0	3 (<u>139, 146, 147</u>)	2 (126, 127)
Toplam yumurta	13	3	10	0	1	0	10	2
<i>Kanatlı</i>								
tavuk dışkı	9 (173, 271, 273, 275, 287, 288, 289, 292, 298)	5 (173, 271, 273, 287, 288)	4 (275, 289, 292, 298)	2 (271, 287)	1 (173)		4 (<u>275, 289, 292, 298</u>)	2 (273, 288)
kloakal svap	3 (202, 220, 249)	2 (202, 220)	1 (249)	0	2 (202, 220)	0	1 (<u>249</u>)	0
karga barsak	1 (250)	0	1 (250)	0	0	0	0	1 (250)
tavuk barsak	3 (251, 253, 259)	1 (259)	2 (251, 253)	0	0	0	2 (<u>251, 253</u>)	1 (259)
tavuk göz	1 (254)	0	1 (254)	0	0	0	1 (<u>254</u>)	0
drag svap	6 (BA, B98, B99, B100, B104, B128)	0	6 (BA, B98, B99, B100, B104, B128)	0	0	0	6 (<u>BA, B98, B99, B100, B104, B128</u>)	0
Toplam kanatlı	23	8	15	2	3	0	14	4
Toplam	58	22	36	2	9	1	32	14

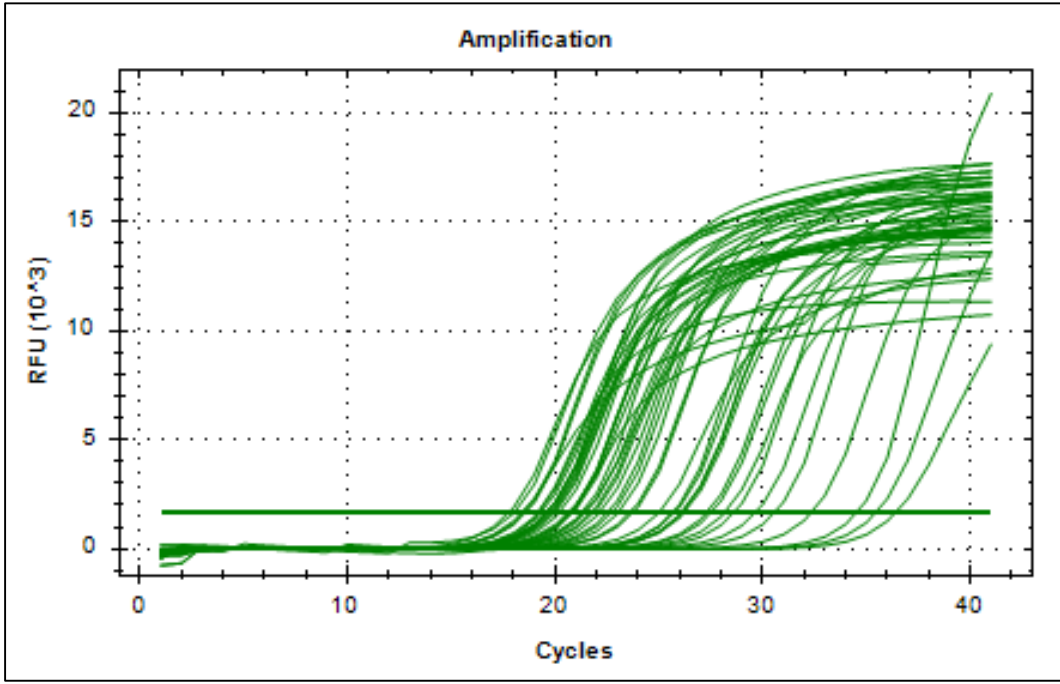
Parantez içinde altı çizili ve kalın: *S. Enteritidis* olarak serotiplendirilenler

Tablo-9. SE-rPCR metodunun relatif doğruluk, duyarlılık ve özgüllük sonuçları

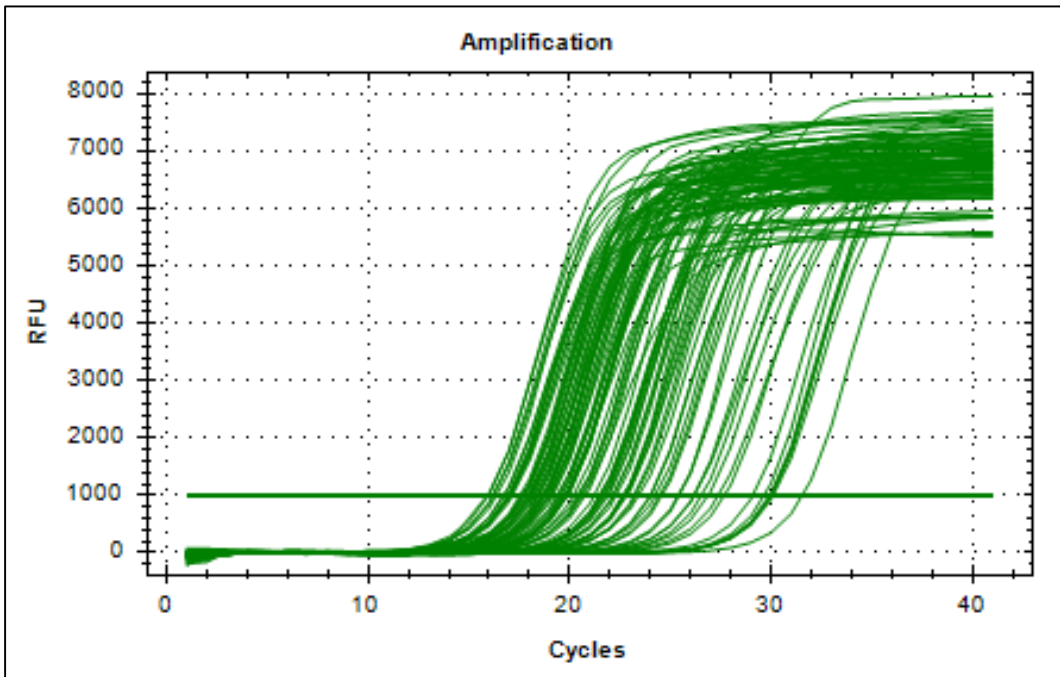
Referans metot		Alternatif metot		Doğruluk(%)	Duyarlılık(%)	Özgüllük(%)	Cohen kappa değeri
Pozitif	Negatif	Yanlışnegatif	Yanlışpozitif				
Konvansiyonel serotiplendirme		SE-rPCR					
32	26	0	4	93	100	85	0.86

MLST Amaçlı İkinci rPCR Bulguları

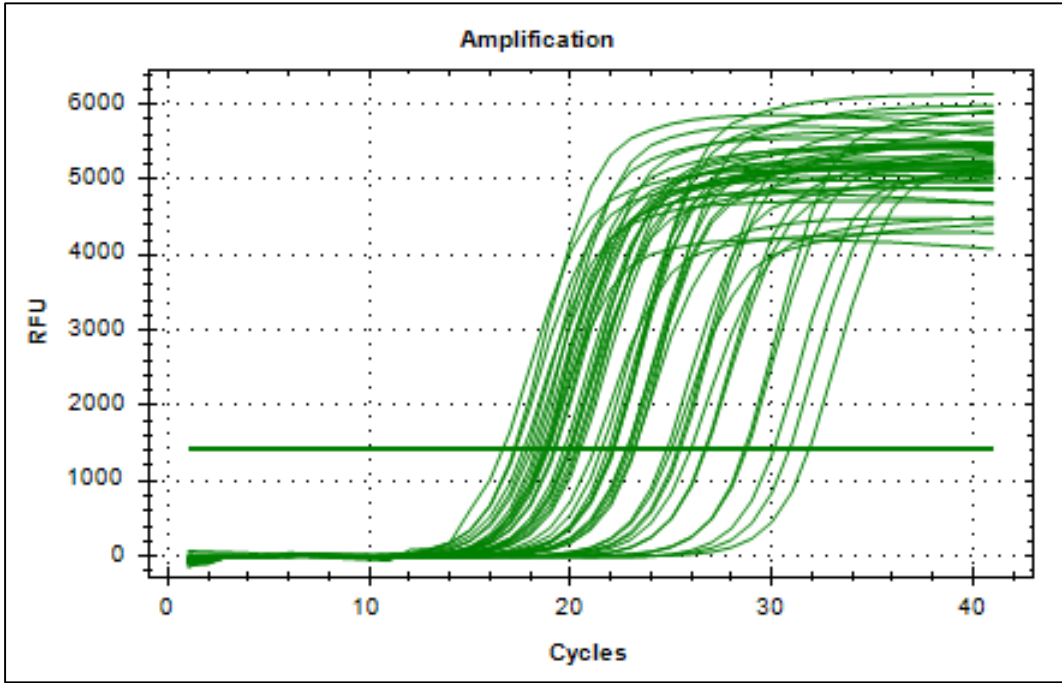
Daha önce konvansiyonel serotiplendirme ile tespit edilmiş olan 94, 97, 98, 100, 127, 259, 273, 288 nolu izolatların MLST analizi için yeniden canlandırma işlemi sırasında canlılıklarını yitirdikleri belirlendi. Bu nedenle bu izolatlar MLST çalışmasında kullanılmadı. MLST amaçlı ikinci rPCR sonucunda elde edilen çoğalma eğrileri Şekil-5(a-g)'de verilmiştir. Çoğalma eğrileri kullanılarak hesaplanan eşik döngü sayıları (Ct) ise Tablo-10'da verilmiştir. Bir örnekte hedef DNA ne kadar çok ise, elde edilen Ct değeri o kadar düşük olmaktadır. AroC, dnaN, hemD, hisD, purE, sucA ve thrA hedefli rPCR ile elde edilen Ct değerlerinin tümü 40'in altında olduğu için, rPCR ile DNA çoğaltması işleminin başarılı olduğu sonucuna varıldı. Elde edilen Ct değerleri arasındaki farklılıkların, elde edilen kalıp DNA'ların saflık ve miktarları arasındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada amaç DNA sayımı değil, DNA dizilerinin elde edilmesidir. Bu nedenle DNA çoğaltımının başarılı olması bir sonraki analize geçmek için yeterli olmuştur.



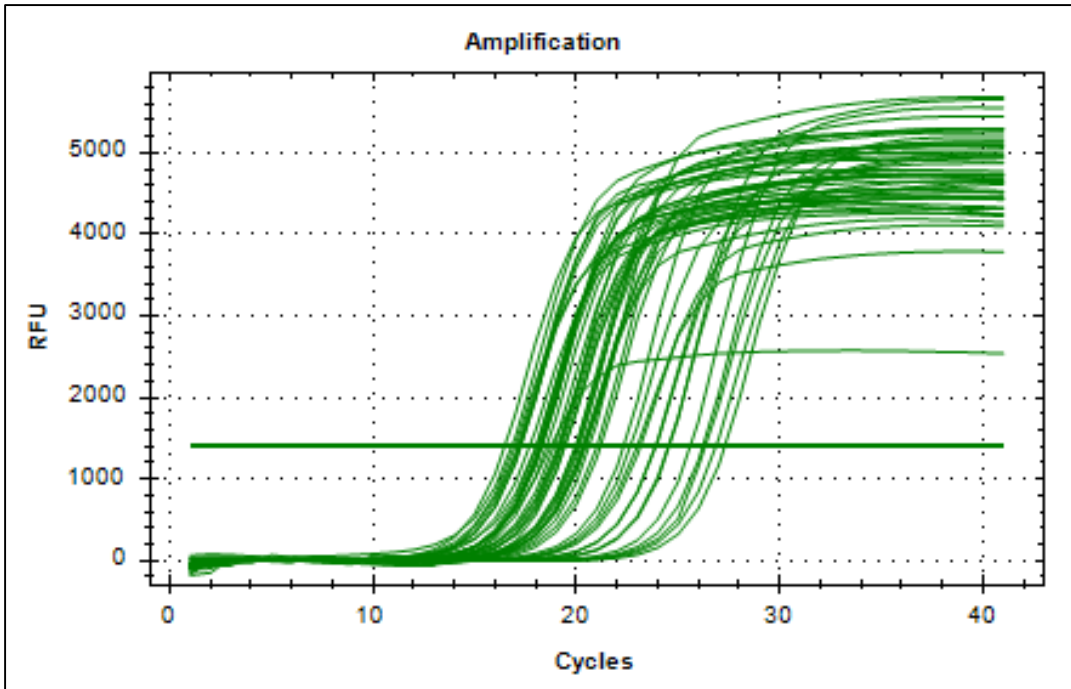
Şekil-5a. AroC hedefli rPCR çoğalma eğrileri



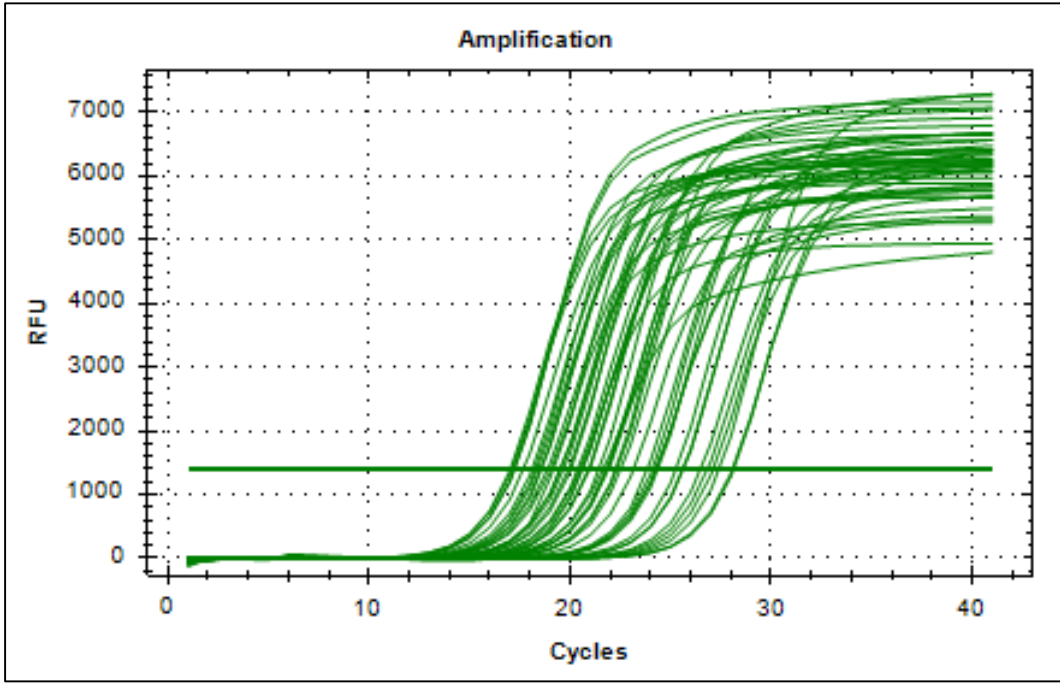
Şekil-5b. DnaN hedefli rPCR çoğalma eğrileri



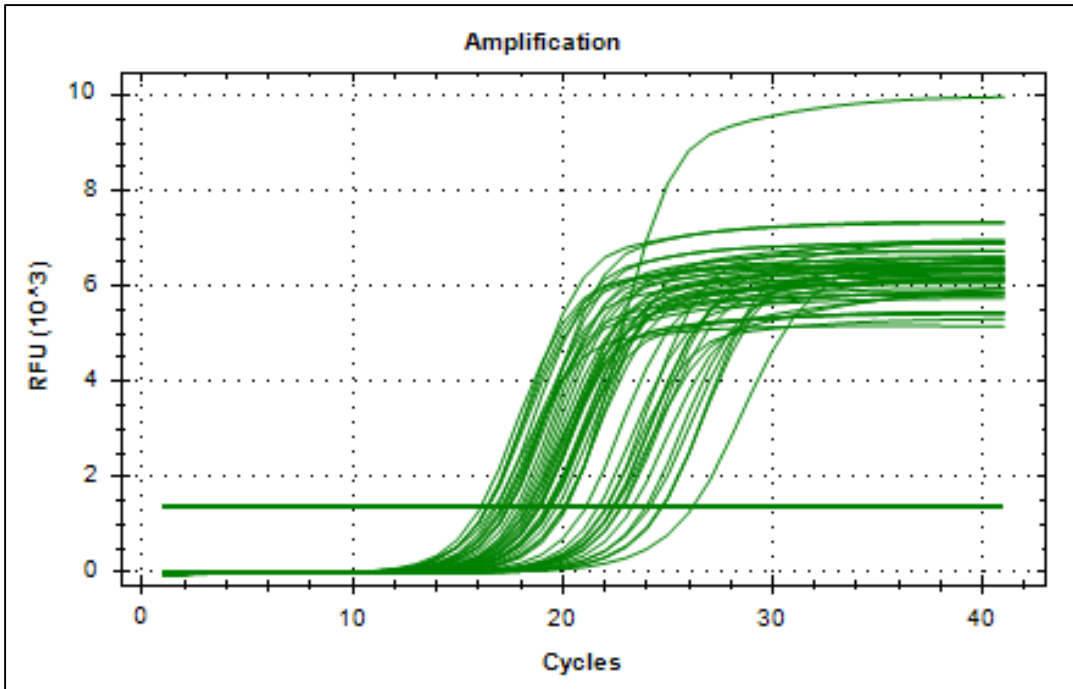
Şekil-5c. HemD hedefli rPCR çoğalma eğrileri



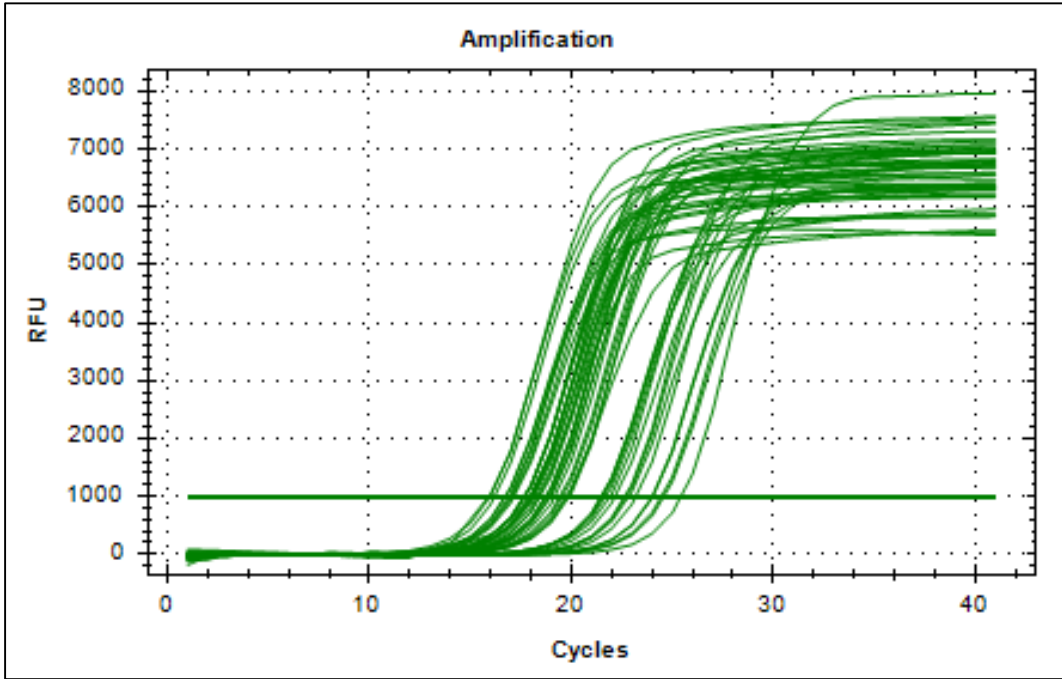
Şekil-5d. HisD hedefli rPCR çoğalma eğrileri



Şekil-5e. PurE hedefli rPCR çoğalma eğrileri



Şekil-5f. SucA hedefli rPCR çoğalma eğrileri



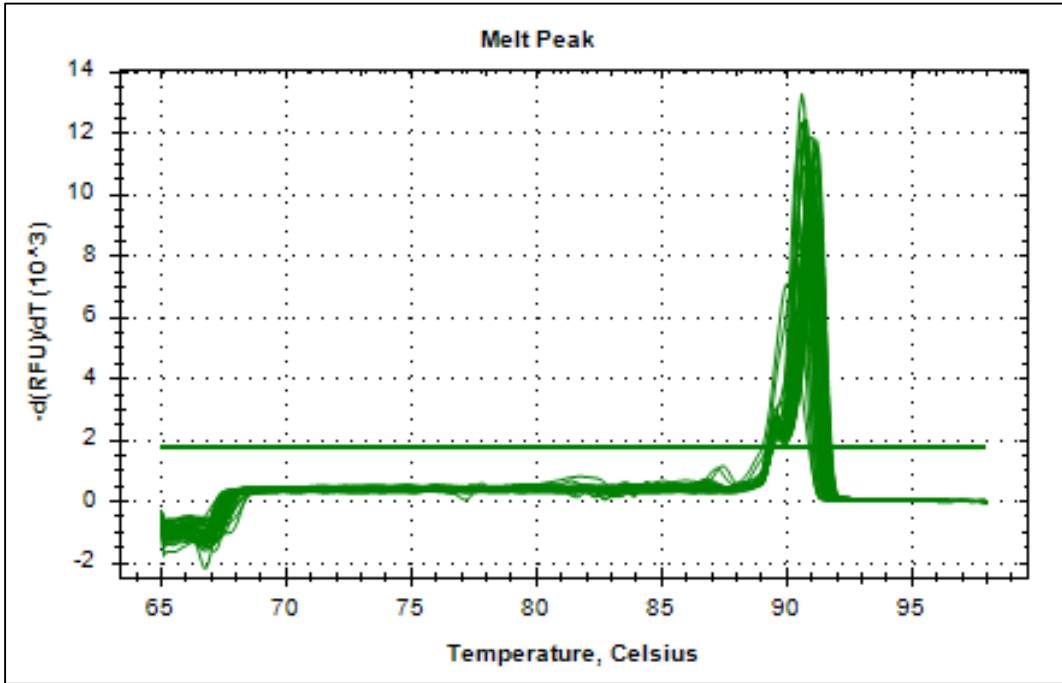
Şekil-5g. ThrA hedefli rPCR çoğalma eğrileri

Tablo-10. RPCR eşik döngü sayıları (Ct) ve erime sıcaklıkları (Tm)

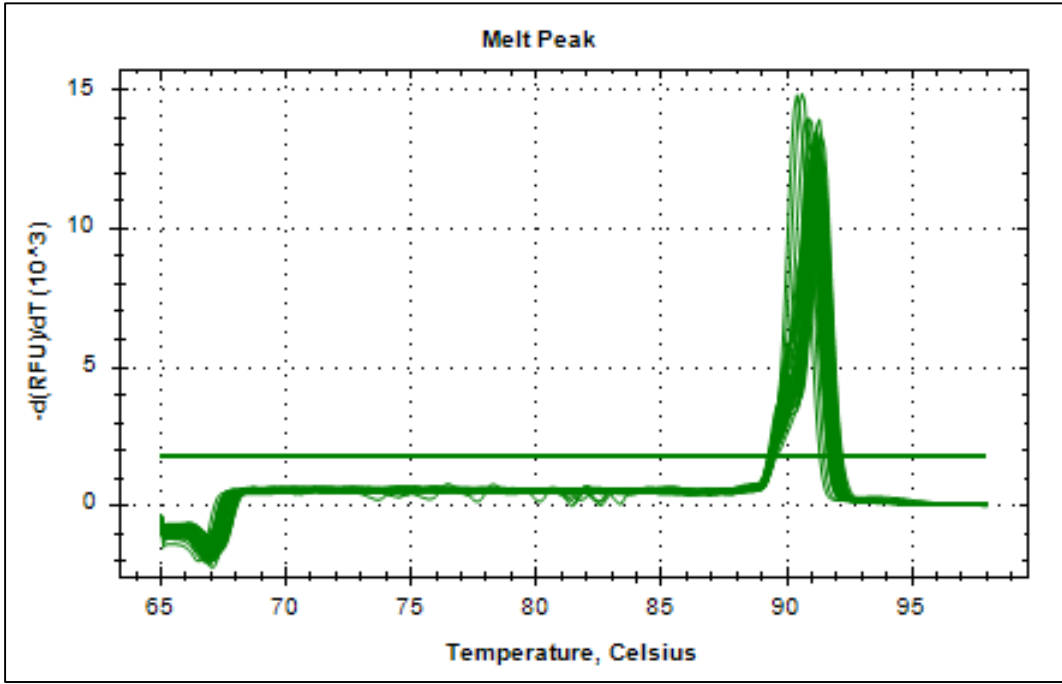
Örnek Adı	Eşik döngü sayıları (Ct)							Erime sıcaklıkları (Tm) (°C)						
	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA
5	28	20	24	22	18	22	15	92	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5
6	22	17	20	18	25	17	16	91,5	90,5	90,5	93	93	90,5	89,5
8	26	18	22	21	16	20	15	92	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5
12	17	16	19	14	24	13	24	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
20	34	26	31	27	24	26	21	90	91	90,5	93	93	90,5	89,5
21	21	23	28	17	21	16	14	92	91	90,5	93	92,5	90,5	89,5
28	23	15	18	18	24	18	16	91,5	91	90,5	93	93	90,5	89,5
47	26	18	19	21	16	20	19	92	90,5	90,5	93	93	90,5	89,5
54	29	21	25	23	19	22	21	92	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5
75	29	23	28	23	21	22	20	91,5	91	90,5	93	93	90,5	89,5
76	31	22	26	25	20	24	25	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
78	36	28	32	26	25	26	18	92	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5
88	18	20	24	14	18	14	15	91,5	91	90,5	91,5	92,5	90,5	89,5
90	25	17	18	20	15	19	19	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
92	29	21	25	23	19	22	29	91,5	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5
95	19	32	38	15	28	15	25	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
96	35	27	32	26	25	26	22	91,5	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5
99	22	24	29	18	22	17	23	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
122	33	25	30	26	23	25	18	92	91	90,5	91,5	93	91,0	89,5
126	28	20	24	22	18	22	17	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
131	22	19	23	18	17	17	15	92	90,5	90,5	93	93	90,5	89,5
139	25	17	20	19	25	19	16	90	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5
146	25	18	22	20	16	19	14	92	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5
147	23	15	18	18	15	18	15	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
148	24	16	17	19	16	18	16	90	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5
151	26	18	22	21	26	20	17	92	91	90,5	91,5	92,5	90,5	89,5

Örnek Adı	Eşik döngü sayıları (Ct)							Erime sıcaklıkları (Tm) (°C)						
	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA
152	27	19	23	22	17	21	22	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
153	22	24	29	18	22	17	15	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
154	24	16	17	19	15	18	17	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
155	23	19	23	18	17	18	19	92	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5
173	29	21	25	23	19	22	18	92	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5
202	28	20	24	22	18	21	19	90	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5
220	29	21	25	23	19	22	21	92	90,5	90,5	91,5	92,5	90,5	89,5
249	21	23	28	17	21	16	14	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
250	23	15	16	18	14	18	16	91,5	91	90,5	93	93	90,5	89,5
251	26	18	22	21	16	20	19	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
253	29	21	25	23	19	22	18	92	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5
254	23	20	24	18	18	18	15	92	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5
271	24	16	19	19	15	17	16	90	90,5	90,5	91,5	93	90,5	89,5
275	26	18	22	21	22	20	17	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
287	27	19	23	22	17	21	22	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
289	22	24	29	18	22	17	16	92	91	90,5	93	92,5	90,5	89,5
292	24	18	19	19	28	18	26	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
298	26	18	22	21	22	20	24	92	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5
B-100	28	22	26	19	25	18	16	91,5	91	90,5	93	92,5	90,5	89,5
B-104	22	24	26	21	16	20	15	91,5	90,5	90,5	93	93	90,5	89,5
B-128	27	22	22	14	24	14	22	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
B-98	27	25	19	27	24	26	21	91,5	91	90,5	93	93	90,5	89,5
B-99	21	19	23	19	21	17	14	92	91	90,5	93	93	90,5	89,5
B-A	29	19	22	18	24	18	16	92	91	90,5	91,5	93	90,5	89,5

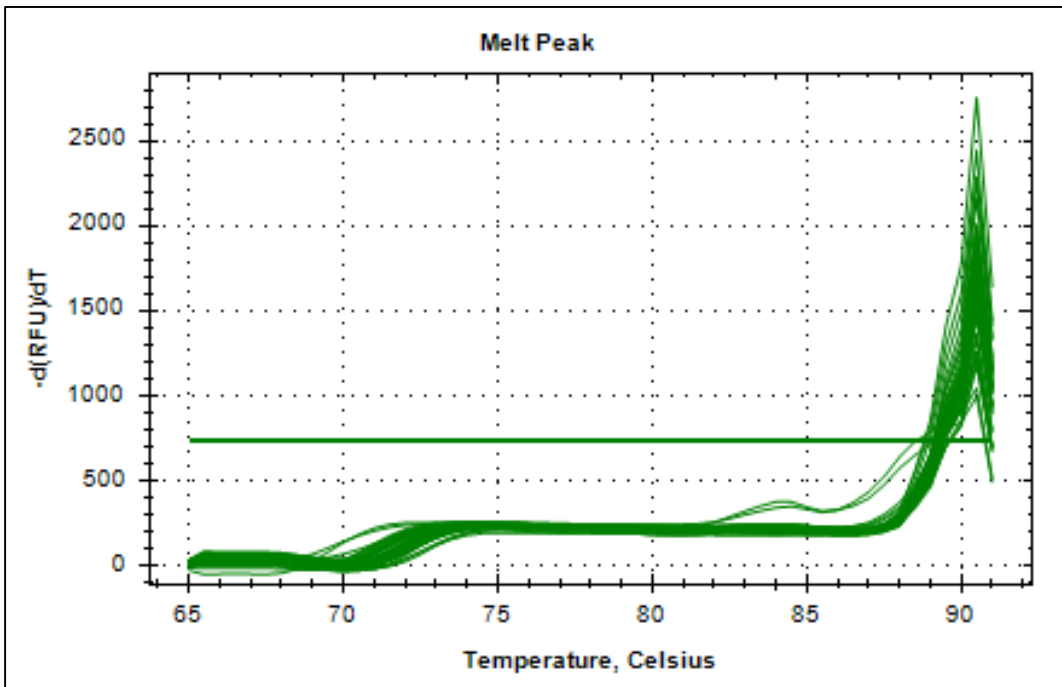
PCR sonucunda elde edilen erime pikleri Şekil-6 (a-g)'de verilmiştir. Erime pikleri kullanılarak hesaplanan erime sıcaklıkları (T_m) ise Tablo-10'da verilmiştir. T_m değerleri, rPCR ile çoğaltılan DNA'ların hedeflenen DNA bölgesi olup olmadığı hakkında bilgi vermektedir. Tüm hedefler için beklenen aralıklarda T_m değerleri ($T_m > 80^\circ\text{C}$) elde edilmiştir. Sonuç olarak, C_t değerlerinden hedeflerin çoğaltıldığı, T_m değerlerinden ise çoğaltılan DNA'nın hedef DNA olduğu anlaşılmıştır. Tezin ilerleyen aşamalarında tartışılacağı üzere, DNA dizi analizi sonuçları da hedef DNA'ların çoğaltılabildiğini doğrulamaktadır.



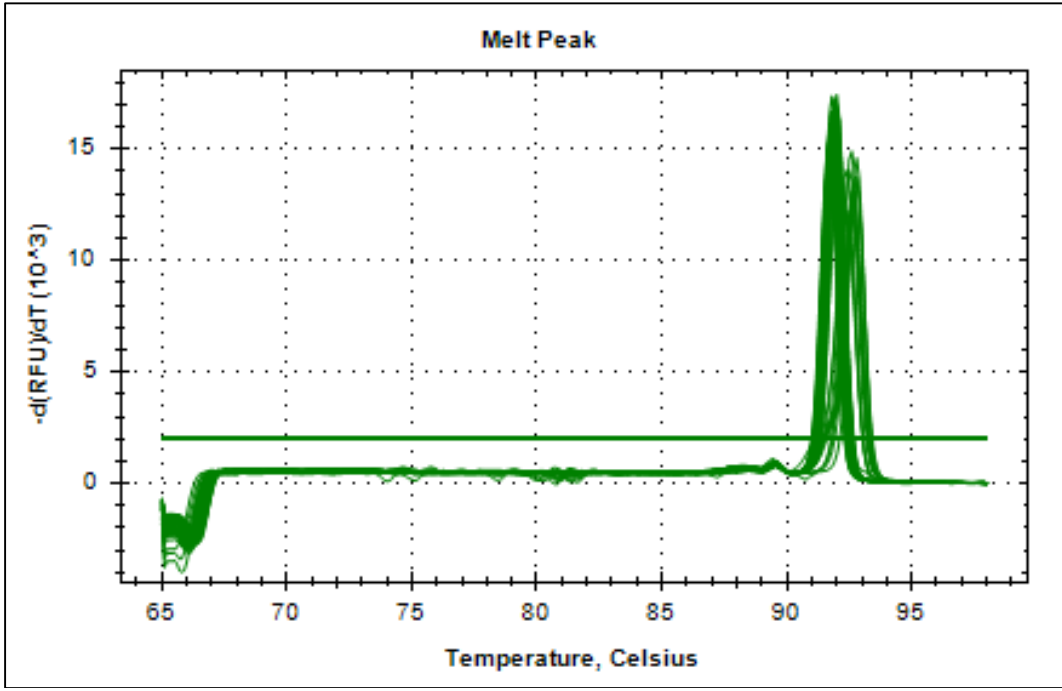
Şekil-6a. AroC hedefli rPCR erime pikleri



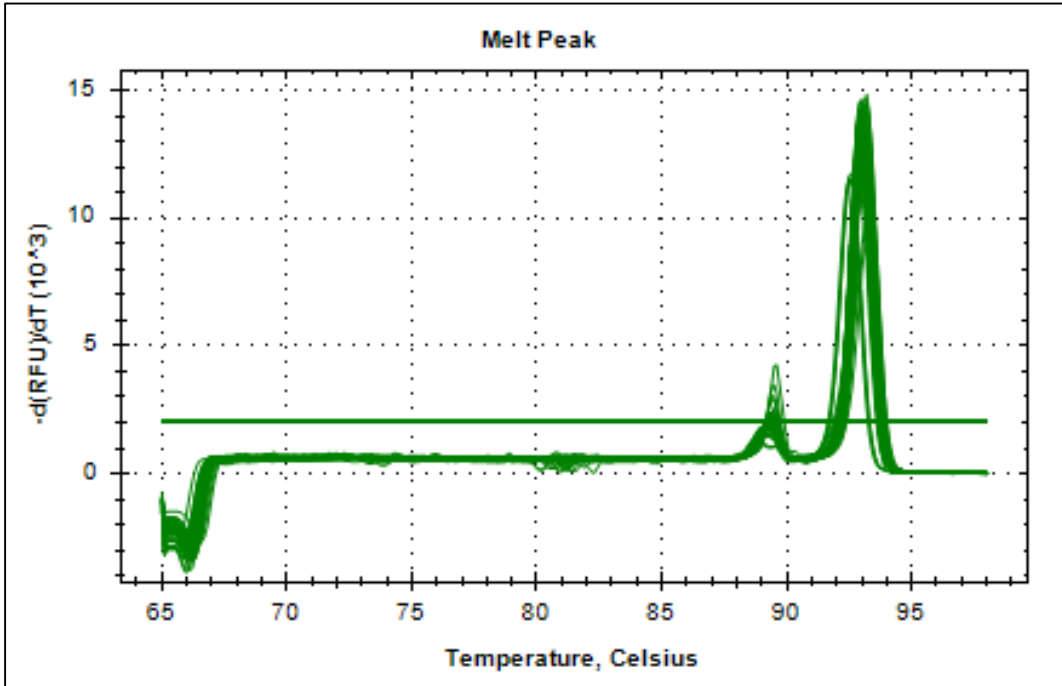
Şekil-6b. DnaN hedefli rPCR erime pikleri



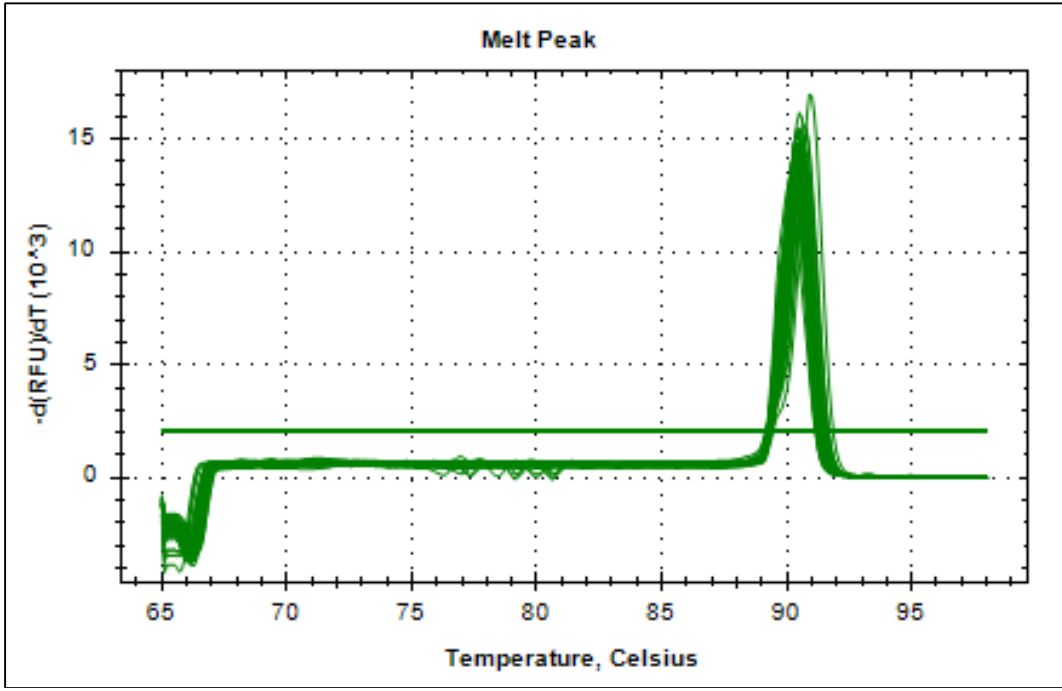
Şekil-6c. HemD hedefli rPCR erime pikleri



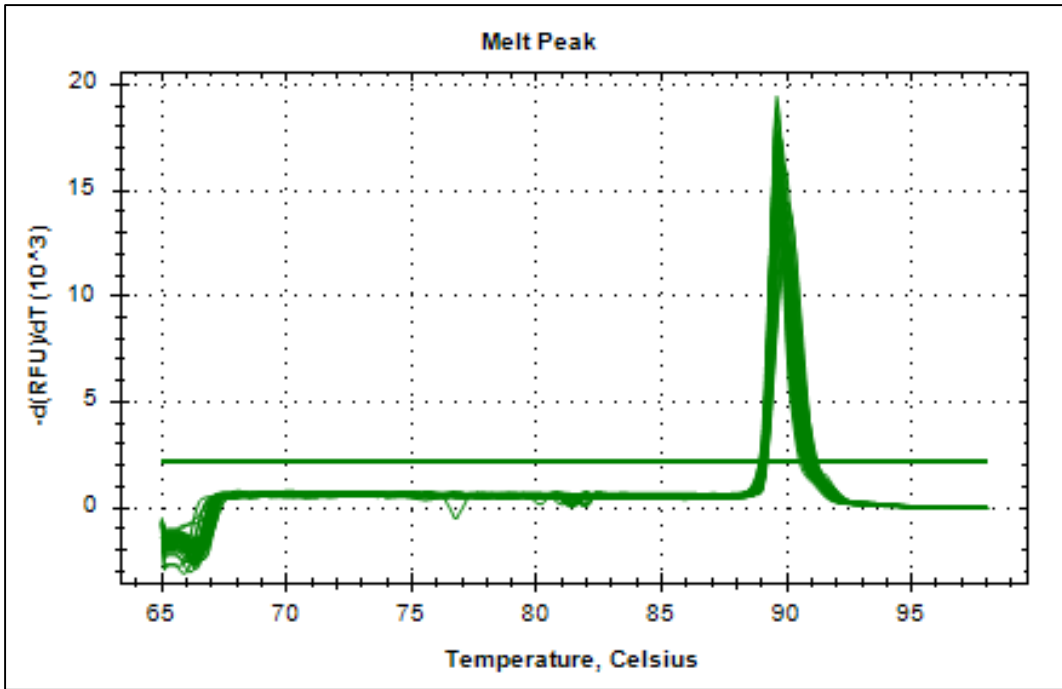
Şekil-6d. HisD hedefli rPCR erime pikleri



Şekil-6e. PurE hedefli rPCR erime pikleri



Şekil-6f. SucA hedefli rPCR erime pikleri



Şekil-6g. ThrA hedefli rPCR erime pikleri

DNA Dizi Analizi Bulguları

Elde edilen DNA dizilerinden birbirine %100 benzerlik gösterenler aynı grup altında toplanmıştır. Gruplandırma sonuçları Tablo-11’de verilmiştir. Her bir grubun DNA dizisi ve evrensel DNA veri bankasında en çok benzerlik gösterdiği DNA dizileri ise Tablo-12’de verilmiştir.

Tablo-11. Farklı izolatlardan çoğaltılan genlerin DNA dizilerinin birbirine %100 benzerlik gösteren gruplara ayrılması

Örnek Adı	Grup Adı						
	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA
5	G4	G1	G1	G1	G2	G5	G1
6	G1	G1	G1	G1	G2	G1	G1
8	G6	G1	G1	G1	G2	G5	G1
12	G4	G1	G3	G6	G2	G5	G1
20	G1	G1	G3	G1	G2	G5	G1
21	G1	G1	G6	G3	G2	G1	G1
28	G1	G1	G3	G6	G2	G6	G1
47	G2	G1	G1	G1	G1	G5	G1
54	G3	G1	G1	G1	G5	G6	G1
75	G1	G6	G1	G1	G4	G1	G1
76	G1	G6	G5	G5	G3	G1	G3
78	G1	G6	G1	G2	G3	G5	G3
88	G6	G1	G3	G6	G2	G5	G1
90	G1	G3	G3	G2	G2	G6	G1
92	G5	G6	G3	G4	G2	G6	G1
95	G5	G3	G3	G4	G1	G6	G1
96	G5	G3	G1	G6	G1	G6	G1
99	G1	G1	G3	G2	G1	G4	G1
122	G1	G1	G1	G1	G2	G1	G1
126	G6	G1	G1	G1	G2	G1	G1
131	G1	G2	G3	G2	G2	G5	G1
139	G1	G2	G3	G6	G2	G5	G1
146	G6	G2	G3	G1	G2	G6	G1
147	G2	G2	G1	G1	G2	G6	G1
148	G1	G2	G1	G1	G1	G6	G1
151	G1	G1	G1	G1	G2	G1	G1
152	G1	G1	G1	G1	G2	G5	G1
153	G4	G2	G1	G1	G2	G5	G1
154	G6	G2	G3	G6	G2	G5	G4
155	G1	G1	G3	G6	G2	G5	G1
173	G5	G3	G1	G4	G1	G6	G1
202	G2	G2	G1	G1	G1	G6	G1
220	G2	G2	G2	G6	G1	G2	G2
249	G7	G5	G4	G1	G2	G3	G3

Örnek Adı	Grup Adı						
	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA
250	G6	G1	G1	G3	G2	G1	G1
251	G6	G1	G1	G1	G2	G5	G1
253	G1	G1	G1	G1	G2	G5	G1
254	G1	G1	G3	G6	G2	G5	G1
271	G5	G4	G5	G4	G2	G5	G1
275	G1	G2	G1	G1	G1	G5	G1
287	G2	G4	G1	G6	G1	G6	G1
289	G6	G1	G2	G5	G2	G5	G1
292	G1	G1	G1	G1	G2	G4	G1
298	G4	G1	G1	G6	G2	G5	G1
B-100	G6	G1	G1	G1	G1	G6	G1
B-104	G1	G1	G1	G1	G1	G6	G1
B-128	G1	G1	G1	G6	G1	G5	G1
B-98	G1	G1	G1	G6	G2	G5	G1
B-99	G6	G1	G3	G6	G2	G6	G1
B-A	G4	G1	G3	G6	G2	G5	G1

Tablo-12. Grup DNA dizileri ve evrensel DNA veri bankasında en çok benzediği DNA dizilerinin ulaşım numaraları

GEN	DNA Grubu	DNA Dizisi	Gen Bankası Benzer DNA	
			Ulaşım No	Benzerlik
aroC	G1	<p>GT'TTTTCGTC'CCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAAATACGGCCT GCGCGATTACCGTGGCGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGC GCGTAGCGGCAGGGGCGATCGCCAAGAAAATACCTGGCGGAAAAGTTCGGC ATCGAAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGATATTCCGCTGGAGAT TAAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGCGG ACAAACTTGACGCGCTGGACGAACTGATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGC GACTCCTTCGGCGCGAAAGTGACGGTGATGGCGAGCGGCGTGCCGGC-GG GCTTGGCGAACCGGTTTTTGACCGACTGGATGCGGACATCGCCCATGCGC TGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTAAC GTGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCATGGT</p>	CP007360	498/501(99%)
	G2	<p>GT'TTTTCGTC'CCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAAATACGGCCT GCGCGATTACCGTGGCGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGC GCGTAGCGGCAGGGGCGATCGCCAAGAAAATACCTGGCGGAAAAGTTCGGC ATCGAAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGACATTCCGCTGGAGAT TAAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGCGG ACAAACTTGACGCGCTGGACGAACTGATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGT GACTCCTTCGGCGCGAAAGTGACGGTGATGGCGAGCGGCGTGCCGGC-GG GCTTGGCGAACCGGTTTTTGACCGACTGGATGCGGACATCGCCCATGCGC TGATTAGCATTAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATT-AAC GTGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCATGGT</p>	CP012833	495/501(99%)
	G3	<p>GT'TTTTCGTC'CCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAAATACGGCCT GCGCGATTACCGTGGCGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGC GCGTAGCGGCAGGGGCGATCGCCAAGAAAATACATGGCGGAAAAGTTCGGC ATCGAAAATCCGCGGCTGCCTGACACAGATGGGCGATATTCCGCTGGAGAT TAAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGCGG ACAAACTTGACGCGCTGGACGAACTGATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGC GACTCCATCGGCGCGAAAGTGACGGTGATGGCGAGCGGGTGCCGGCAGG GCTTGGCGAACCGGTTTTTGACCGACTGGATGCGGACATCGCCCATGCGC TGATGATCG-CAATGCGGTGAAAGGCGTGCAGATATTTCTATGATTTACT TTGGTGGCGCTGTCTCGT—GCCTATATCCCGATGAGATCCGCGCAGCGGGT</p>	CP007360	427/434(98%)

GEN	DNA Grubu	DNA Dizisi	Gen Bankası Benzer DNA	
			Ulaşım No	Benzerlik
aroC	G4	<p>GTTTTTCCGTCCCGGGACACGGGATTACACCTATGAGCAGAAAATACGGC CTGCGCGATTACCGTGGCGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGAT GCGCGTAGCGGC-GGGGCGATCGCCAAGAAATACCTGGCGGAAAAGTTCG GCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGCGGATATTCGCTGGAG ATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGC GGACAACTTGACGCGCTGGACGAACTGATGCGCGCGTGAAAAAGAGG GCGACTCCATCGGCGCGAAAGTGACGGTGATGGCGAGCGCGCTGCCGGC- GGGCTTGGCGAACCGGTTTTTGACCGACTGGATGCGGACATCGCCCATGC GCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGCGGTGGAGATCGGCGAAGGATTTA ACGTGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCATGGT</p>	CP007360	498/503(99%)
	G5	<p>GTTTTTCGTCCCGGGACACGGGATTACACCTATGAGCAGAAAATACGGCCT GCGCGATTACCGTGGCGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGC GCGTAGCGGCAGGGGGGATTGCCAAGAAATACCTGGCGGAAAAGTTCGGC ATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGCGGACATTCGCTGGAGAT TAAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGCCCGATGCAG ACCAACTTGACGCGCTGGACGAACTGATGCGCGCGTGAAAAAGAGGGT GACTCCTTCGGCGCGAAAGTGACGGTGATGGCGAGCGCGTGCCGGC-GG GCTTGGCGAACCGGT-TTTGACCGACTGGATGCGGACATCGCCCATGGCG TGATGAGCATTAATGCGGTGAAAGCGGTGGAGATCGGCGAAGGATTTAAC GTGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCACGGT</p>	CP012344	496/501(99%)
	G6	<p>GTTTTTCGTCCCGGGACACGGGATTACACCTAT-AGCAGAA-TACGGCC TGCGCGATTACCGTGGCGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATG CGCGTAGCGCC-GGGGCGATCGCCAAGAAATACCTGGCGGAAAAGTTCGG CATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGCGGATGTTCCCTCGAGA TTAAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGCG GACAACTTGACGCGCTGGACGAACTGATGCGCGCGTGAAAAA-GAGGG CGACTCCTTCGGCTCGAAAGTGACGGTGATGGCGAGCGCGTGCCGGCTG GGCTTGGCGAATCGGTTTTTGACCGACTGGATGCGGACATCGCCCATGGC CTTATTACCAGCA-TGCGGTCAAAGCGGTGCACATCGGCCAATGATTTAA CGTGGTGGCGCTCCGCGGCCCGTAATCGCGATGAAATCATTTCTCATGGT</p>	CP007360	465/491(95%)

GEN	DNA Grubu	DNA Dizisi	Gen Bankası Benzer DNA	
			Ulaşım No	Benzerlik
aroC	G7	<p>GT'TTTCATCCGGGAC-CGTGGATGACCCCAAATCACCGCAACTCGGTCT GCGCGATTACTGTGGCGCGTCGACGTTCTCCACGTGTGATACCTCGCTG AGCGTAGCGCCTTGGGCGATCGCCAAGAAATACCTCGCGGAGAAGTTCTG CATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCGACGGGCCACGTTCCCTGGAGA TTAACGACAGGCGTCTGTGAGCTTAATCCGTTCTTTGCCCTATACG GACCAACTTGACGCGCTCGACGAACTGATTCGCGCGCTGAAAAAC-AGGG TGACTCCTTCGGCTCGAAAGTAACCGTGATGGCAAGCGCGTGCCGGC-G GGCTTGGCGAATCGGTCTTTGACCGACTGGATGCGGACATCGCCATGCG CTTATTACCAGTAAAGCGGTGAAAGCGGTGCAGATAGGCGAAGGATTTAA CGTGGTGGCGCTGCGCGGACGCAAAATCGCGATGAAATCACGTCTCATGGT</p>	CP009565	432/493(88%)
dnaN	G1	<p>ATGGAGATGGTCGCGCGGTTACGCTTCTCAGCCGATGAGCCGGGCGC CACTACCGTGCCGGCGCGGAAATCTTTGATATCTGCCGCGCCTGCCGG AGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAGTTGGAAGGCGATCGGATGCTGGTGGCT TCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCCGCATTTCC GAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGAGGCCA CGATGAAGCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCTCATCAGGAT GTGCGCTACTACTTAAACGGTATGCTGTTGAAACGGAAGGTAGCGAACT GCGCACTGTGCGGACCGACGGCCACCGCTGGCGGTGTGCTCAATGCCGC TGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGTGAAAACCCGCTGCGCGTGACG</p>	CP007360	501/501(100%)
	G2	<p>ATGGAGATGGTCGCGCGGTTACGCTTCTCAGCCGATGAGCCAGGCGC CACTACCGTGCCGGCGCGGAAATCTTTGATATCTGCCGCGCCTGCCGG AGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAGTTGGAAGGCGATCGGATGCTGGTGGCT TCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCCGCATTTCC GAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGAGGCCA CGATGAAGCGCCTGATTGAATCGACCCAGTTTTCGATGGCCCATCAGGAT GTGCGCTACTACTTAAACGGTATGCTGTTGAAACGGAAGGTAGCGAACT GCGCACTGTGCGGACCGACGGCCACCGCTGGCGGTGTGCTCAATGCCGC TGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGCGGAAAACCCGCTGCGCGTGACG</p>	CP012930	501/501(100%)
	G3	<p>ATGGAGATGGTCGCGCGGTTACGCTTCTCAGCCGATGAGCCAGGCGC CACTACCGTGCCGGCGCGGAAATCTTTGATATCTGCCGCGCCTGCCGG AGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAGTTGGAAGGCGATCGGATGCTGGTGGCT TCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCCGCATTTCC GAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGAGGCCA CGATGAAGCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCCCATCAGGAT GTGCGCTACTACTTAAACGGTATGCTGTTGAAACGGAAGGTAGCGAACT GCGCACTGTGCGGACCGACGGCCACCGCTGGCGGTGTGTTCAATGCCGC TGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGCGGAAAACCCGCTGCGCGTGACG</p>	emb LN649235	501/501(100%)

GEN	DNA Grubu	DNA Dizisi	Gen Bankası Benzer DNA	
			Ulaşım No	Benzerlik
dnaN	G4	ATGGAGATGGTCGCGCGCCTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGTGC TACTACCGTGCCGGCGCGAAATTCTTTGATATCTGCCGCGCCTGCCGG AGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAGTTGGAAGGCGATCGGATGTTGGTGCCT TCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCGCGGATTTCCC GAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGAGGCCA CGATGAAGCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCTCATCAGGAT GTGCGCTACTACTTAAACGGTATGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACT GCCGACTGTCGCGACCGACGGCCACCGCCTGGCGGTGTGCTCAATGCCGC TGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGCGAAAACCCGCTGCGCGTGCAG	CP012349	500/501(99%)
	G5	ATGGAGATGGTCGCGCGCCTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGTGC TACTACCGTGCCGGCGCGAAATTCTTTGATATCTGCCGCGCCTGCCGG AGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAGTTGGAAGGCGATCGGATGCTGGTGCCT TCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCGCGGATTTCCC GAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGAGGCCA CGATGAAGCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCCATCAGGAT GTGCGCTACTACTTAAACGGTATGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACT GCCGACTGTCGCGACCGACGGCCACCGCCTGGCGGTGTGCTCAATGCCGC TGGAAGCGTCTTTACCCAGCCATTGCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGCGAAAACCCGCTGCGCGTGCAG	HM797824	500/501(99%)
	G6	ATGGAGATGGTCGCGCGCCTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCAGGGCG CACTACCGTGCCGGCGCGAAATTCTTTGATATCTGCCGCGCCTGCCGG AGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAGTTGGAAGGCGATCGGATGCTGGTGCCT TCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACACTGCCTGCCGCGGATTTCCC GAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGAGGCCA CGATGAAGCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCTCATCAGGAT GTGCGCTACTACTTAAACGGTATGCTGTTTGAACGGAAGGCAGCGAACT GCCGACTGTTGCCGACCGACGGCCACCGCTGGCGGTGTGCTCAATGCCGC TGGAGGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG ATTGAACTGATGCGTATGCTTACGCGTGGCGAAAACCCGCTGCGCGTGCAG	CP001127	501/501(100%)

GEN	DNA Grubu	DNA Dizisi	Gen Bankası Benzer DNA	
			Ulaşım No	Benzerlik
hemD	G1	GCGACACTGACGGAAAACGATCTGGTTTTGCGCCTTTCACAGCAGCCGT CGCCTTTGCTCACGCCAGCTCCAGCGGGATGGCCGAAACTGGCCTGCGT CGCCGCGTATTTGCGGATTGGCCGCACCACGGCGCTCGCCCTTCATACC GTTAGCGGGTTCGATATTCGTTATCCATTGGATCGGGAAATCAGCGAAGC CTTGCTACAATTACCTGAATTACAAAATATTGCGGGCAAACGCGCGTGA TTTTGCGTGGCAATGGCGGCCGGAACGCTGGCGAAACCCGACAGCT CGCGGAGCCGAAGTCAGTTTTTGTGAATGTTATCAACGATGTGCGAAACA TTACGATGGCGCGGAAGAAGCGATGCGCTGGCATACTCGCGCGTAACAA CGCTTGTGTTACCAGCGCGAGATGTTGCAA	CP007360	432/432(100%)
	G2	GCGACGCTGACGGAAA-CGATCTGGTTTTGCGCCTTTCACAGCAGCCGT CGCCTTTGCTCACGCCAGCTCCAGCGGGATGGCCGAAACTGGCCTGCGT CGCCGCGTATTTGCGGATTGGCCGCACCACGGCGCTCGCCCTTCATACC GTTAGCGGGTTCGATATTCGTTATCCATTGGATCGGGAAATCAGCGAAGC CTTGCTACAATTACCTGAATTACAAAATATTGCGGGCAAACGCGCGTGA TTTTGCGTGGCAATGGCGGCCGGAACGCTGGCGAAACCCGACAGCG CGCGGAGCCAAAGTCAGTTTTTGTGAATGTTATCAACGATGTGCGAAACA TTACGATGGCGCGGAAGAAGCGATGCGCTGGCATACTCGCGCGTAACAA CGCTTGTGTTACCAGCGCGAGATGTTGCAA	CP007534	430/432(99%)
	G3	GCGACGCTGCGGAAAACGATCTGGTTTTGCGCCTTTCACAGCAGCTGT CGCCTTTGCTCACGCCAGCTCCAGCGGGATGGTCGAAACTGGCCTGTGG CGCCGCGTATTTGCGGATTGGCCGCACCACGGCGCTCGCCCTTCATACC GTTAGCGGGTTCGATATTCGTTATCCATTGGATCGGGAAATCAGCGAAGC CTTGCTACAATTACCTGAATTACAAAATATTGCGGGCAAACGCGCGTGA TTTTGCGTGGCAATGGCGGCCGGAACGCTGGCGAAACCCGACAGCG CGCGGAGCCGAAGTCAGTTTTTGTGAATGTTATCAACGATGTGCGAAACA TTACGATGGCGCGGAAGAAGCGATGCGCTGGCATACTCGCGCGTAACAA CGCTTGTGTTACCAGCGCGAGATGTTGCAA	emb LN649235	432/432(100%)
	G4	GCGACGCTGACGGAAAACGATCTAGTTTTTGCCTTTCACAGCAGCCGT CGCCTTTGCTCACGCCAGCTCCAGCGGGATGGTCGAAACTGGCCTGTGG CGCCGCGTATTTGCGGATTGGCCGCACCACGGCGCTCGCCCTTCATACC GTTAGCGGGTTCGATATTCGTTATCCATTGGATCGGGAAATCAGCGAAGC CTTGCTACAATTACCTGAATTACAAAATATTGCGGGCAAACGCGCGTGA TTTTGCGTGGCAATGGCGGCCGGAACGCTGGCGAAACCCGACAGCG CGCGGAGCCGAAGTCAGTTTTTGTGAATGTTATCAACGATGTGCGAAACA TTACGATGGCGCGGAAGAAGCGATGCGCTGGCATACTCGCGCGTAACAA CGCTTGTGTTACCAGCGCGAGATGTTGCAA	CP012833	432/432(100%)

GEN	DNA Grubu	DNA Dizisi	Gen Bankası Benzer DNA	
			Ulaşım No	Benzerlik
hemD	G5	GCTGACGGAAA-CGATCTGGTTTTTGGCCCTTTCACAGCACGCCGTCGCCT TTGCTCACGCCAGCTCCAGCGGGATGGTCGAAACTGGCCTGCGTCGCCG CGCTATTTGCGGATTGGCCGCACCACGGCGCTCGCCCTTCATACCGTTAG CGGGTTCGATATTCGTTATCCATTGGATCGGGAAATCAGCGAAGCCTTGC TACAATTACCTGAATTACAAAATATTGCGGGCAAACGGCGCTGATTTTG CGTGGCAATGGCGGCCGGAACCTGCTGGGCGAAACCTGACAGCTCGCGG AGCCGAAGTCAGTTTTTGTGAATGTTATCAACGATGTGCGAAACATTAG ATGGCGCGAAGAAGCGATGCGCTGGCATACTCGCGCGTAACAACGCTT GTTGTTACCAGCGCGAGATGTTGCAA	CP012349	426/427(99%)
	G6	GCGACACTGACGGAAA-CGATCTGGTTTTTGGCCCTTTCACAGCACGCCGT CGCCTTTGCTCACGCCAGCTCCAGCGGGATGGCCGAAACTGGCCTGCGT CGCCGCGTATTTGCGGATTGGCCGCACCACGGCGCTCGCCCTTCATACC GTTAGCGGTTTCGATATTCGTTATCCATTGGATCGGGAAATCAGCGAAGC CTTGCTACAATTACCTGAATTACAAAATATTGCGGGCAAACGGCGCTGA TTTTGCGTGGCAATGGCGGCCGGAACCTGCTGGGCGAAACCTGACAGCT CGCGGAGCCGAAGTCAGTTTTTGTGAATGTTATCAACGATGTGCGAAACA TTACGATGGCGCGAAGAAGCGATGCGCTGGCATACTCGCGCGTAACA CGCTTGTGTTACCAGCGCGAGATGTTGCAA	CP007360	431/432(99%)
hisD	G1	ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGA TGAAATCCTCTATGCGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACG TCGGCGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTGGCCTTCGGCAGCGAGTCCGTA CCGAAAGTGATAAAATTTTGGCCCCGCAACGCCTTTGTAACCGAAGC CAAACGTCAGGTCAGCCAACGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAG CCGGGCCGTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGAT TTCGTCGCTTCTGACCTGCTCTCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTTCGCA GGTGATTCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCTGCAAGGTGGCGGAGG CGGTAGAACGTCAACTGGCAGAACTGCCGCGCGGACACCGCCAGGCGAG GCCCTGAGCGCCAGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCCTC	CP007360	501/501(100%)

GEN	DNA Grubu	DNA Dizisi	Gen Bankası Benzer DNA	
			Ulaşım No	Benzerlik
hisD	G2	ATTGCGGGATGCCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGCGGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGGGATTGCCGCTCTGGCCTTCGGCAGCGAGTCCGTA CCGAAAGTGGATAAAAATTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAACCGAAGC CAAGCGTCAGGTGACCCAGCGCCTCGACGGCGCGGTATCGATATGCCAG CCGGCCGCTCTGAAGTACTGGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGAT TTCGTGCGTTCTGACCTGCTCTCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTTCGCA GGTATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCGCAAGGTGGCGGAGG CGGTAGAACGTCAACTGGCGGAGCTGCCGCGCGGACACCGCCCGCAG GCCCTGAGCGCCAGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCCTC	CP001127	499/501(99%)
	G3	ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGCGGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGGGATTGCCGCTCTGGCCTTCGGCAGCGAGTCCGTA CCGAAAGTGGATAAAAATTTTGGTCCCGCAACGCCTTTGTAACCGAAGC CAAGCGTCAGGTGACCCAGCGCCTCGACGGCGCGGTATCGATATGCCAG CCGGCCGCTCTGAAGTACTGGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGAT TTCGTGCGTTCTGACCTGCTCTCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTTCGCA GGTATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCGCAAGGTGGCGGAGG CGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGGACACCGCCCGCAG GCCCTGAGCGCCAGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCCTC	CP012144	501/501(100%)
	G4	ATTGCGGGATGCCAGAAGGTGGTTCTGTGCTCGCCACCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGCGGCACAACGTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCCATTGCCGCTCTGGCCTTCGGCAGCGAGTCCGTA CCGAAAGTGGATAAAAATTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAACCGAAGC CAAGCGTCAGGTGACCCAGCGCCTCGACGGCGCGGTATCGATATGCCAG CCGGCCGCTCTGAAGTACTGGTATCGCCGACAGCGGCGCAGCACCGGAT TTCGTGCGTTCTGACCTGCTCTCCAGGCTGAGCACGGCCCGGATTCCCA GGTATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCGCAAGGTGGCGGAGG CGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGGACACCGCCCGCAG GCCCTGAGCGCCAGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCCTC	LN649235	498/501(99%)
	G5	ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGCGGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGGGATTGCCGCTCTGGCCTTCGGCAGCGAGTCCGTA CCGAAAGTGGATAAAAATTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAACCGAAGC CAAACGTGAGGTGACCCAGCGCCTCGACGGCGCGGTATCGATATGCCAG CCGGCCGCTCTGAAGTACTGGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGAT TTCGTGCGTTCTGACCTGCTCTCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTTCGCA GGTATTCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCTGCAAGGTGGCGGAGG CGGTAGAACGTCAACTGGCAGAACTGCCGCGCGGACACCGCC-GGCAG GCCCTGAGCGCCAGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCA-TGCGTC	CP007360	499/501(99%)

GEN	DNA Grubu	DNA Dizisi	Gen Bankası Benzer DNA	
			Ulaşım No	Benzerlik
hisD	G6	ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCC-CCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGCGGCGCA-CTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTGGCCTTCGGCAGCGAGTCCGTA CCGAAAAGTGGATAAAAATTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAACCGAAGC CAAACGTCAGGTCAGCCAACGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAG CCGGGCCGTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGAT TTCGTGCTTCTGACCTGCTCTCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTTCGCA GGTGATTCTGCTGACGCTGATGCTGACATTGCCGCAAGGTGGCGGAGG CCGTAGAACGTCAACTGGCAGAACTGCCGCGCGGACACCGCCGGGCGAG GCCCTGAGCGCCAGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAATGCGTC	CP007360	497/501(99%)
purE	G1	AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTGAATTTCTGG ATGTCCCGCACCATGTAGAAGTGGTTTCCGCTCATCGCACACCCGATAAA CTGTTACGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAGAACGGATATCAAGTGATTAT TGCCGGCGGGGGCGGCGGCGCACCTGCCGGAATGATTGCGGCAAAAA CGCTGGTCCGGTACTCGGCTGCCGTACAAAGCGTGCCTAAGCGGC GTGGATAGCCTTACTCCATCGTGCAGATGCCGCGGGCATTCCGGTGGG TACGCTGGCGATCGGTAAGCCGGTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCG CGCAGATTCTGGCGAACACGACGCGGAACTGCATCAGCGCATTGCCGAC	CP012144	398/400(99%)
	G2	AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTGAATTTCTGG ATGTCCCGCACCATGTAGAAGTGGTTTCCGCTCATCGCACCCCGATAAA CTGTTACGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAGAACGGATATCAAGTGATTAT TGCCGGCGGGGGCGGCGGCGCACCTGCCGGAATGATTGCGGCAAAAA CGCTGGTCCGGTACTCGGCTGCCGTACAAAGCGTGCCTAAGCGGC GTGGATAGCCTTACTCCATTGTGCAGATGCCGCGGGCATTCCGGTGGG TACGCTGGCGATCGGTAAGCCGGTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCG CGCAGATTCTGGCGAACACGACGCGGAACTGCATCAGCGCATTGCCGAC	CP007360	398/400(99%)
	G3	AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTGAATTTCTGGA TGTCCCGCACCATGTAGAAGTGGTTTCCGCTCATCGCACCCCGATAAGC TGTTACGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAGAACGGATATCAAGTGATTAT GCGGGCGGGGGCGGCGGCGCACCTGCCGGAATGATTGCGGCAAAAA GCTGGTCCGGTACTCGGCTGCCGTACAAAGCGTGCCTAAGCGGCG GTGGATAGCCTTACTCCATTGTGCAGATGCCGCGGGCATTCCGGTGGG TACGCTGGCGATCGGTAAGCCGGTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCG GCAGATTCTGGCGAACACGACGCGGAACTGCATCAGCGCATTGCCGAC	CP007533	398/399(99%)

GEN	DNA Grubu	DNA Dizisi	Gen Bankası Benzer DNA	
			Ulaşım No	Benzerlik
purE	G4	AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCACCGCCGAAATTTTGAAATTCTGGA TGTCGCCGACCATGTAGAAGTGGTTTCCGGCTCATCGACCCCGATAAGC TGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAGAACGATATCAAGTGATTATT GCCGGCGGGGGCGCGCGCACCTGCCGGGAATGATTGCGGCAAAAAAC GCTGGTCCCGGTACTCGCGGTGCCGTACAAAGCGCTGCGTAAGCGGGC TGGATAGCCTTTACTCCATTGTGCAGATGCCCGCGGCATTCCGGTGGGT ACACTGGCGATCGGTAAGCCGGTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCGC GCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCATCAGCGCATCGCTGAC	CP007533	399/399(100%)
	G5	AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCGAAATTTTGAAATTCTGGA TGTCGCCGACCATGTAGAAGTGGTTTCCGCCCATCGACCCCGATAA-C TGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCGGA-GAGAACGGATATCAAGTGATTATT GCCGGCGGGGGCGCGCGCACCTGCCGGGAATGATTGCGGCAAAAAAC GCTGGTCCCGGTACTCGCGGTGCCGTACAAAGCGCTGCGTAAGCGGGC TGGATAGCCTCTACTCCATTGTGCAGATGCCCGCGGCATTCCGGTGGGT ACGCTGGCGATCGGTAAGCCGGTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCGC GCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCATCAGCGCATTGCCGAC	CP007360	397/399(99%)
sucA	G1	AAACGCTTCTGAACGAACTGACCGCCGCTGAAGGGCTGGAACGTTATCT GGGTGCCAAATTCGCCGGTGCAGAAACGTTTCTCGCTCGAGGGGGGAGATG CGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGTTTCGCCATGCCGGTAACAGCGGC ACTCGCGAAGTGGTGTGGGGATGGCGCACCGCGGTGCGCTGAACGTTGCT GATCAACGTAAGGTTAAAAACCGCAGGATCTGTTTCGACGAAATTTGCCG GTAAGCATAAAGAACATCTGGGTACCGCGACGTGAAGTATCACATGGGC TTCTCGTCAGATATCGAAACCGAAGCGGTCTGGTTACCTGGCGTGGC GTTTAACCCATCGCATCTGGAAATTTGTGAGCCCGGTGGTATGGGCTCCG TGCGCGCCCGTCTGGACAGACTGGACGAACCGAGCAGCAAAAAGTGTG CCGATCACTATTACGGCGACGCCCGGTGACCGCCAGGGCGTGGTTTCAG	CP007360	500/501(99%)
	G2	AAACGCTTCCCTGAACGAACTGACCGCCGCTGAAGGGCTGGAACGTTATC TGGGGGCCAAATTCGCCGGTGCAGAAACGTTTCTCGCTTGGGGGGGAGAT GCGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGTTTCGCCATGCCGGTAACAGCGG CACTCGCGAAGTGGTGTGGGGATGGCGCACCGCGGTGCGCTGAACGTTG TGATCAACGTAAGGTTAAAAACCGCAGGATCTGTTTCGACGAGTTTGGC GGTAAACATAAAGAACATCTGGGTACCGCGACGTGAAGTATCACATGGG CTTCTCGTCAGATATCGAAACCGAAGCGGTCTGGTTACCTGGCGTGG CGTTTAACCCATCGCATCTGGAAATTTGTGAGCCCGGTGGTATGGGCTCC GTGCGCGCCCGTCTGGACAGACTGGACGAACCGAGCAGCAAAAAGTGTG GCCGATCACTATTACGGCGACGCCCGGTGACCGCCAGGGCGTGGTTTCAG	CP012930	497/502(99%)

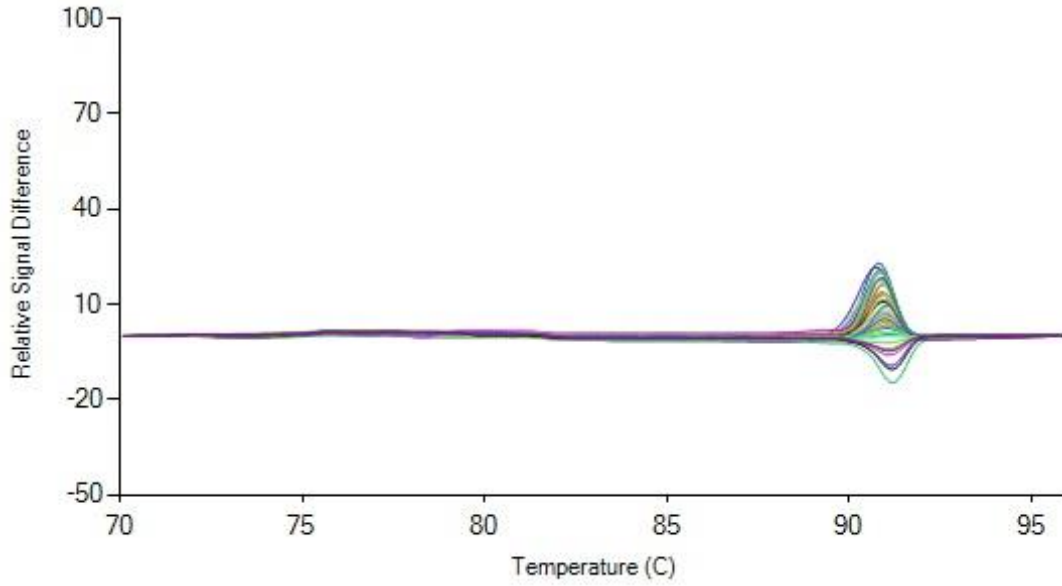
GEN	DNA Grubu	DNA Dizisi	Gen Bankası Benzer DNA	
			Ulaşım No	Benzerlik
sucA	G3	AAACGTTTCCCTGAACGAACTGACCGCCGCTGAAGGGCTGGAACGTTATC TGGGCGCAAATTTCCCGGTGCGAAACGTTTCTCGCTTGAGGGGGGAGAT GCGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGTTCCGCATGCGGGTAACAGCGG CACTCGCGAAGTGGTCTGGGGATGGCGCACCGCGGTCGCCTGAACGTGC TGATCAACGTAAGTGGTAAAAACCGCAGGATCTGTTTCGACGAATTTGCC GGTAAGCATAAAGAACATCTGGGTACCGGCGACGTGAAGTATCACATGGG CTTCTCGTCAGATATCGAAACCGAAGGCGGTCTGGTTACCTGGCGCTGG CGTTAACCATCGCATTTGAAATTGTGAGCCCGGTGGTATGGGCTCC GTGCGGCGCGTCTGGACAGACTGGACGAACCGAGCAGCAACAAAGTGT GCCGATCACTATTCACGGCGACGCCCCGGTGACCGCCAGGGCGTGGTTTCAG	CP010283	500/502(99%)
	G4	AAACGTTTCTGAACGAACTGACCGCCGCTGAAGGGCTGGAACGTTATC TGGGCGCAAATTTCCCGGGGCGAAACGTTTCTCGCTCGAGGGGGGAGA TGCGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGTTCCGCATGCGGGTAACAGCG GCACTCGCGAAGTGGTCTGGGGATGGCGCACCGCGGTCGCCTGAACGTG CTGATCAACGTAAGTGGTAAAAACCGCAGGATCTGTTTCGACGAATTTGC CGGTAAGCATAAAGAACATCTGGGTACTGGCGACGTGAAGTATCACATGG GCTTCTCGTCAGATATCGAAACCGAAGGCGGTCTGGTTACCTGGCGCTG GCGTTAACCATCGCATCTGGAAATTGTGAGCCCGGTGGTATGGGCTC CGTGGCGCGCGTCTGGACAGACTGGACGAACCGAGCAGCAACAAAGTGC TGCCGATCACTATTCACGGCGACGCCCCGGTGACCGCCAGGGCGTGGTTTCAG	LN649235	500/503(99%)
	G5	AAACGCCTTCCCTGAACGAACTGACCGCCGCTGAAGGGCTGGAACGTTAT CTGGGTGCCAAATTTCCCGGTGCGAAACGTTTCTCGCTCGAGGGGGGAG ATGCGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGTTCCGCATGCGGGTAACAGC GGCACTCGCGAAGTGGTCTGGGGATGGCGCACCGCGGTCGCCTGAACGT GCTGATCAACGTAAGTGGTAAAAACCGCAGGATCTGTTTCGACGAATTTG CCGGTAAGCATAAAGAACATCTGGGTACCGGCGACGTGAAGTATCACATG GGCTTCTCGTCAGATATCGAAACCGAAGGCGGTCTGGTTACCTGGCGCT GGCGTTAACCATCGCATCTGGAAATTGTGAGCCCGGTGGTATGGGCT CCGTGGCGCGCGTCTGGACAGACTGGACGAACCGAGCAGCAACAAAGTGC TTGCCGATCACTATTCACGGCGACGCCCCGGTGACCGCCAGGGCGTGGTTTCAG	CP007360	500/504(99%)

GEN	DNA Grubu	DNA Dizisi	Gen Bankası Benzer DNA	
			Ulaşım No	Benzerlik
sucA	G6	AAACGCTTCCTGAACGAACCTTGACCGCCGCTGAAGGGCTGGAACGTTATCTGGGTGCCAAATTTCCCGGGTGGGAAACGTTTCTCGCTCGAGGGGGAGATGCGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGTTCGCCATGCGGGTAACAGCGGCACTCGGAAGTGGTCTGGGATGGCGCACCGCGGTGCGCTGAACGTGCTGATCAACGTACTGGGTAAAAAACCGCAGGATCTGTTTCGACGAATTTGCCGTAAGCATAAAGAACATCTGGGTACCGGCGACGTGAAGTATCACATGGCTTCTCGTCAGATATCGAAACCGAAGGCGGTCTGGTTCACCTGGCGCTGGCGTTAAACCCATCGCATCTGGAAATTTGTGAGCCCGTGGTGATGGGCTCCGTGCGCGCCGTCTGGACAGACTGGACGAACCGAGCAGCAACAAAGTTTGCCGATCACTATTCACGGCGACCCCGGTGACCGCCAGGGCTGGTTTCAG	CP007360	499/504(99%)
thrA	G1	GTGCTGGGCGTAATGGTTCGACTATTCGCGCCGCTGCTGGCCGCTGTTTACGCGCTGACTGCTGTGAAATCTGGACTGACGTGCGATGGCGTGATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGCCAGGCTGCTGAAATCGATGTCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTTCTTACCCTCGCACCATACGCCATCGCCAGTTCAGATCCCTGTCTGATTAATAATACCGTAATCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCTCCAGCGACGATGATAACCTGCCGTTAAAGGGATCTTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCGGAATGAAAGGGATGATTGGGATGGCGCGCGTGTTTCGCGCCATGTCTCGCGCCGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCAGTCTCTCTGAGTACAGCATCAGCTTCTGTGTGCCGAGAGTACTGC	CP007360	501/501(100%)
	G2	GTGCTGGGCGTAAGGGCTGCAGACTACTCTGCCGCGTGTGGCCGCCGCTGTTTACGCGCTGACTGCTGTGAAATCTGGACTGACGTGCGATGGCGTGATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGCCAGACTGCTGAAATCGATGTCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTCTTACCCCTCGCACATAACGCCTATCGCCAGTTCAGATCCCTGTCTGATTAATAAATACCGTAATCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGACGATAATAACCTGCCGTTAAAGGGATCTTAACCTTAATAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCTGGAATGAAAGGGAGATTGGGATGGCGCGCGGTGTTTCGCGCCATGTCTCGCGCCGGATCTCGGTGGTGCTCATTAACCCAGTCTCTCTGAGTACAGCATCAGCTTCTGTGTGCCGAAAGTACTGC	CP012038	496/504(98%)

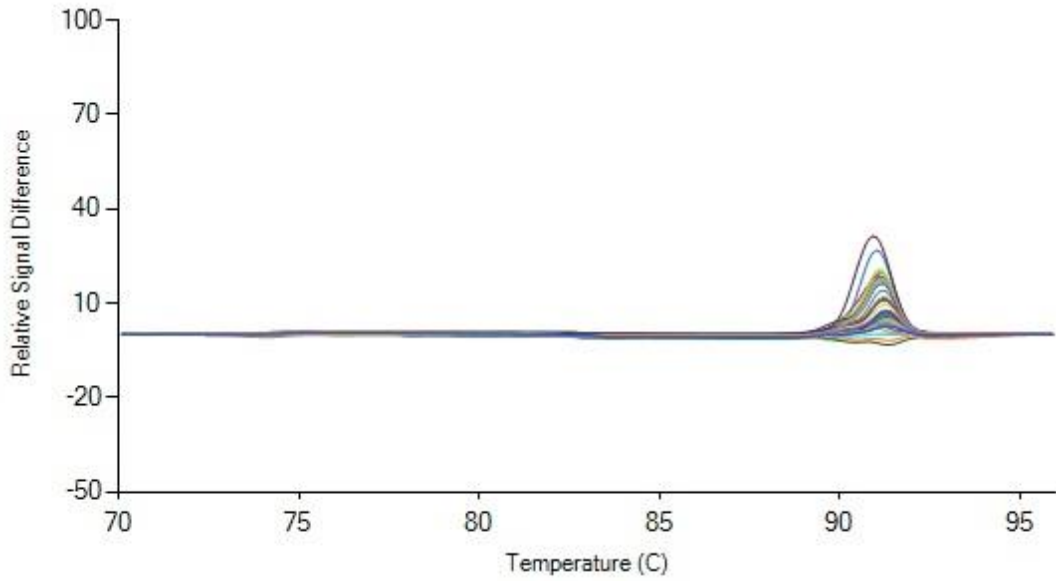
GEN	DNA Grubu	DNA Dizisi	Gen Bankası Benzer DNA	
			Ulaşım No	Benzerlik
thrA	G3	GTGCTGGGCGTAATGGTTCCAGACTATTCCGCGCCGTGCTGGCCGCCT GTTTACGCGCTGACTGCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGGTAT ACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGCCAGGCTGCTGAAATCGATGTC CTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTCCTCACC CTCGCACCATTACGCCCATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTA AATACCGGTAATCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGA CGATGATAACCTGCCGGTTAAAGGGATCTTAACCTTAACAACATGGCGA TGTTTAGCGTCTCCGGCCGGGAATGAAAGGG-TGATTGGGATGGCGGCG CGTGTTCGCGCCCATGTCTCGCGCCGGATCTCGGTGGTGCTCATTAC CCAGTCCTCTGAGTACAGCATCAGTTTCTGTGTGCCGCACAGTGACTGC	CP012681	499/502(99%)
	G4	GTGCTGGGCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCGCCGTGCTGGCCGCCTG TTTACGCGCTGACTGCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGGTATA CCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGCCAGGCTGCTGAAATCGATGTC TACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTCTTCACCC TCGCACCATTACGCCCATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTA AATACCGGTTATCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGAC GATGATAACCTGCCGGTTAAAGGGATCTTAACCTTAACAACATGGCGAT GTTTAGCGTCTCCCGCCGGGAATGAAAGGGA-GATTGGGATGGCGGCGC CTGTTTCGCCACCCTGTCTCAGCGCGGTCTCAAGGTGGTGCCCATACC CGGTCTCCGCTGC-TACA-CGGCAGCTTATTAGT	CP007360	448/463(97%)

HRM Analizi Bulguları

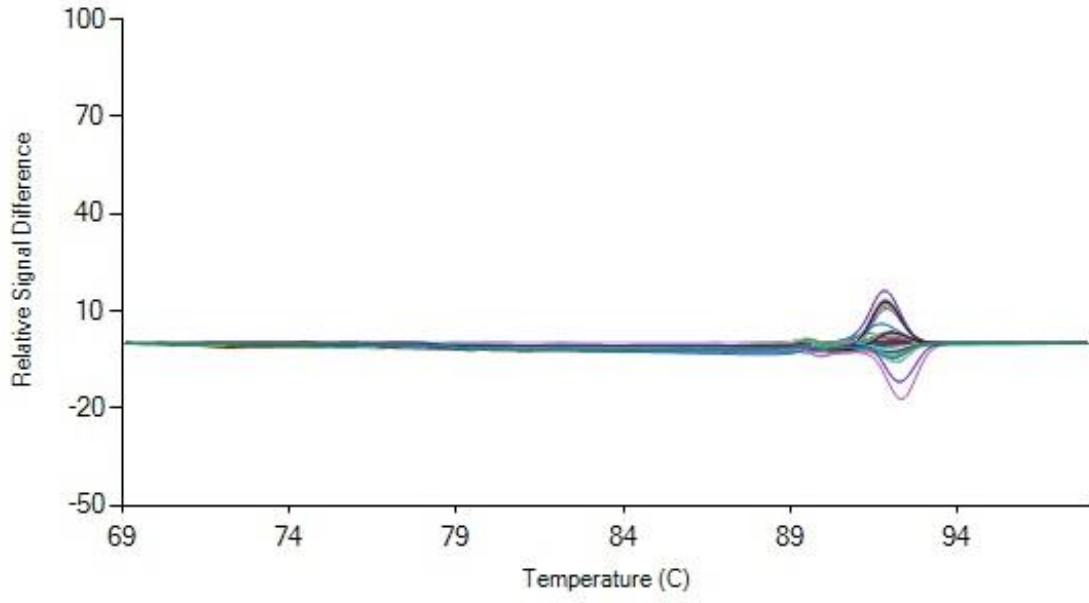
HRM analizi sonucu elde edilen HRM profilleri Şekil-7 (a-g)'de verilmiştir. HRM profillerinin benzerliklerine göre gruplandırılması ise Tablo-13'de verilmiştir. Tablo-11 ve Tablo-13 karşılaştırıldığında, HRM profil benzerliği ile oluşturulan grupların DNA dizi benzerliği ile oluşturulan gruplar ile %100 örtüştüğü belirlenmiştir.



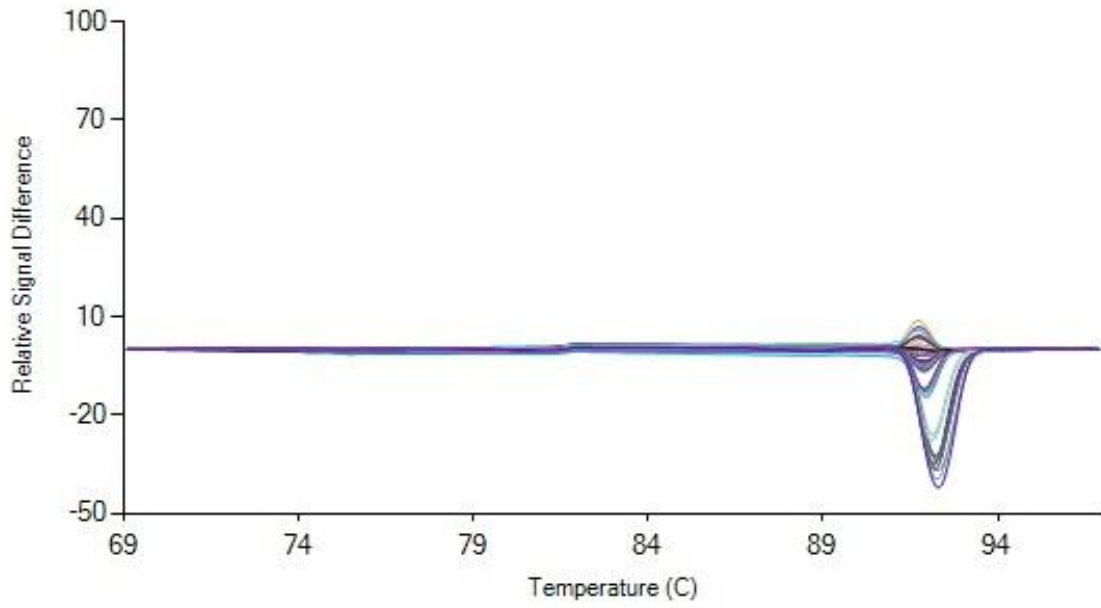
Şekil-7a. AroC HRM profilleri



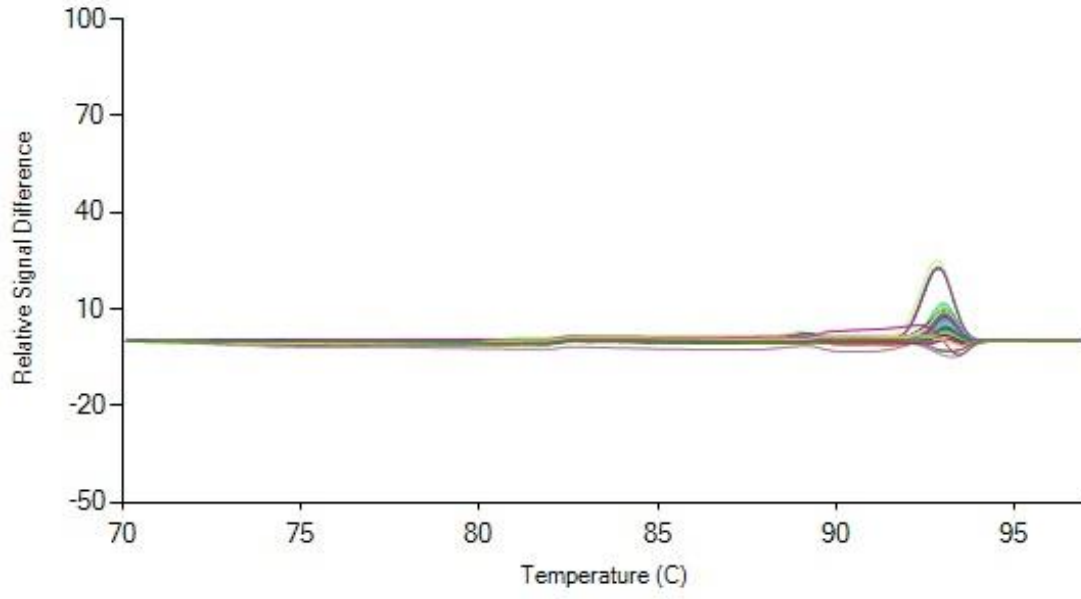
Şekil-7b. DnaN HRM profilleri



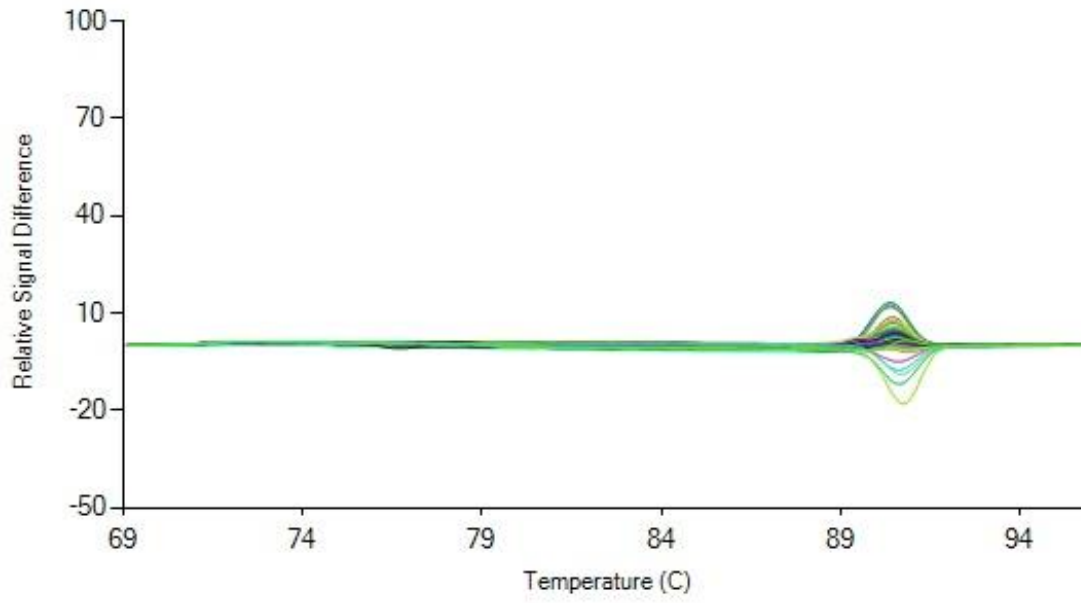
Şekil-7c. HemD HRM profilleri



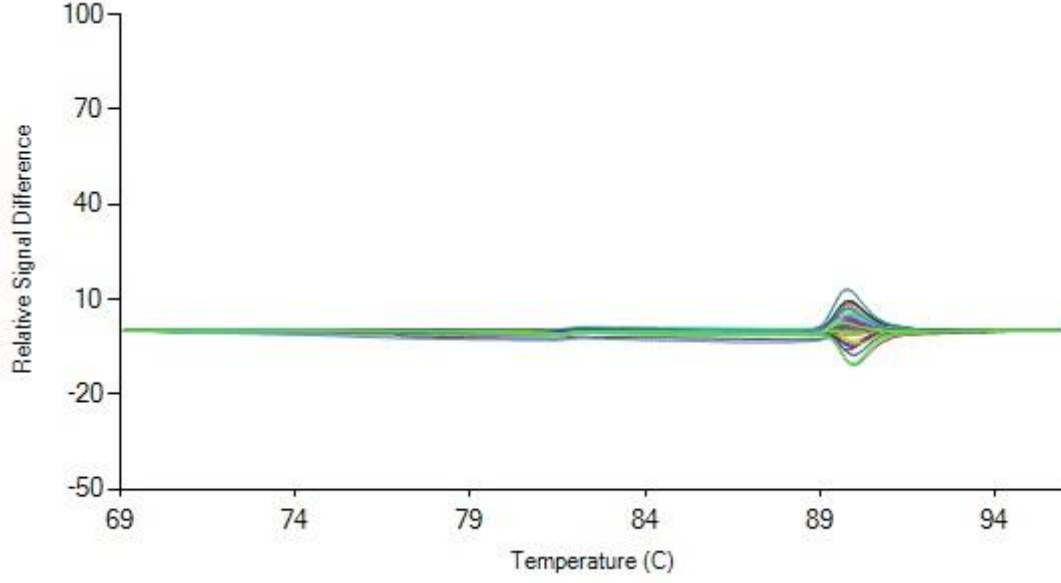
Şekil-7d. HisD HRM profilleri



Şekil-7e. PurE HRM profilleri



Şekil-7f. SucA HRM profilleri



Şekil-7g. ThrA HRM profilleri

Tablo-13. Farklı izolatlardan çoğaltılan genlerin HRM profillerinin %100 benzerlik gösteren gruplara ayrılması

Örnek Adı	HRM Gurubu						
	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA
6	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G1	HRM-G1
20	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G3	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
21	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G3	HRM-G2	HRM-G1	HRM-G1
28	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G3	HRM-G6	HRM-G2	HRM-G6	HRM-G1
75	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G4	HRM-G1	HRM-G1
76	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G5	HRM-G5	HRM-G3	HRM-G1	HRM-G3
78	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G3	HRM-G5	HRM-G3
90	HRM-G1	HRM-G3	HRM-G3	HRM-G2	HRM-G2	HRM-G6	HRM-G1
99	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G3	HRM-G2	HRM-G1	HRM-G4	HRM-G1
122	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G1	HRM-G1
131	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G3	HRM-G2	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
139	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G3	HRM-G6	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
148	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G1
151	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G1	HRM-G1
152	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
155	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G3	HRM-G6	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
253	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
254	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G3	HRM-G6	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
275	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G5	HRM-G1
292	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G4	HRM-G1
B-104	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G1
B-128	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G1	HRM-G5	HRM-G1
B-98	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1

Örnek Adı	HRM Gurubu						
	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA
47	HRM-G2	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G5	HRM-G1
147	HRM-G2	HRM-G2	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G6	HRM-G1
202	HRM-G2	HRM-G2	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G1
220	HRM-G2	HRM-G2	HRM-G2	HRM-G6	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G2
287	HRM-G2	HRM-G4	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G1
54	HRM-G3	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G5	HRM-G6	HRM-G1
5	HRM-G4	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
12	HRM-G4	HRM-G1	HRM-G3	HRM-G6	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
153	HRM-G4	HRM-G2	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
298	HRM-G4	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
B-A	HRM-G4	HRM-G1	HRM-G3	HRM-G6	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
92	HRM-G5	HRM-G6	HRM-G3	HRM-G4	HRM-G2	HRM-G6	HRM-G1
95	HRM-G5	HRM-G3	HRM-G3	HRM-G4	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G1
96	HRM-G5	HRM-G3	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G1
173	HRM-G5	HRM-G3	HRM-G1	HRM-G4	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G1
271	HRM-G5	HRM-G4	HRM-G5	HRM-G4	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
8	HRM-G6	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
88	HRM-G6	HRM-G1	HRM-G3	HRM-G6	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
126	HRM-G6	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G1	HRM-G1
146	HRM-G6	HRM-G2	HRM-G3	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G6	HRM-G1
154	HRM-G6	HRM-G2	HRM-G3	HRM-G6	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G4
250	HRM-G6	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G3	HRM-G2	HRM-G1	HRM-G1
251	HRM-G6	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
289	HRM-G6	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G2	HRM-G5	HRM-G1
B-100	HRM-G6	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G1	HRM-G6	HRM-G1
B-99	HRM-G6	HRM-G1	HRM-G3	HRM-G6	HRM-G2	HRM-G6	HRM-G1
249	HRM-G7	HRM-G5	HRM-G4	HRM-G1	HRM-G2	HRM-G3	HRM-G3

Çalışmada kullanılan genlerin hedef bölgelerinin DNA dizisini elde etmek için çift yönlü DNA dizi analizi yapılmıştır. Bir gen için yapılan HRM analizinin maliyeti çift yönlü DNA dizi analizi maliyetinin yaklaşık %5'i kadar olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada analiz edilen 50 örneğe ait 350 farklı DNA ampikonunun (50 izolat x 7 farklı gen) HRM analiz masrafı ise yaklaşık 18 örneğin çift yönlü DNA dizi analizi masrafına eşittir. HRM analizi sonucu toplamda 40 adet birbirinden farklı DNA dizisi elde edilmiştir. HRM analizi DNA dizi analizi ile aynı sonucu verdiği için sadece HRM analizi sonucunda farklı çıkan DNA'lar dizilenirse, 350 adet DNA dizi analizi yerine 58 adet (40+18) DNA dizi analizi yapılacağı, analiz maliyetinin % 83 oranında azaltılabileceği belirlenmiştir.

MLST Bulguları

Elde edilen DNA dizileri *Salmonella enterica* MLST veri bankasında (120) mevcut yazılımla analiz edilmiş ve MLST profilleri ortaya çıkarılmıştır. MLST veri bankasında, MLST ile daha önce analiz edilmiş izolatların verileri bulunmaktadır. Bu izolatların 7 farklı gen dizi profiline göre ST (Sequence Type) numaraları (ST No) yer almaktadır. ST No'ları aynı olan dizilerin 7 farklı hizmetçi gen dizileri %100 benzerlik göstermektedir. Hizmetçi gen dizi profilleri birbirine benzeyen ve az miktarda farklılık içeren ST'ler, ST Kompleks (ST KS)'leri oluşturmaktadır. Bu çalışmada analiz edilen 50 izolatın sadece 3 adedinin (izolat no 6, 122 ve 151) MLST veri tabanındaki ST' lere %100 benzediği saptanmış, her üç izolatın da ST11'e %100 benzediği tespit edilmiştir.

MLST sonucu 6, 122 ve 151 numaralı izolatlar bir genotipi; 152 ve 253 numaralı izolatlar diğer bir genotipi; 155 ve 254 numaralı izolatlar ise başka bir genotipi temsil ederken, diğer izolatların tümü farklı genotipleri temsil etmiştir. 50 izolatta 46 farklı genotip belirlenerek, MLST'nin *Salmonella enterica* tiplendirmesinde çözünürlüğünün çok yüksek olduğu saptanmıştır. MLST analiz sonuçları Tablo-14'de gösterilmiştir.

Tablo-14. MLST analiz sonuçları

Kaynak	Örnek Adı	Hizmetçi Gen Tipleri							MLST veri tabanında en çok benzediği dizi tipleri		Konvansiyonel Serotiplendirme	
		aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA	ST KS No	ST No	Serogrup	Serotip
Bu çalışma	6	5	2	3	7	6	6	11	4	ST11	D1(O:9)	Enteritidis
	122	5	2	3	7	6	6	11	4	ST11	D1(O:9)	Enteritidis
	151	5	2	3	7	6	6	11	4	ST11	D1(O:9)	Enteritidis
Veri tabanı	ST11	5	2	3	7	6	6	11	4	ST11		Montevideo
Bu çalışma	139	5	7	22	522	6	90	11		ST1702	D1(O:9)	Enteritidis
	155	5	2	22	522	6	90	11		ST1702	D1(O:9)	Enteritidis
	254	5	2	22	522	6	90	11		ST1702	D1(O:9)	Enteritidis
	B-98	5	2	3	522	6	90	11		ST1702	D1(O:9)	Enteritidis
	B-128	5	2	3	522	5	90	11		ST1702	D1(O:9)	Enteritidis
Veri tabanı	ST1702	5	2	3	522	6	6	11	4	ST1702		Montevideo
Bu çalışma	28	5	2	22	522	6	431	11		ST1940	D1(O:9)	Enteritidis
	54	39	2	3	7	120	431	11		ST1940	D1(O:9)	Enteritidis
	90	5	18	22	10	6	431	11		ST1940	C1(O:7)	
	92	413	47	22	17	6	431	11		ST1940	C1(O:7)	
	96	413	18	3	522	5	431	11		ST1940	C1(O:7)	
	147	14	7	3	7	6	431	11		ST1940	D1(O:9)	Enteritidis
	148	5	7	3	7	5	431	11		ST1940	D1(O:9)	Enteritidis
	202	14	7	3	7	5	431	11		ST1940	C1(O:7)	
	287	14	37	3	522	5	431	11		ST1940	B (O:4)	
B-104	5	2	3	7	5	431	11		ST1940	D1(O:9)	Enteritidis	
Veri tabanı	ST1940	5	2	3	7	6	431	11	4	ST1940		Montevideo

Kaynak	Örnek Adı	Hizmetçi Gen Tipleri							MLST veri tabanında en çok benzediği dizi tipleri		Konvansiyonel Serotiplendirme	
		aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA	ST KS No	ST No	Serogrup	Serotip
Bu çalışma	8	492	2	3	7	6	90	11		ST1967	D1(O:9)	Enteritidis
	88	492	2	22	522	6	90	11		ST1967	D1(O:9)	Enteritidis
	126	492	2	3	7	6	6	11	-	ST1967		
	146	492	7	22	7	6	431	11		ST1967	D1(O:9)	Enteritidis
	250	492	2	3	12	6	6	11		ST1967		
	251	492	2	3	7	6	90	11		ST1967	D1(O:9)	Enteritidis
	289	492	2	10	255	6	90	11		ST1967	D1(O:9)	Enteritidis
	B-99	492	2	22	522	6	431	11		ST1967	D1(O:9)	Enteritidis
	B-100	492	2	3	7	5	431	11		ST1967	D1(O:9)	Enteritidis
Veri tabanı	ST1967	492	2	3	7	6	6	11	-	ST1967		
Bu çalışma	95	413	18	22	17	5	431	11		ST32	C1(O:7)	
Veri tabanı	ST32	17	18	22	17	5	21	19	31	ST32		Newport
Bu çalışma	173	413	18	3	17	5	431	11		ST41	C1(O:7)	
Veri tabanı	ST41	17	18	12	17	5	21	19	31	ST41		Newport
Bu çalışma	75	5	47	3	7	41	6	11		ST470		
Veri tabanı	ST470	5	2	3	7	31	6	11	4	ST470		Montevideo
Bu çalışma	21	5	2	263	12	6	6	11		ST616		
Veri tabanı	ST616	5	2	130	7	6	6	11	4	ST616		Montevideo
Bu çalışma	20	5	2	22	7	6	90	11		ST640		
	131	5	7	22	10	6	90	11		ST640	C1(O:7)	
	152	5	2	3	7	6	90	11		ST640	D1(O:9)	Enteritidis
	253	5	2	3	7	6	90	11		ST640	D1(O:9)	Enteritidis
	292	5	2	3	7	6	21	11		ST640	D1(O:9)	Enteritidis

Kaynak	Örnek Adı	Hizmetçi Gen Tipleri							MLST veri tabanında en çok benzediği dizi tipleri		Konvansiyonel Serotiplendirme	
		aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA	ST KS No	ST No	Serogrup	Serotip
Veri tabanı	ST640	5	2	3	7	6	11	11	4	ST640		Montevideo
Bu çalışma	154	492	7	22	522	6	90	506		ST695	D1(O:9)	Enteritidis
Veri tabanı	ST695	2	7	9	9	6	9	12	26	ST695		Thompson
Bu çalışma	5	214	2	3	7	6	90	11		ST745	D1(O:9)	Enteritidis
	12	214	2	22	522	6	90	11		ST745	D1(O:9)	Enteritidis
	153	214	7	3	7	6	90	11		ST745	D1(O:9)	Enteritidis
	298	214	2	3	522	6	90	11		ST745	D1(O:9)	Enteritidis
	B-A	214	2	22	522	6	90	11		ST745	D1(O:9)	Enteritidis
Veri tabanı	ST745	214	2	3	7	6	6	11	4	ST745		Montevideo
Bu çalışma	76	5	47	230	255	9	6	285		ST762		
Veri tabanı	ST762	5	2	3	255	31	6	203	4	ST762		Montevideo
Bu çalışma	271	413	37	230	17	6	90	11		ST814	B (O:4)	
Veri tabanı	ST814	233	2	3	7	6	6	11	4	ST814		Montevideo
Bu çalışma	249	519	42	43	7	6	12	285		ST82	D1(O:9)	Enteritidis
Veri tabanı	ST82	41	42	43	12	9	12	2	8	ST82		Typhi
Bu çalışma	220	14	7	10	522	5	10	14		ST850	C1(O:7)	
Veri tabanı	ST850	121	7	10	103	2	10	14	9	ST850		
Bu çalışma	47	14	2	3	7	5	90	11		ST92	D1(O:9)	Enteritidis
	78	5	47	3	10	9	90	285		ST92	C2-C3(O:8)	
	99	5	2	22	10	5	21	11		ST92	C1(O:7)	
	275	5	7	3	7	5	90	11		ST92	D1(O:9)	Enteritidis
Veri tabanı	ST92	5	2	3	7	31	41	11	4	ST92		Montevideo

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmanın ilk hedefi, hayvan ve hayvansal kaynaklı gıdalarda *Salmonella* serotipleri içinde en fazla görülen *S. Enteritidis*'in hızlı saptama imkanı veren SE-rPCR yöntemi ile konvansiyonel serotiplendirme sonuçlarını karşılaştırarak, laboratuvar hizmetlerinde kullanma potansiyelini değerlendirmektir. İkinci hedefi ise moleküler tiplendirme metodu olan MLST yöntemi ile çalışmada kullanılan *Salmonella* izolatlarını tiplendirerek, çıkan sonuçların literatürde ilk kez denenecek MLST sonrası yapılan HRM analizi sonuçlarıyla karşılaştırmak ve HRM analizinin MLST tiplendirmesinde kullanım olasılığını araştırmaktır.

Geçtiğimiz yıllarda araştırmacılar, serotiplendirmede moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla ilgili çok sayıda çalışma yapmıştır (22, 121-125). *S. Enteritidis* belirlenmesine yönelik diğer çalışmalar da, PCR tabanlı yöntemlerin duyarlılık, özgüllük ve relatif doğruluk oranlarının yüksek olduğunu ortaya koymuştur (126-129). Bu çalışmada da *S. Enteritidis* belirlenmesinde rPCR'ın duyarlılık, özgüllük ve relatif doğruluk oranlarının, diğer çalışmalar ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir (126-129).

Maciel ve arkadaşları (127) ile Lungu ve arkadaşlarının (128) gerçekleştirdikleri *S. Enteritidis*'in moleküler tespitine yönelik çalışmalarda referans yöntemine göre kullanılan alternatif yöntemin karşılaştırmasına yönelik uyum ve güvenilirliği gösteren istatistiksel bir yöntem olan Cohen'nin kapa değerleri sırasıyla 0.41 ve 0.46 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda bu değer (0.86) diğer çalışmalara göre daha yüksek olarak tespit edilmiştir (Tablo-9). Bu farkın en temel nedenlerinden biri olarak, çalışmalarda kullanılan *S. Enteritidis* belirlenmesine yönelik olarak kullanılan primer dizilerindeki ve hedef gen bölge seçimindeki farklılıklar olarak düşünülmüştür.

Bu çalışmada, *S. Enteritidis* serotiplerinin belirlenmesinde SE-rPCR ile konvansiyonel serotiplendirme sonuçları benzer sonuçlar göstermiş olmasına karşın SE-rPCR'ın (36/58; % 62.1) *S. Enteritidis* serotiplendirmesinde konvansiyonel serotiplendirmeye (32/58; % 55.2) göre daha hassas olduğu belirlenmiştir (Tablo-8). Diğer araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda da benzer olarak, *S. Enteritidis* saptanmasında rPCR'ın konvansiyonel yöntemlere göre daha hassas olduğu bulunmuştur (123, 128, 129). Yöntemler arası bu farkın en önemli nedenlerinin: (1) çalışmada kullanılan izolatların çeşitli sayıda yapılan

pasajlar ile antijenik yapılarında bazı değişikliklerin meydana gelmesi, (2) bir örnekten elde edilen *Salmonella* kültürünün saf olduğu düşünülmesine rağmen birden fazla izolatu (serogrubu/serotipi) barındırıyor olma olasılığı ve ayrıca bu durumun bu tür mikس kültürlerin birbirinden izole edilemesindeki zorlukların bulunması durumu ile oluşabileceği düşünülmüştür (129). Bununla birlikte SE-rPCR'ın DNA tabanlı bir yöntem olması nedeniyle, bu pasajlamalar sonucu oluşabilecek antijenik determinant farklılıklarından etkilenmeyeceği kanısına varılmıştır.

Konvansiyonel serotiplendirme ile B (O:4), C₁ (O:7) ve C₂-C₃ (O:8) grubu olarak sero gruplandırılan izolatlar SE-rPCR ile *S. Enteritidis* negatif olarak tespit edilmiştir. Bu bulgu konvansiyonel serotiplendirme sonuçlarına göre SE-rPCR'ın yanlış pozitif sonuç vermediğini göstermiştir. RPCR'ın *S. Enteritidis* saptanmasında duyarlılığını da benzer şekilde %100 olarak bulunmuştur. Bu durum moleküler bir yöntem olan SE-rPCR'ın hassasiyetinin bir göstergesi olarak düşünülmüştür.

Çalışmada 10 adet izolat ne SE-rPCR ne de konvansiyonel yöntem ile sero gruplandırılmamış/serotiplendirilememiştir (Tablo-8). Bu durumun olası iki nedeni şu şekilde tartışılabilir: ilki olarak; konvansiyonel serotiplendirme yönteminde, bu çalışmada kullanılan antiserum setleri klinik yönden önem arz eden *S. enterica* subsp. *enterica* alt grubunda bulunan serotiplerin sero gruplandırılmasına/serotiplendirmesine yönelik olarak seçilmiştir. Söz konusu izolatların bu alt grubun dışındaki *Salmonella* serotipleri olması sero gruplandırılmama/serotiplendirilememenin nedeni olabilir. İzolatların çeşitli defalar geçirdikleri pasaj sayısının da sero gruplandırmada/serotiplendirme gerekli olan bazı antijenik determinantların kaybı ile sonuçlanmasının da ikinci bir neden olabileceği düşünülebilir.

Konvansiyonel serotiplendirme moleküler metotların uygulandığı çeşitli çalışmalarda zaman alan, yüksek kaliteli çok sayıda antiserum gerektiren, pahalı ve düşük verimli bir yöntem olarak tanımlanmıştır (9-10). Ülkemizdeki referans laboratuvarlarında *Salmonella* serotiplendirmesinin 10-12 günlük bir süreye ihtiyaç gösterdiği ifade edilmektedir (130). İnfeksiyon ile mücadelede önemli yeri olan taşıyıcı hayvanların ortaya çıkarılması, gıda güvenliği ve salgın durumlarında serotiplerin hızlı ve kolay bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir (127-128). Ayrıca, identifikasyonun gecikmesi hastalık salgınının zamanında belirlenememesine ve dolayısıyla epidemiyolojik sörveyin aksamasına yol açması bakımından önem taşımaktadır. SE-rPCR ile serotiplendirme, izolatların

üretilmelerinin ardından, 5 saatlik bir zaman dilimi içerisinde gerçekleştirilmesi açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır. SE-rPCR yönteminin tarama testi olarak kullanılmasıyla çok sayıda antiserumla yapılması gereken aglütinasyon testlerine gereksinimin azalacağı, zaman ve maliyet açısından kazanç sağlanabileceği düşünülmektedir. Ancak, *Salmonella* serotipleri arasında tek bir serotipi belirleme yönteminin en önemli dezavantajı olarak görülmüştür.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar sırasıyla HRM'nin MLST ile *Salmonella enterica* tiplendirmesinde DNA dizi analizinin yerini alabileceğini, HRM ile MLST maliyetinin yaklaşık %80 oranında azaltılabileceğini ve MLST'nin *Salmonella enterica* tiplendirmesinde çözünürlüğünün klasik serotiplendirmeye nazaran çok daha yüksek olduğunu göstermiştir. Diğer *Salmonella* popülasyonlarının genetik motif çalışılmalarında da MLST'nin konvansiyonel serotiplendirmeye nazaran daha yüksek çözünürlükte sonuç verdiği bildirilmektedir (131, 132). Bu çalışma ile literatürde ilk kez HRM analizi MLST ile genotiplendirmede kullanılmış ve HRM kullanımının maliyet düşürücü avantajı ortaya konulmuştur.

Salmonella spp. izolatlarının üretilmelerinin ardından yapılan ardışık iki rPCR ile dizi analizi sonuçlarının alınması ve ham verilerin MLST veri bankasından ST numaralarına göre genotiplendirilmelerinin gerçekleştirilmesi asgari 4 gün süre almıştır. Buna karşın, iki rPCR'in ardından izolatlara ait HRM profilleri bir iş gününde elde edilmiştir. Bu sonuç, *Salmonella* genotiplendirilmesinde HRM analizinin MLST ile birlikte yapıldığında zaman açısından süreyi çok kısaltan alternatif bir yöntem olduğunu göstermiştir.

MLST çalışmasına alınan izolatlardan, konvansiyonel serotiplendirme ile 2 adet izolat B (O:4), 9 adet izolat C₁ (O:7), 1 adet izolat C₂-C₃ (O:8) grubu olarak serogruplandırılırken 6 adet izolat serogruplandırılmamış/serotiplendirilememiş olup toplamda 18 izolatın serotipi belirlenememiştir (Tablo-14). Bu durumun bir nedeninin yukarıda da belirtildiği üzere, konvansiyonel serotiplendirme yönteminde bu çalışmada kullanılan antiserum setleri klinik yönden önem arz eden *S. enterica* subsp. *enterica* alt grubunda bulunan serotiplerin serogruplandırılmasına/serotiplendirilmesine yönelik olarak seçilmesi ve söz konusu izolatların bu alt grubun dışındaki *Salmonella* serotipleri olmasının serogruplandırılmama/serotiplendirilememenin nedeni olabileceği düşünülmüştür. Bunun dışında yine yukarıda da belirtildiği gibi söz konusu izolatların pasaj sonrası kaybettikleri bazı antijenik özelliklerinin de bu duruma sebep olabileceği değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, MLST

çalışmasında kullanılan geri kalan 32 izolatın tümü konvansiyonel serotiplendirme ile *S. Enteritidis* olarak serotiplendirilmiştir. Diğer bir ifadeyle, konvansiyonel serotiplendirmenin, MLST çalışmasında kullanılan 50 izolat arasındaki farklılıkları ortaya koymada yetersiz kaldığı görülmüştür. MLST ile gerçekleştirilen genotiplendirme ile 50 farklı izolat 46 farklı MLST genotipine ayrılmıştır. Bu sonuç moleküler bir yöntem olan MLST'nin çözünürlüğünün yüksek bir yöntem olduğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Salmonella enterica subspecies *enterica* serolojik özelliklerine dayalı olarak 1500'den fazla serovara ayrılmaktadır (13). Serolojik olarak ayırt edilemeyen serotipler ise substrat kullanım özelliklerine dayalı olarak biyotiplendirme ile ayırt edilmektedir. Yetmiş beş'den fazla bakteri türünün tiplendirilmesinde kullanılan MLST (107) yaygın olarak kullanılmakta ve bakteriyel popülasyonların genetik motif çalışılmalarında altın standart olarak kabul edilmektedir (133-137). MLST 6-8 farklı hizmetçi gen (house-keeping gen) kullanarak, DNA dizilerinin yaklaşık 400–600 bp'lik bölgelerindeki DNA dizi polimorfizmine dayanmaktadır. *Salmonella enterica* tiplendirilmesinde 7 farklı hizmetçi gen bölgesi (*aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* ve *thrA*) hedeflenmektedir (26). MLST'de her bir allelik varyanta, o varyanta spesifik bir sayı atanmaktadır. Farklı genler için oluşturulan allelik varyant profili, dizi tipleri (STs) olarak adlandırılmaktadır. Birbirlerine yakın benzerlik gösteren STs'lerin oluşturduğu gruplar ise ST kompleksler olarak adlandırılmaktadır. *Salmonella enterica* MLST tiplendirilmesinde 500'ün üzerinde serovara ait 7000'den fazla ST, 3088 ST kompleks grubu oluşturulmuştur (138). ST komplekslerinin büyük bir çoğunluğu tek bir serovara ait izolatlardan oluşmakla birlikte, istisnai durumlar da söz konusu olmaktadır (131). MLST veri tabanında ST11 genotipindeki izolatlar *S. Montevideo* serotipinde olmakla birlikte, bu çalışmada ST11 genotipine %100 benzeyen 3 farklı izolat konvansiyonel serotiplendirme ile *S. Enteritidis* olarak serotiplendirilmiştir. Diğer bir ifadeyle, serotiplendirme ve genotiplendirmenin farklı sonuçlar verebileceği bu çalışmada ortaya konulmuştur. Üç adet izolatın dışında kalan 47 izolata MLST veri bankasında %100 benzeyen serovar bilgisini içeren ST kompleks grubu olarak eşleştirilememiştir. Bunun nedeninin bu çalışmada MLST ile tiplendirilen izolatlara ait bilgilerin daha önce MLST veri bankasına gönderilmemiş olmasından ileri gelmekte olduğu düşünülmektedir. MLST veri bankasında bulunan ST'lerin sayısının artmasının serovar tiplendirme olasılığını yükselteceği düşünülmektedir.

Konvansiyonel serotiplendirmenin moleküler bir yöntem olan SE-rPCR'a göre dezavantajlara sahip olduğu daha önce belirtilmiştir. Konvansiyonel serotiplendirme, MLST ile karşılaştırıldığında da zaman dışında aynı dezavantajlara sahiptir. Wattiau ve arkadaşları (100) MLST'yi konvansiyonel yöntem ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, MLST'nin çok sayıda antiserumla yapılması gereken aglütinasyon testlerine gereksinimi azaltan, ancak zaman ve maliyet açısından eşdeğer bir yöntem olarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada benzer sonuçlara ulaşılmıştır.

HRM analizinde hedef DNA molekülü öncelikle PCR ile çoğaltılmaktadır. Çoğaltılan DNA molekülleri çift zincirli yapıdayken HRM boyaları DNA'ya bağlı olarak bulunmaktadır. Sıcaklığın giderek artırılmasıyla HRM boyaları çift zincir yapısı bozulan DNA'dan ayrılmakta ve DNA'dan gelen ışımaya azalmaktadır. Işımanın azalma profili tamamen analiz edilen DNA'nın dizilimine bağlıdır. Bu nedenle HRM analizi sonucunda dizi spesifik bir profil elde edilmektedir. Mevcut HRM teknolojisi, eş zamanlı analiz edilen DNA'ları, HRM profil benzerliği, dolayısıyla DNA dizi benzerliklerine göre gruplayabildiği bildirilmektedir (5). Bu çalışma sonunda da HRM profil benzerliği ile oluşturulan grupların DNA dizi benzerliği ile oluşturulan gruplar ile %100 örtüştüğü belirlenmiştir. Bu uyum, *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* ve *thrA* genlerinin MLST analizi için hedeflenen DNA bölgelerinde HRM analizinin DNA dizi analizi kadar spesifik olarak kullanım alanı bulabileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak, dünyada halk sağlığı açısından önemini koruyan *Salmonella* etkenleri arasında görülme sıklığı oldukça yüksek olan *S. Enteritidis*'in serotiplendirilmesinde SE-rPCR, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir yöntemdir. SE-rPCR ile *S. Enteritidis* dışındaki serotiplerin belirlenmesi mümkün olmadığından, konvansiyonel serotiplendirmenin alternatifi olarak değerlendirilemez. Farklı serotiplerin de deteksiyonu için farklı primerlerle bağlanan alternatif rPCR protokolleri oluşturulabilir. Temel rPCR ekipmanı ile konvansiyonel yöneme göre hızlı uygulanan bu yöntem, *S. Enteritidis*'in sıklıkla tespit edildiği çeşitli gıda, endüstriyel hayvan işletmelerinde ve salgın olgularında ilgili laboratuvarlarda etkenin monitorize edilmesi, infeksiyonla mücadelede başarılı strateji planı için gerekli olduğu değerlendirilmektedir. Bu çalışmada, TUBITAK 113Y179 projesi kapsamında geliştirilen HRM analiz yazılımı kullanılmış olup, bu yazılım belirlenen HRM profillerini, saklayabilen ve birbiri ile karşılaştırabilen bir özelliktedir. Bu yazılım tez kapsamında şu ana kadar analiz edilen tüm izolatların profillerini

saklamaktadır. Oluřturulan HRM profil bankasının genişletilmesiyle, MLST'nin DNA dizi analizi ile değil, sadece HRM profilleriyle de yapılabilir hale gelineceği dūřünölmektedir. Bu tezi takip eden çalışmalarla bahsi geçen HRM profil veri bankasının genişletilmesi ve sadece bu profillere dayalı bir MLST veri bankasının kurulması hedeflenmektedir.

EKLER

EK-1: Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

A	: Adenin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADP	: Adenozin Difosfat
AOAC	: Association of Official Analytical Chemists
APHA	: American Public Health Association
ATP	: Adenozin Trifosfat
bp	: Baz Çifti
C	: Sitozin
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
Ct	: Eşik Döngü Sayısı
cm	: Santimetre
CO ₂	: Karbondioksit
dH ₂ O	: Distile Su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksi Nükleotit Trifosfat
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
F primer	: Forward Primer
FDA	: U.S.Food and Drug Administration
G	: Guanin
g	: Gram
H ₂ S	: Hidrojen Sülfür
HPB	: Health Protection Branch-Canada
HRM	: Yüksek Çözünürlükte Erime
IC	: Internal Control
ICMSF	: International Commission on Microbiological Specifications for Foods
NAS	: National Academy of Sciences
IMS	: Immunomayetik Separasyon
ISO	: The International Organization for Standardization

kb	: Kilobase
KCN	: Potassium Cyanide
kg	: Kilogram
LPS	: Lipopolisakkarid
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
ml	: Mililitre
MLST	: Multilocus Sequence Typing
MLVA	: Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis
mm	: Milimetre
NaCl	: Sodyum Klorür
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
ng	: Nanogram
ONPG	: O-nitrophenyl-beta-D-galaktopyranside
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
pH	: Hidrojenin Gücü
pmol	: Pikomol
R primer	: Reverse Primer
RNA	: Ribo Nükleik asit
rPCR	: Real-time PCR
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SE-rPCR	: S. Enteritidis Spesifik Real-Time PCR
sn	: Saniye
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism)
ST	: Sekans Tiplerine
T	: Timin
TE	: Tris EDTA
tRNA	: Taşıyıcı RNA
U	: Ünite
USDA	: Amerika Tarım Departmanı (United States Department of Agriculture)
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
XLD	: Xylose Lysine Deoxycholate
XLT4	: Xylose Lysine Tergitol 4
µl	: Mikrolitre

μm : mikrometre
 μM : Mikromolar

KAYNAKLAR

1. BHAN MK, BAHL R, BHATNAGAR. S. Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet*, 366: 749–762, 2005.
2. NAIR S, LIN TK, PANG T, ALTWEGG, M. Characterization of Salmonella serovars by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis. *Journal Of Clinical Microbiology*, 40: 2346–2351, 2002.
3. PORWOLLIK S, BOYD EF, CHOY C, CHENG P, FLOREA L, PROCTOR E, MCCLELLAND M. Characterization of Salmonella enterica subspecies I genovars by use of microarrays. *Journal of Bacteriology*, 186: 5883–5898, 2004.
4. WILKES JG, RUSHING L, NAYAK R, BUZATU DA, SUTHERLAND JB. Rapid phenotypic characterization of Salmonella enterica strains by pyrolysis metastable atom bombardment mass spectrometry with multivariate statistical and artificial neural network pattern recognition. *Journal Of Microbiological Methods*, 61: 321–334, 2005.
5. REED GH, KENT JO, WITWER CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8(6): 597-608, 2007.
6. TORPDAHL M, AHRENS P. Population structure of Salmonella investigated by amplified fragment length polymorphism. *Journal Of Applied Microbiology*, 97: 566–573, 2004.
7. ANONİM. Kuluçkahane ve Damızlık İşletmelerin Sağlık Kontrol Yönetmeliği ve Talimatı. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, sayfa 1-64. 1998.
8. ANONYMOUS. Molecular typing of Salmonella strains isolated from food, feed and animals: state of play and standard operating procedures for pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) typing, profiles interpretation and curation. European Food Safety Authority, 2014.
9. HERRERA-LEON S, MCQUISTON JR, USERA MA, FIELDS PI, GARAIZAR J. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of Salmonella spp. *Journal Of Clinical Microbiology*, 42: 2581–2586, 2004.
10. MCQUISTON JR, PARRENAS R, ORTIZ-RIVERA M, GHEESLING L, BRENNER F. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes fliC, fljB, and flpA from Salmonella. *Journal Of Clinical Microbiology*, 42: 1923–1932, 2004.
11. HERIKSTAD H, MOTARJEMI Y, TAUXE RV. Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiology and Infection*, 129: 1–8, 2002.
12. BOPP CA, BRENNER FW, FIELDS PI, WELLS JG, STOCKBINE NA. Escherichia, Shigella, and Salmonella. *Manual Of Clinical Microbiology*, 8th ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D.C. page 654–671, 2003.
13. GRIMONT PAD, WEILL F. Antigenic formulae of the Salmonella serovars: White-Kauffmann-Le Minor Scheme, 9th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Available at <http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089> (Erişim Tarihi: Eylül 2013) 2007.

14. UZZAU S, HOVI M, STOCKER BA. Application of ribotyping and IS200 fingerprinting to distinguish the five *Salmonella* serotype O6,7: c:1,5 groups: *Choleraesuis sensu stricto*, *Choleraesuis* var. *Kunzendorf*, *Choleraesuis* var. *Decatur*, *Paratyphi C*, and *Typhisuis*. *Epidemiology And Infection*, 123: 37–46, 1999.
15. ALVAREZ J, SOTA M, VIVANCO AB, PERALES I, CISTERNA R, REMENTERIA A, GARAIZAR J. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *Journal Of Clinical Microbiology*, 42: 1734–1738, 2004.
16. PERCH M, BRADEN CR, BISHOP R, FIELDS P, PLIKAYTIS R, TAUXE RV. *Salmonella* surveillance summary. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Ga. 2003.
17. CAI HY, LU L, MUCKLE CA, Prescott JF, Chen S. Development of a novel protein microarray method for serotyping *Salmonella enterica* strains. *Journal Of Clinical Microbiology*, 43: 3427–3430, 2005.
18. ESTEBAN E, SNIPES K, HIRD D, KASTEN R, KINDE H. Use of ribotyping for characterization of *Salmonella* serotypes. *Journal Of Clinical Microbiology*, 31: 233–237, 1993.
19. VUGIA D, CRONQUIST A, HADLER J, TOBIN-D'ANGELO M, BLYTHE D, SMITH K, THORNTON K, MORSE D, CIESLAK P, JONES T, VARGHESE R, GUZEWICH J, ANGULO F, GRIFFIN P, TAUXE R, DUNN J. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—10 sites, United States. *Morbidity And Mortality Weekly Report*, 54: 352–356, 2005.
20. EZQUERRA E, BURNENS AP, FRITH K, COSTAS M, STANLEY J. Molecular genotype analysis of *Salmonella bovis*morbificans. *Molecular and Cellular Probes*, 7: 45–54, 1993.
21. JENSEN MA, HUBNER RJ. Use of homoduplex ribosomal DNA spacer amplification products and heteroduplex cross-hybridization products in the identification of *Salmonella* serovars. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2741–2746, 1996.
22. WANG SJ, YE H DB, WEI CI. Specific PCR Primers for the Identification of *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* in Chicken-Related Samples *Journal of Food and Drug Analysis*, 17: 183-189, 2009.
23. KWON YK, KIM A, KANG MS, HER M, JUNG BY, LEE KM, JEONG W, AN BK, KWON JH. Prevalence and characterization of *Salmonella Gallinarum* in the chicken in Korea during 2000 to 2008. *Poultry Science*, 89: 236-42, 2010.
24. ZEINZINGER J, PIETZKA AT, STÖGER A, KORNSCHÖBER C, KUNERT R, ALLERBERGER F, RUPPITSCH W. One-Step Triplex High-Resolution Melting Analysis for Rapid Identification and Simultaneous Subtyping of Frequently Isolated *Salmonella* Serovars. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9), 3352-3360, 2012.
25. STING R, NAGEL C, STENG G. Detection methods for *Salmonella abortus ovis* and examinations in sheep flocks in northern Baden-Württemberg] *Zentralbl Veterinarmed B*, 44: 87–98, 1997.
26. ACHTMAN M, WAIN J, WEILL FX, NAIR S, ZHOU Z, SANGAL V, BRISSE S. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *Plos Pathogens*, 8(6): e1002776, 2012.

27. SHANGKUAN YH, LIN HC. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella typhi* and other *Salmonella* species. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 693–702, 1998.
28. REJA V, KWOK A, STONE G, YANG L, MISSEL A, MENZEL C, BASSAM B. Advanced statistical software for supervised and unsupervised high resolution melting (HRM) analysis. *Methods*, 50(4): 10-14, 2010.
29. DHAKAL R, CHAUHAN K, SEALE RB, DEETH HC, PILLIDGE CJ, POWELL IB, CRAVEN HR, TURNER MS. Genotyping of dairy *Bacillus licheniformis* isolates by high resolution melt analysis of multiple variable number tandem repeat loci. *Food Microbiology*, 34(2): 344-51, 2013.
30. GAGO S, LORENZO B, GOMEZ-LOPEZ A, CUESTA I, CUENCA-ESTRELLA M, BUITRAGO MJ. Analysis of strain relatedness using High Resolution Melting in a case of recurrent candiduria. *BMC Microbiology*, 13(1): 13, 2013.
31. KONEMAN E, WASHINGTON WJ, ALLEN S, JANDA W, PROCOP G, SCHRECKENBERGER P, WOODS G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* sixth edition. USA: Lippincott Williams & Wilkins, page 211-303, 2006.
32. REEVES MV, EVINS GB, HEBIA AA. Clonal nature of salmonella typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of salmonella bongori. *Journal of Clinical Microbiology*, 27: 313-320, 1989.
33. BRENNER FW, VILLAR RG, ANGULO FJ, TAUXE R, SWAMINATHAN B. *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 2465-2467, 2000.
34. İZGÜR M. *Salmonella* İnfeksiyonları. *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*. Ankara İlke-Emek Yayınları, sayfa: 116-121, 2006.
35. BARROW PA. The paratyphoid salmonellae. *Revue Scientifique Et Technique (International Office Of Epizootics)*, 19: 351-375, 2000.
36. BİLGEHAN H. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. İzmir Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları. sayfa 425-455, 2004.
37. GAST RK. *Salmonella* Infections. *Diseases of poultry* 11. Ed. Iowa State Press page 567-613, 2003.
38. İZGÜR M. *Salmonella* İnfeksiyonları. *Kanatlı Hayvan Hastalıkları*. Ankara Medisan Yayınevi, sayfa 41-53, 2002.
39. LI J, SMITH KN, CRICHTON PB, OLD DC, WHITTAM TS, SELANDER RK. Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile salmonella. *Journal of Medical Microbiology*, 38: 129-139, 1993.
40. SHIVAPRASAD HL. Fowl Typhoid and Pullorum disease. *Revue Scientifique Et Technique (International Office Of Epizootics)*, 19: 405-424, 2000.
41. SHIVAPRASAD HL. *Salmonella* Infections. *Diseases Of Poultry*. Iowa State Press page 568-582, 2003.
42. HOLT JG, KRIEG NR, SNEATH PHA, STALEY JT, WILLIAMS ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Edition. 1994.
43. OPARA OO, CARR LE, RUSSEK-COHEN E, TATE CR, MALLINSON ET, MILLER RG, STEWART LE, JOHNSTON RW, JOSEPH WS. Correlation of water

- activity and other environmental conditions with repeated detection of Salmonella contamination on poultry farms. *Avian Diseases*, 36: 664-671 1992.
44. MCDERMID AS, LEVER MS. Survival of Salmonella enteritidis PT4 and S. typhimurium Swindon in aerosol. *Letters in Applied Microbiology*, 23: 107-109, 1996.
 45. PENNYCOTT TW, DUNCAN G. Salmonella pullorum in the common pheasant . *The Veterinary Record*, 144: 283-287, 1999.
 46. BARROW PA, LOWELL MA, MURPHY CK, PAGE K. Salmonella infection in a commercial line of ducks; Experimental studies in virulence, intestinal colonization and immune protection. *Epidemiology and Infection*, 123: 121-132, 1999.
 47. BUCHOLZ PS, FAIRBROTHER A. Pathogenicity of Salmonella pullorum in northern bobwhite quail and mallard ducks. *Avian Diseases*, 36: 304-312, 1992.
 48. BARROW PA. In-vitro and in-vivo characteristics of TnpHoA mutant strains of Salmonella serotype gallinarum not invasive for tissue culture cells. *Journal Of Medical Microbiology*, 36: 389-397, 1992.
 49. MAYAHI M, SHARMA RN, MAKTABI S. An outbreak of blindes in chicks associated with Salmonella pullorum infection *The Indian Veterinary Journal*, 72: 922-925, 1995.
 50. MDEGELA RH, YONGOLO GS, MINGA UM, OLSEN JE. Molecular epidemiology of Salmonella gallinarum in chickens in Tanzania. *Avian Pathology*, 29: 457-463, 2000.
 51. SATO Y, SATO G, TUCHILI L, PANDY GS, NAKAJIMA A, CHIMANA H, SINSUNGWE H. Status of Salmonella gallinarum-pullorum infections in poultry in Zambia. *Avian Diseases*, 41: 490-495, 1997.
 52. DAVIES RH, NICHOLAS RAJ, MCLAREN IM, CORKISH JD, LANNING DG, WRAY C. Bacteriological and serological investigation of persistent Salmonella enteritidis infection in an integrated poultry organisation. *Veterinary Microbiology*, 58: 277-293 1997.
 53. WARD MP, RAMER JC, PROUNDFOOT J, GARNER MM, JUAN-SALLES C, WU CC. Outbreak of Salmonellosis in a Zoologic Collection of Lorikeets and Lories (*Trichoglossus*, *Lorius* and *Eos* spp.). *Avian Diseases*, 47: 493- 498 2003.
 54. EROL İ. Salmonella. *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*. Pozitif Matbaacılık Ltd. Sti., sayfa 60-70, 2007.
 55. HENDERSON SC, BOUNOUS DI, LEE MD. Early Events in the Pathogenesis of Avian Salmonellosis. *Infection and Immunity*, 67(7): 3580-3586, 1999.
 56. PORTER RE, HOLT PS. Effect of induced molting on the severity of intestinal lesions caused by Salmonella enteritidis infection in chickens. *Avian Diseases*, 37: 1009-1016, 1993.
 57. NAVANEETHAN U, GIANNELLA AR. Mechanisms of infectious diarrhea. *Nature Clinical Practice Gastroenterology Hepatology*, 5(11): 637-647, 2008.
 58. GROISMAN EA, OCHMAN H. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell*, 87: 791–794, 1996.
 59. MARCUS SL, BRUMELL JH, PFEIFER CG, FINLAY BB. Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 2: 145–156, 2000.

60. D'AOUST JY, MAURER JJ. *Salmonella* species. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, ASM press, page 187-236, 2007.
61. HAYWARD RD, KORONAKIS V. Direct modulation of the host cell cytoskeleton by *Salmonella* actin-binding proteins. *Trends in Cell Molecular Biology*, 12: 15–20, 2002.
62. ALPHONS JAM, JAAP E. Distribution of “classic“ virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 44: 251-259, 2005.
63. WONG KK, MCCLELLAND M, STILLWELL LC, SISK EC, THURSTON SJ, SAFFER JD. Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infection and Immunity*, 66: 3365–3371, 1998.
64. CHIU CH, OU JT. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture–multiplex PCR combination assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 2619–2622, 1996.
65. ROTGER R, CASADESUS J. The virulence plasmid of *Salmonella*. *International Microbiology : The Official Journal of The Spanish Society For Microbiology*, 2: 177–184 1999.
66. CRAVEN SE. Altered colonizing ability for the ceca of broiler chicks by lipopolysaccharid-deficient mutants of *Salmonella typhimurium*. *Avian Diseases*, 38: 401-408, 1994.
67. KOUPAL LP, DEIBEL RH. Assay, characterization and localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*. *Infection and Immunity*, 11: 14-22, 1975.
68. MCDONOUGH PL, JACOBSON RH, TIMONEY JF. Virulence determinants of *Salmonella typhimurium* from animal sources. *American Journal of Veterinary Research*, 50: 662-670, 1989.
69. CHEN M, STERN JS, BAILEY JS, COX NA. Administering mucosal competitive exclusion flora for control of *Salmonellae*. *The Journal of Applied Poultry Research*, 7: 384-391, 1998.
70. CHARY P, PRASAD R, CHOPRA AK, PETERSON JW. Location of the enterotoxin gene from *Salmonella typhimurium* and characterization of the gene products. *FEMS Microbiology Letters*, 111: 87–92, 1993.
71. PRAGER R, FRUTH A, TSCHÄPE H. *Salmonella* enterotoxin (*stn*) gene is prevalent among strains of *Salmonella enterica*, but not among *Salmonella bongori* and other Enterobacteriaceae. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 12: 47–50, 1995.
72. COLLINSON SK, LIU SL, CLOUTHIER SC, BANSER PA, DORAN JL, SANDERSON, KE, KAY WW. The location of four fimbria-encoding genes, *agfA*, *fimA*, *sefA* and *sefD*, on the *Salmonella enteritidis* and/or *S. typhimurium* XbaI–BlnI genomic restriction maps. *Gene*, 169: 75–80, 1996.
73. FERNANDEZ LA, BERENUER J. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 21–44, 2000.
74. VAN DER VELDEN, AWM, BÄUMLER AJ, TSOLIS RM, HEFFRON F. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infection and Immunity*, 66: 2803–2808, 1998.

75. DAUGA C, ZABROVSKAIA A, GRIMONT PAD. Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 2835–2843, 1998.
76. DIBB-FULLER MP, ALLEN-VERCOE E, THORNS CJ, WOODWARD MJ. Fimbriae and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella enteritidis*. *Microbiology*, 145: 1023–1031, 1999.
77. LOCKMAN HA, CURTISS R. Virulence of non-type 1-fimbriated and nonfimbriated and nonflagellated *Salmonella typhimurium* in murine typhoid fever. *Infection and Immunity*, 60: 491–496, 1992.
78. FLOWERS RS, D'AOUST JY, ANDREWS WH, BAILEY JS. *Salmonella*. Compendium of the The Methods for the Microbiological Examinations of Food. American Public Health Assoc. 3rd.ed., page 371-404, 1992.
79. TIETJEN M, FUNG DYC. *Salmonellae* and food safety. *Critical Reviews in Microbiology*, 21(1): 53-83, 1995.
80. DUSCH H, ALTWEGG M. Evaluation of New Plating Media for Isolation of *Salmonella* Species *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 802-804, 1995.
81. QUINN PJ, MARKEY BK, CARTER ME, DONNELLY WJ, LEONARD FC. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. India Replica Pres Ptv. Ltd., Chapter 18. 2004.
82. KEITH M. Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay system for the detection of *Salmonella* in foods. *Journal of Food Protection*, 60: 682-685, 1997.
83. MASSO R, OLIVA J. Technical evaluation of an automated analyser for the detection of *Salmonella enterica* in fresh meat products. *Food Control*, 8: 99-103. 1997.
84. UYTENDAELE MR, VANWILDEMEERSCH K, DEBEVERE J. Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 386-391, 2003.
85. SHAW SJ, BLAIS BV, NUNDY DC. Performance of the Dynabeads anti-*Salmonella* system in the detection of *Salmonella* species in food, animal feeds, and environmental samples. *Journal of Food Protection*, 61: 1507-1510, 1998.
86. CUDJOE KS, KRONA R. Detection of *Salmonella* from raw food samples using Dynabeads anti-*Salmonella* and a conventional reference methods. *International Journal of Food Microbiology*, 37: 55-62, 1997.
87. CUDJOE KS, KRONA R, GRON B, OLSEN E. Use of ferrous sulphate and immunomagnetic separation to recover *Salmonella enteritidis* from raw eggs. *International Journal of Food Microbiology*, 23: 149-158, 1994.
88. COTTER PF, MURPHY JE, KLINGER JD, TAYLOR RL. Identification *Salmonella enteritidis* from experimentally infected hens using a colorimetric DNA hybridization method. *Avian Diseases*, 39: 873-878, 1995.
89. FEDER I, NIETFELD JC, GALLAND J, YEARY T, SARGEANT JM, OBERST R, TAMPLIN ML, LUNCHANSKY JB. Comparison of Cultivation and PCR-Hybridization for Detection of *Salmonella* in Porcine Fecal and Water Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2477-2484, 2001.

90. OLIVEIRA SD, SANTOSA LR, SCHUCHA DMT, SILVAA AB, SALLEA CTP, CANALA CW. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Veterinary Microbiology*, 87: 25-35 2002.
91. BURKHALTER PW, MULLER C, LUTY J, CANDIRAN U. Detection of *Salmonella* spp. in eggs: DNA Analyses, Culture, Techniques ve Serology. *Journal of AOAC International*, 78: 1531-1537, 1995.
92. WOODWARD MJ, KIRVAN SES. Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs by the PCR. *The Veterinary Record*, 138: 411-413 1996.
93. COHEN ND, MCGRUDER ED, NEILBERGS HL, BEHLE RW, WALLIS DE, HARGIS BM. Detection of *Salmonella enteritidis* in feces from poultry using booster PCR and oligonucleotide primers spesific for all members of the genus *Salmonella*. *Poultry Science*, 73: 354-357 1994.
94. SEO KH, VALENTIN-BON IE, BRACKETT RE, HOLT PS. Rapid, specific detection of *Salmonella Enteritidis* in pooled eggs by real-time PCR. *Journal of Food Protection*, 67: 864–869, 2004.
95. ANONYMOUS. The genus *Salmonella* Lignieres, 1900. *The Journal of Hygiene*, 34: 333–350, 1934.
96. GUIBOURDENCHE M, ROGGENTIN P, MIKOLEIT M, FIELDS P, BOCKEMUHL J, GRIMONT PA, WEILL FX. Supplement 2003-2007 (no. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 161: 26–29, 2010.
97. MCQUISTON JR, FIELDS PI, TAUXE RV, LOGSDON JM. Do *Salmonella* carry spare tyres? *Trends in Microbiology*, 16: 142–148, 2008.
98. BURNENS AP, STANLEY J, SECHTER I, NICOLET J. Evolutionary origin of a monophasic *Salmonella* serovar, 9,12:l,v., revealed by IS200 profiles and restriction fragment polymorphisms of the *fljB* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 1641–1645, 1996.
99. SCHRADER KN, FERNANDEZ-CASTRO A, CHEUNG WK, CRANDALL CM, ABBOTT SL. Evaluation of commercial antisera for *Salmonella* sero- typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 46:685–688, 2008.
100. WATTIAU P, BOLAND C, BERTRAND S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Subtyping: Gold Standards and Alternatives. *Journal of Applied Environmental Microbiology*, 77: 7877–7885, 2011.
101. ANDERSON ES, WILLIAMS RE. Bacteriophage typing of enteric pathogens and staphylococci and its use in epidemiology. *Journal of Clinical Pathology*, 9: 94–127, 1956.
102. MURASE T, NAGATO M, SHIROTA K, KATO H, OTSUKI K. Pulsed- field gel electrophoresis-based subtyping of DNA degradation-sensitive *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Livingstone and serovar Cerro isolates obtained from a chicken layer farm. *Veterinary Microbiology*, 99: 139–143, 2004.
103. DIONISI AM, CARATTOLI A, LUZZI I, MAGISTRALI C, PEZZOTTI G. Molecular genotyping of *Salmonella enterica* *Abortusovis* by pulsed field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*, 116: 217–223, 2006.
104. PULSENET NETWORK. <http://www.cdc.gov/pulsenet>, (Erişim Tarihi: Aralık 2015).

105. ECHEITA MA, HERRERA S, GARAIZAR J, USERA MA. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common Salmonella second-phase flagellar antigens. *Research in Microbiology*, 153: 107–113, 2002.
106. KIDGELL C, REICHARD U, WAIN J, LINZ B, TORPDAHL M, DOUGAN G, ACHTMAN M. Salmonella Typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 2: 39–45, 2002.
107. MLST SCHEMES. <http://pubmlst.org/databases.shtml> (Erişim Tarihi: Kasım 2015).
108. COOPER JE, FEIL EJ. Multilocus sequence typing - what is resolved? *Trends in Microbiology*, 12: 373–377, 2004.
109. TURNER KM, FEIL EJ. The secret life of the multilocus sequence type. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29: 129–135, 2007.
110. MLST DATABASES. <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica> (Erişim Tarihi: Ocak 2016).
111. KOTETISHVILI M, STINE OC, KREGER A, MORRIS JG, SU-LAKVELIDZE A. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental Salmonella strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1626–1635, 2002.
112. ROSS IL, HEUZENROEDER MW. A comparison of three molecular typing methods for the discrimination of Salmonella enterica serovar Infantis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 53: 375–384, 2008.
113. VAN OPPEN MJHV, RICO C, TURNER GF, HEWITT GM. Extensive homoplasy, nonstepwise mutations, and shared ancestral polymorphism at a complex microsatellite locus in Lake Malawi cichlids. *Molecular biology and Evolution*, 17: 489–498, 2000.
114. CARLI KT, UNAL CB, CANER V, EYIGOR A. Detection of Salmonella in chicken feces by a combination of tetrathionate broth enrichment, capillary PCR, and capillary gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 1871–1876, 2001.
115. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs Protocol for the Validation of Alternative Methods. ISO 16140:2003 (E), 2003.
116. LANDIS JR, KOCH GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1): 159–74, 1977.
117. PROTOCOLS USED FOR MLST OF SALMONELLA ENTERICA. http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html (Erişim Tarihi: Eylül 2015).
118. 4PEAKS. <http://nucleobytes.com/index.php/4peaks>, (Erişim Tarihi: Aralık 2015).
119. NCBI BLAST. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, (Erişim Tarihi: Aralık 2015)
120. SALMONELLA ENTERICA MLST DATABASE. <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>, (Erişim Tarihi: Aralık 2015).
121. HONG Y, LIU T, LEE MD, HOFACRE CL, MAIER M, WHITE DG, AYERS S, WANG L, BERGHAUS R, MAURER JJ. Rapid screening of Salmonella enterica serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. *BMC Microbiology*, 8: 178, 2008.

122. KIM S, FRYE JG, HU J, FEDORKA-CRAY PJ, GAUTOM R, BOYLE DS. Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10): 3608- 15, 2006.
123. HADJINICOLAOU AV, DEMETRIOU VL, EMMANUEL MA, KAKOYIANNIS CK, KOSTRIKIS LG. Molecular beacon-based real-time PCR detection of primary isolates of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in environmental and clinical samples. *BMC Microbiology*, 9: 97, 2009.
124. BARCO L, LETTINI AA, RAMON E, LONGO A, SACCARDIN C, POZZA MC VERICCI A. A rapid and sensitive method to identify and differentiate *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- by combining traditional serotyping and multiplex polymerase chain reaction. *Foodborne Pathogens and Disease* 8(6): 741-3, 2011.
125. AGRON PG, WALKER RL, KINDE H, SAWYER SJ, HAYES DC, WOLLARD J, ANDERSEN GL. Identification by Subtractive Hybridization of Sequences Specific for *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4984–4991, 2001.
126. LEE SH, JUNG BY, RAYAMAHJI N, LEE HS, JEON WJ, CHOI KS, KWEON CH, YOO HS. A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis in meats. *Journal of Veterinary Science*, 10(1): 43-51 2009.
127. MACIEL BM, DIAS JCT, ROMANO CC, SRIRANGANATHAN N, BRENDEL M, REZENDE RP. Detection of *Salmonella* Enteritidis in asymptomatic carrier animals: comparison of quantitative real-time PCR and bacteriological culture methods. *Genetics and Molecular Research*, 10 (4): 2578-2588, 2011.
128. LUNGU B, WALTMAN WD, BERGHAUS RD, HOFACRE CL. Comparison of a Real-Time PCR Method with a Culture Method for the Detection of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in Naturally Contaminated Environmental Samples from Integrated Poultry Houses. *Journal of Food Protection*, 75 (4): 743–747, 2012.
129. MALORNY B, BUNGE C, HELMUTH R. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *Journal of Microbiological Methods*, 70: 245–251, 2007.
130. CİLO BD, KARAKEÇİLİ F, GÜLEŞEN R, LEVENT B, ÖZAKIN C, GEDİKOĞLU S. Determination of *Salmonella* Serotypes by Conventional and Molecular Methods. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 47(4): 693-701, 2013.
131. ACHTMAN M, HALE J, MURPHY RA, BOYD EF, PORWOLLIK S. Population structures in the SARA and SARB reference collections of *Salmonella enterica* according to MLST, MLEE and microarray hybridization. *Infection, Genetics and Evolution*, 16: 314-325, 2013.
132. SANGAL V, HARBOTTLE H, MAZZONI CJ, HELMUTH R, GUERRA B. Evolution and population structure of *Salmonella enterica* serovar Newport. *Journal of Bacteriology*, 192: 6465–6476, 2010.

133. MAIDEN MCJ, BYGRAVES JA, FEIL E, MORELLI G, RUSSELL JE, URWIN R, ZHANG Q, ZHOU J, ZURTH K, CAUGANT DA, FEAVERS IM, ACHTMAN M, SPRATT BG. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 95: 3140–3145, 1998.
134. FEIL EJ, LI BC, AANENSEN DM, HANAGE WP, SPRATT BG. EBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from Multilocus Sequence Typing data. *Journal of Bacteriology*, 186: 1518–1530, 2004.
135. AANENSEN DM, SPRATT BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Research*, 33: 728–733, 2005.
136. MAIDEN MC. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 60: 561–588, 2006.
137. DIDELOT X, MAIDEN MC, Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends in Microbiology*, 18, 315–322. 2010.
138. MLST DATABASES. http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica/GetTableInfo_html, (Erişim Tarihi: Aralık 2015).

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan kaçınmayan ve her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen yetişmemde büyük katkısı olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Ayşegül EYİGÖR başta olmak üzere gerek tez süresince bilgi ve tecrübesini her zaman benimle paylaşmış gerekse tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesindeki katkılarından dolayı sayın Prof. Dr. TAYFUN ÇARLI'ya tez çalışmam sırasında danışman hocamla birlikte hep yanımda olan Prof. Dr. Şahsene ANAR ve Prof. Dr. Seran TEMELLİ'ye ve Anabilim Dalın Öğretim Üyeleri sayın Prof. Dr. Mustafa TAYYAR ve Prof. Dr. Ece SOYUTEMİZ'e çekinmeden kapılarını çaldığımda her zaman yanıt bulduğum sayın Prof. Dr. Recep ÇIBIK ve Prof. Dr. Figen ÇETİNKAYA'ya eğitimim süresince her zaman yanımda olan ve sıkıntılarımı paylaşan iş arkadaşlarım Yrd Doç Dr. Artın YIBAR, Araş. Gör. Evren ERKÖSE ve Araş. Gör. Ece ÇETİN'e ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Nedret GÜÇLÜ'ye moral desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ailem ve eşim Gökçen Özdemir ATA ve kızım Zeynep ATA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Zafer ATA

ÖZGEÇMİŞ

Ankara 1976 yılında dünyaya gelen Zafer ATA, ilköğretimi Akşehir Bahçelievler İlkokulu, Akşehir Merkez Ortaokulunda ortaöğretimi ve lise öğrenimini İstanbul Kabataş Erkek Lisesi'nde tamamlamıştır. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni 2000 yılında bitirerek üniversite eğitimini tamamlamış Veteriner Hekim ünvanını almaya hak kazanmıştır. 2001 yılında Kara Kuvvetleri Komutanlığı subaylık sınavlarını kazanarak 2002 yılında Kara Harp okulu eğitimini ardından teğmen rütbesiyle meslek yaşamına başlamıştır. 2004-2007 yılları arasında Kara Kuvvetleri Komutanlığı namına Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında uzmanlık eğitimini, 2007-2011 yılları arasında yine Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimini tamamladıktan sonra 2010 yılında Kara Kuvvetleri Komutanlığı namına Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı doktora öğrencisi olarak eğitimine başlamıştır. Halen Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkezi Komutanlığında Veteriner Hekim Binbaşı rütbesiyle görev yapmakta olan Zafer ATA evli ve bir çocuk babasıdır.