



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



# KANATLI KÖKENLİ *SALMONELLA* INFANTİS SUŞLARININ MLST İLE FİLOGENETİK ANALİZİ

Seyyide SARIÇAM

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK

ANKARA  
2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANATLI KÖKENLİ *SALMONELLA* INFANTİS  
SUŞLARININ MLST İLE FİLOGENETİK ANALİZİ**

Seyyide SARIÇAM

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün  
16L0239015 proje numarası ile desteklenmiştir**

ANKARA

2017

# İÇİNDEKİLER

İçindekiler	i
Önsöz	ii
Simgeler ve Kısaltmalar	iii
Şekiller	v
Çizelgeler	vi
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Salmonella</i> Tarihçesi ve Klasifikasyonu	1
1.2. Etiyoloji	3
1.3. İzolasyon ve İdentifikasyon	3
1.4. Epidemiyoloji	5
1.5. Multilocus Sequence Typing (MLST)	7
1.6. Filogenetik Analiz	11
<b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>15</b>
2.1. GEREÇ	15
2.1.1. <i>Salmonella</i> İzolatları	15
2.1.2. Besiyerleri, Ticari Kimyasal ve Solüsyonlar	16
2.1.3. Laboratuvar Ekipmanları	16
2.1.4. Dizi Analiz Programları ve Veritabanları	17
2.2. YÖNTEM	18
2.2.1. DNA İzolasyonu	18
2.2.2. Gradyent PCR	19
2.2.3. Multilocus Sequence Typing (MLST)	20
2.2.4. Saflaştırma ve DNA Dizi Analizi	22
2.2.5. Filogenetik Analiz	24
<b>3. BULGULAR</b>	<b>25</b>
3.1. MLST Bulguları	25
3.2. Filogenetik Analiz Bulguları	27
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>28</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>33</b>
<b>ÖZET</b>	<b>34</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>35</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>36</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>42</b>

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, 2014-2017 yıllarında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiş 113R036 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında ISO 6579 ile izole ve tanımlanmış *Salmonella* Infantis suşlarının MLST ile yeni sekans tiplerinin saptanması, suşlar ve farklı serotipler arası filogenetik yakınlığın gösterilmesi ve elde edilen verilerin epidemiyolojik çalışmalara ışık tutabilmesi amaçlanmıştır.

Tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bana yol gösteren, ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK başta olmak üzere yardımlarını esirgemeyen öğretim üyeleri; Prof. Dr. K. Serdar DİKER, Prof. Dr. Hakan YARDIMCI, Prof. Dr. Mehmet AKAN, Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU ve Prof. Dr. Müjgan İZGÜR ile Mikrobiyoloji Anabilim dalında görevli arkadaşlarıma, moral ve destekleriyle daima yanımda olan sevgili aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

-	Negatif
+	Pozitif
%	Yüzde
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
ATCC	American Type Culture Collection
β	Beta
Bp	Base Pair
°C	Santigrad
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFU	Colony Forming Unit
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat
dH <sub>2</sub> O	Distile Su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
g	Gram
H <sub>2</sub> S	Hidrojen sülfür
ISO	International Organization for Standardization
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolisakkarit
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
µg	Mikrogram

$\mu$ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis
MLST	Multilocus sequence typing
mM	Milimolar
MRSV	Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis
NA	Nutrient Agar
NJ	Neighbor Joining
No	Numara
O/F	Oksidasyon/Fermentasyon Testi
$^{\circ}$ C	Santigrad derece birimi
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ribonükleik Asit
S	Svedberg
sn	Saniye
spp.	Species
ST	Sequence Type
subsp.	Subspecies
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
TBE	Tris Borate EDTA
TPS	Tamponlanmış Peptonlu Su
TSB	Trypticase Soy Brot
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average
WHO	World Health Organization
XLD	Ksiloz Lizin Desoksikolat Agar

## ŞEKİLLER

Şekil 1.1. <i>Salmonella</i> türlerinin ve alttürlerinin klasifikasyonu	2
Şekil 1.2. <i>Salmonella</i> 'ların kültürel ve biyokimyasal özellikleri	3
Şekil 1.3. <i>S. Infantis</i> 'in Kauffmann-White Le Minor Şeması'na göre antijenik formülasyonu	5
Şekil 1.4. <i>Salmonella enterica</i> MLST şablonu	8
Şekil 1.5. Filogenetik ağaçlandırma metotları	11
Şekil 3.1. Her bir <i>housekeeping</i> gene ait elektroforez sonucu	25
Şekil 3.2. Taksonların evrimsel ilişkisi	27



## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 2.1.</b> Gradyent PCR karışımı	19
<b>Çizelge 2.2.</b> Gradyent PCR sıcaklık ve döngü koşulları	20
<b>Çizelge 2.3.</b> <i>Salmonella</i> MLST analizinde kullanılacak olan <i>housekeeping</i> genler, primer dizileri, bağlanma ısıları ve elde edilen PCR ürün büyüklükleri	20
<b>Çizelge 2.4.</b> MLST PCR karışımı	21
<b>Çizelge 2.5.</b> MLST PCR sıcaklık ve döngü koşulları	21
<b>Çizelge 2.6.</b> DNA dizi analizinde kullanılan primer dizileri ve bağlanma sıcaklıkları	22
<b>Çizelge 2.7.</b> DNA dizi analizi için gerçekleştirilen PCR reaksiyonu bileşen ve hacimleri	23
<b>Çizelge 2.8.</b> DNA dizi analizi PCR sıcaklık ve döngü koşulları	23
<b>Çizelge 3.1.</b> Her bir suşa ait gen allelleri ve bu allellerin kombinasyonu ile belirlenen sekans tipleri	26



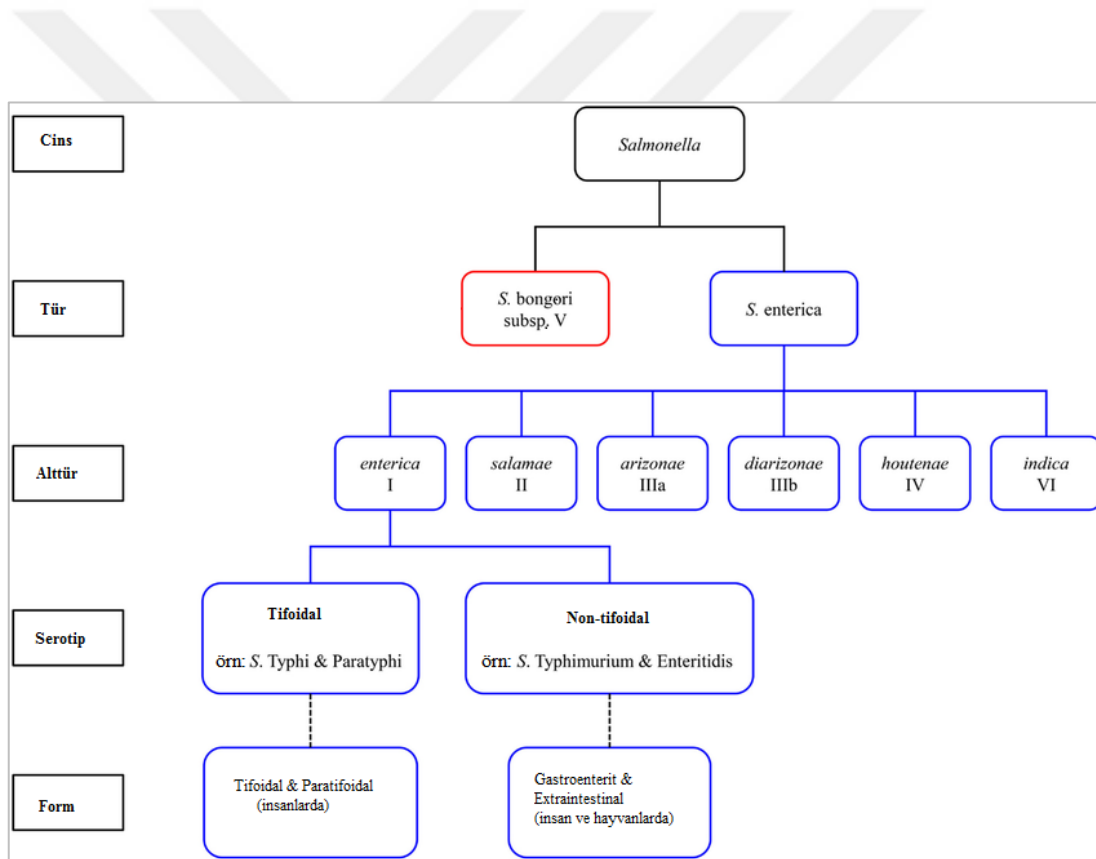
# 1. GİRİŞ

## 1.1. *Salmonella* Tarihçesi ve Klasifikasyonu

*Salmonella* ilk kez 1880 yılında tifodal basil olarak bakteriyolog Ebert ve Koch tarafından tanımlanmış, 1885 yılında Daniel Elmer Salmon adlı bilim adamı tarafından domuz kolera basili olarak adlandırılmıştır. 1900 yılında *Salmonella* cinsi, Lignieres tarafından oluşturulmuş, 1901 yılında ise kültürel ve serolojik ayrımı Schottmüller tarafından gerçekleştirilmiştir (Adams ve Moss, 1995; Bell ve Kyriakides, 2002).

1926 yılında klasifikasyonu için ilk antijenik şema, White tarafından geliştirilmiştir. 1952 yılında “Uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Enterobacteriaceae Alt Komitesi”, Kauffmann ve Edwards aracılığıyla *Salmonella enterica* tür isminin kullanılmasını teklif etmiştir. 1961 yılında antijenik şema, “Kauffmann-White şeması” olarak genişletilmiştir (D'Aoust ve ark., 1992). 1987 yılında ise Le Minor ve Popoff, *Salmonella*'ların biyokimyasal ve genomik benzerlikleri dikkate alınarak, 7 alttür olarak sınıflandırılmasını önermiştir. (Le Minor ve Popoff, 1987). Popoff ve ark. (1998)'nın 1996 yılında yaptığı klasifikasyona göre *Salmonella* cinsi, tüm serovarları (yaklaşık 2600) kapsayan *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki türe ayrılmıştır. *Salmonella* üyelerinin neredeyse tamamına yakınına içeren *enterica* türü; *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* ve *indica* olmak üzere alttürlerden oluşmaktadır. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I), 1547; *Salmonella enterica* subsp. *salamae* (II), 513; *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), 100; *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), 341; *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* (IV), 73; *Salmonella enterica* subsp. *indica* (VI), 13 serotipe sahiptir. Cinsteki diğer tür *Salmonella bongori* (V) ise yaklaşık 22 serotipten oluşmaktadır (ISO 6579, 2002; Patrick ve ark., 2007).

Konak spesifitelerine göre özel infeksiyon oluşturan serotipler *Salmonella* Typhi (insan), *Salmonella* Choleraesuis (domuz), *Salmonella* Pullorum ve Gallinarum (kanatlı), *Salmonella* Dublin (sığır), *Salmonella* Abortus ovis (koyun), *Salmonella* Abortus equi (at)'dir. Konak spesifik olmayan ve hem insanları hem hayvanları infekte eden gıda kaynaklı hastalıklardan sorumlu serotiplere örnek olarak ise Infantis, Hadar, Enteritidis, Typhimurium, vb. örnek verilebilir. Serotipler ayrıca tifoidal ve paratifoidal etkenler olarak da sınıflandırılmaktadır. Paratifoidal serotipler; Typhimurium, Enteritidis ve Montevideo gibi serotipler iken tifoidal serotipler kanatlıda Pullorum, Gallinarium, insanda ise cinsin ilk izole ve identifiye edilen üyesi olan Typhi ile Paratyphi A, B, C'dir (Şekil 1) (Teplitski ve Ahmer, 2004; Songer ve Post, 2005).



Şekil 1. *Salmonella* türlerinin ve alttürlerinin klasifikasyonu.

## 1.2. Etiyoloji

*Enterobacteriaceae* ailesinde bulunan *Salmonella* cinsi; Gram negatif, fakültatif anaerob, çomak şeklinde (0.7-1.5 x 2-5 µm) bakterilerden oluşmaktadır. Genel olarak; antijeniteden sorumlu yüzey bileşenleri, hücre duvarı, hücre zarı ve sitozolden oluşur. Peritrik flagella ile hareket edebilen (*S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* serotipleri hariç) etkenlerdir. Geniş bir üreme sıcaklığı aralığına sahip olan etken (optimal üreme sıcaklığı 37°C); katı besiyerinde düz, yuvarlak ve parlak koloniler oluşturur (İzgür, 2006; Akan, 2008). Ayrıntılı olarak biyokimyasal ve kültürel özellikleri Şekil 2’de verilmiştir (Shivaprasad, 2000).

<b>Cins</b>	<i>Salmonella</i>	<b>Gram boyama</b>	negatif
<b>O/F</b>	fakültatif	<b>Oksidaz</b>	negatif
<b>Katalaz</b>	pozitif	<b>Sükroz</b>	negatif
<b>Gaz</b>	pozitif	<b>Laktöz</b>	negatif
<b>H<sub>2</sub>S</b>	pozitif	<b>β-galaktozidaz</b>	negatif
<b>Glikoz</b>	pozitif	<b>İndol</b>	negatif
<b>Metil red</b>	pozitif	<b>Üre</b>	negatif
<b>Lizin</b>	pozitif	<b>Arjinin</b>	değişken
<b>Lizin dekarboksilaz</b>	pozitif	<b>Ornitin</b>	değişken
<b>Hareket</b>	değişken	<b>Sitrat</b>	değişken

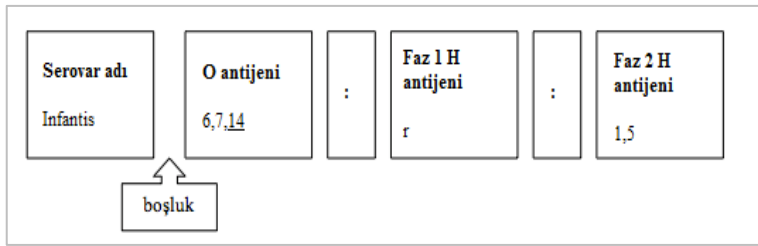
Şekil 2. *Salmonella*’ların kültürel ve biyokimyasal özellikleri.

## 1.3. İzolasyon ve İdentifikasyon

*Salmonella* izolasyon ve identifikasyonu, uluslararası altın standart olarak kabul edilen ISO 6579 standartına göre yapılmaktadır. İzolasyon; ön zenginleştirme, zenginleştirme ve selektif zenginleştirme aşamalarından oluşmaktadır. İzolasyon standartının sensitivitesi 25 g örnekte 1 CFU (colony forming unit)’dur. Ön zenginleştirme aşamasında 225 ml selektif olmayan Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS)

ile 25 g örneğin 18-24 saat 37°C'de inkübasyonu yapılır. Zenginleştirme için ise Modifiye Rappaport Vassiliadis (MRSV) yarı katı besiyerinde, 18-24 saat 42°C'de inkübasyon yapılır. İzolasyonun son aşamasında selektif besiyeri Ksiloz Lizin Deoksikolat (XLD) agarda koloniler, 18-24 saat 37°C'de inkübasyon ile üretilir. İdentifikasyon için Nutrient agarda üretilen koloniler ile biyokimyasal ve serolojik konfirmasyon yapılır. Bu aşamada yüzey ve flagellar antijenlere spesifik olan, tavşan plazmasından elde edilen poli ve mono antiserum setleri ile Kauffmann-White-Le Minor şemasından faydalanılır (ISO 6579, 2002; ISO 6579, 2012).

Kauffmann-White-Le Minor şemasında *Salmonella* etkenleri, yüzey ve flagellar antijenik yapılarına göre formülize edilerek sınıflandırılmıştır. Lipopolisakkarit (LPS) yapılı birden fazla O antijeni sayesinde A'dan Z'ye kadar harflerle temsil edilen "serogrup" ya da diğer bir deyişle "O grubu" tayini yapılmaktadır. Aynı grup içerisindeki antijenik faktörler ise virgül ile ayrılmaktadır. Serotiplendirmede faydalanılan antijenik yapılardan biri de flagellada yer alan flagellar protein, flagellindir. Antijenik olarak değişken olan flagellin parçası, bakteri yüzeyinde yer almaktadır. *Salmonella* serotiplerinde iki farklı gen tarafından koordineli şekilde "Faz 1" ve "Faz 2" olmak üzere farklı H antijenleri eksprese edilir. Böylece tek bir bakteride aynı zamanda yalnızca bir tip flagellar antijen eksprese olmaktadır. Fazlardan biri rakam ile diğeri ise harf ile temsil edilmektedir. Hareketsiz serotipler olan *Salmonella* Pullorum ve Gallinarum serotiplerinde iki faz da bulunmamaktadır. Tek bir flagellinin eksprese olduğu *S. Enteritidis* gibi monofazik *Salmonella* serotipleri de mevcuttur. *Salmonella* serotipleri antijenik formülasyonunda O antijenleri ve H antijenleri faktörleri virgül ile ayrılmaktadır (Şekil 3). 2600'den fazla *Salmonella* serotipine ait antijenik formülasyonlar Kauffmann-White-Le Minor şemasında yer almakta ve serogruplar, serotip adları, O antijenleri, H antijenleri gösterilmektedir (Popoff ve ark., 1997; Patrick ve ark., 2007).



**Şekil 3.** *S. Infantis*'in Kauffmann-White-Le Minor şemasına göre antijenik formülasyonu.

*Salmonella* identifikasyonu için tercih edilen bir diğer metot ise yüksek sensitivite, spesifite ve kısa süreli sonuç vermesi bakımından konvansiyonel Polymerase Chain Reaction (PCR) teknikleri olmuştur. PCR metotlarında *oriC* geni, *invA* geni ve *rfb* geni gibi pek çok gen ele alınarak identifikasyon yapılmaktadır. Ribotiplendirme, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE), Multilocus Sequence Typing (MLST) gibi analizler ise izolatları ilişkilendirmek ve köken bazında değerlendirmek için *Salmonella* çalışmalarında sık sık tercih edilen genotipik analiz yöntemleridir (Kidgell ve ark., 2002; Cheraghchi ve ark., 2014; Durul ve ark., 2015).

#### 1.4. Epidemiyoloji

Salmonellozis, dünya çapında en sık görülen ikinci zoonotik enfeksiyondur. Nontifodial *Salmonella* etkenlerinin neden olduğu, yıllık 93.8 milyon gastroenterit ve 155.000 ölüm vakasının olduğu tahmin edilmektedir. Bu durumda, etkenin habitatının bağırsak olması etkilidir. Hayvanlara etkenlerin nasıl bulaştığını bulmaya yönelik çalışmalar devam etmekle birlikte, *Salmonella* etkenlerinin uygun infeksiyon dozu ve konak bağışıklık durumunda insanlarda neden olduğu gastroenterit, tifo, paratifo, septisemi hastalıklarının bu sıklıkta görülmesinde kontamine hayvansal gıdaların primer kaynak olarak etkili olduğu anlaşılmıştır (Almeida ve ark., 2013).

*S. enterica* subsp. *enterica*, insan ve hayvanlardaki *Salmonella* infeksiyonlarının yaklaşık %99'undan sorumludur. 2010 yılında tüm *Salmonella* infeksiyonlarında %47'lik oranla en sık görülen etken *S. enterica* serovar Enteritidis, ikincisi %41 oranla *S. enterica* Typhimurium'dur (EFSA ve ECDC, 2012; Toboldt ve ark., 2013). *Salmonella* infeksiyonlarının %25.3'ünü diğer non-tifooidal serovarlar Infantis, Mbandaka, Agona, Kentucky, Virchow ve Newport oluşturmaktadır. *S. enterica* subsp. *enterica* içinde yer alan bir serotip olan *Salmonella* Infantis; 2001'den bu yana insandan izole edilen 10 yaygın serotip için konak spesifik olmayanlar arasında ilk sırada izole edilen paratifoidal serotiptir (Miller ve ark., 2010). Bu serotip, dünyada 2600 *Salmonella* serotipi arasında kanatlı hayvanlardan en çok izole edilen serotipler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Son 20 yılda özellikle gelişmekte olan ülkelerde yürütülen çalışmalarda baskın iki serotipin baskınlığının giderek azaldığı ve *S. Infantis* başta olmak üzere, nontifooidal serotiplerin sıklığının arttığı tespit edilmiştir (Lublin ve ark., 2015). İnsanlardaki *S. Infantis* salgınlarının öncelikli rezervuarı olarak hayvanlar özellikle de kanatlı popülasyonu gelmektedir. *S. Infantis*'in *Salmonella* enfeksiyonlarında etkinliğinin hızlı bir şekilde artması, tüm çiftlik hayvanlarında yaygın olarak bulunan bir serotip olması yanında, çoklu ilaç dirençlilik regülasyonunda içerdiği genetik elastisiteden kaynaklanmaktadır. Günümüzde tüm dünyada çoklu ilaç dirençlilik sistemlerinin tespit edildiği serotiplerin başında yine *S. Infantis* gelmektedir (Chessa ve ark., 2008b).

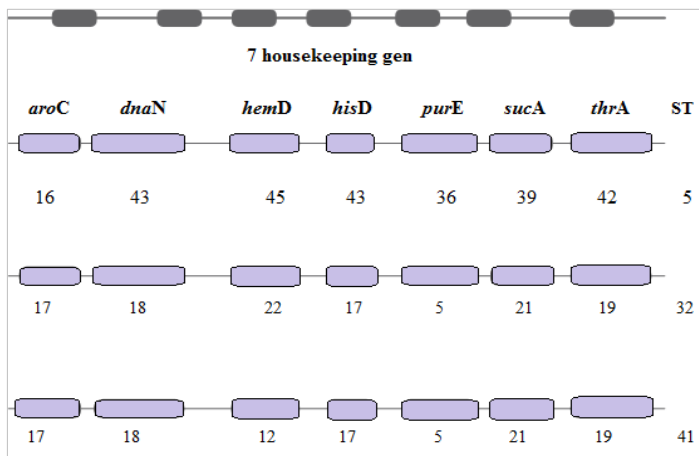
*S. Infantis* izolatlarının epidemiyolojik yönlü araştırmaları, zoonoz olan bu etkenin koruma ve kontrolü açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla; Ribotiplendirme, RFLP, AFLP, PFGE, MLST gibi genotipik analiz yöntemleri izolatları ilişkilendirmek ve köken bazında değerlendirmek için kullanılır. Bu noktada, izolasyon sonrası identifikasyon için yapılan biyokimyasal testler ve serotiplendirme metotları neredeyse 80 yıldır kullanılmakla beraber yalnızca fenotipik bilgi sağlarken; suşlar arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koymakta yetersiz kalmaktadır. Serotip ile gıda kaynağı-coğrafik izolasyon bölgesi arasındaki ilişki hakkında elde edilen geriye dönük bir bilgi, ortaya çıkan salgınların araştırılmasını kolaylaştırması nedeniyle, enfeksiyonların önlenmesi adına yapılan etkenlerin saçılımı, yayılımı, genetik ilişkisini araştıran

çalışmalarda DNA tabanlı tiplendirme metotları sıkça kullanılmaktadır. Bu metotlardan biri olan MLST, *Salmonella* filogenetik ve epidemiyolojik çalışmaları ile populasyon yapısını belirlemede kullanılan genotiplendirme analizlerinin başında gelmektedir. Yapısal genlerin nükleotid dizilimlerini karşılaştırarak; serotipler ya da suşlar arası çeşitliliğin, genetik kümeler içinde gösterilmesine ve bulaşma rotasının saptanmasına olanak sağlamaktadır (Kidgell ve ark., 2002).

### 1.5. Multilocus Sequence Typing

İlk kez 1998 yılında geliştirilen ve altın standart kabul edilen MLST analizi, *Salmonella* filogenetik (mikro evrimsel çalışmalar) ve epidemiyolojik çalışmaları ile populasyon yapısını belirlemede kullanılan genotiplendirme analizlerinin başında gelmektedir (Maiden ve ark., 1998; Achtman ve ark., 2012). Normal patofizyolojik Őartlarda bir organizmanın tüm hücrelerinde ifade edilen, temel bir hüresel fonksiyon için gerekli bileşenleri kodlayan genler olarak tanımlanan “*housekeeping*” genler dizilerek yapılan bir moleküler tiplendirmedir. Tipik bir MLST yaklaşımında, nokta mutasyonlarının çok daha yüksek frekans ile tespit edilmesi beklenir. Bu nedenle, suşlar arasında total dizi benzerliğine bakılmaz. Bunun yerine ele alınan her bir lokus için, bu lokusun zaten bilinen dizileri identifikasyonda kullanılır ve bu aşamada veritabanlarından faydalanılır (Bionumerics Company, 2006). Genel olarak; veri toplanması, veri analizi ve çoklu dizi analizi olmak üzere 3 aşamada tamamlanır. İlk olarak, varyasyonların belirleyici identifikasyonu için *housekeeping* gen fragmentlerinin nükleotid sırası saptanır yani dizilenir. İkinci olarak; tüm genler için gerçekleştirilen veri analiziyle her bir gen için allel numarası belirlenir. Son olarak bu allellerin kombinasyonuyla elde edilen allelik profil sayesinde sekans tipi atanır. Yeni alleller veya yeni sekans tipi bulunursa konfirmasyon sonrasında veri tabanına kaydı gerçekleştirilir (Multilocus Sequence Typing, 2017).

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* alt türü düzeyinde yapılan MLST analizinde 7 *housekeeping* gen fragmenti karakterize edilir. Bunlar; *aroC* (korizmat sentaz, 826 bp), *dnaN* (DNA polimeraz III beta alt birimi, 833 bp), *hemD* (üroporfirinojen III kosentaz, 666 bp), *hisD* (histidinol dehidrogenaz, 894 bp), *purE* (fosforibozilaminoimidazol karboksilaz, 510 bp), *sucA* (alfa ketoglutarat dehidrogenaz, 643 bp) ve *thrA* (aspartokinaz ve hemoserin dehidrogenaz, 852 bp) genleridir. Sırasıyla aromatik amino asit sentezi, DNA sentezi, demirli porfirin (hem) sentezi, esansiyel amino asit metabolizması, pürin nükleotid sentezi, oksijenli solunum metabolizması ve esansiyel amino asit metabolizmasında görev alan önemli hücresel bileşenleri sentezleyen bu genler; bakterilerde bir genin alternatif formları olarak tarif edilen “alleller” şeklinde bulunur. MLST, her bir gen için çok sayıda olan bu allellerin tespit edilmesine dayanır. Güncellenen 2017 Nisan ayı verileri dahilinde *aroC* 711, *dnaN* 629, *hemD* 591, *hisD* 903, *purE* 723, *sucA* 684 ve *thrA* 746 farklı allele sahiptir. DNA dizi analizi ile her bir gen için elde edilen allellerin kombinasyonu suş düzeyinde sekans tip elde edilir (Şekil 4). Güncellenen “<http://pubmlst.org/>” veri tabanında *Salmonella enterica* için 3851 sekans tipi bulunmaktadır (Torpdahl ve ark., 2005; University of Oxford, 2010). 220.000'den fazla allelik profil ve 65.973 *Salmonella* suşu kapasitesine sahip olduğu düşünüldüğünde MLST veritabanının veri setinin genişliği daha iyi anlaşılmaktadır. Ayrıca dünya çapında yapılan araştırmalarda elde edilen yeni sekans tipleri bu veritabanına sık sık girilmekte ve veriler güncellenmektedir (Ho ve ark., 2017).



**Şekil 4.** *Salmonella enterica* MLST şablonu. *Housekeeping* genlerin altında belirtilen rakamlar her bir gene ait alleli, ST (sekans tip) altında belirtilen rakam ise bu allelik kombinasyon sonucu elde edilen sekans tipi göstermektedir.



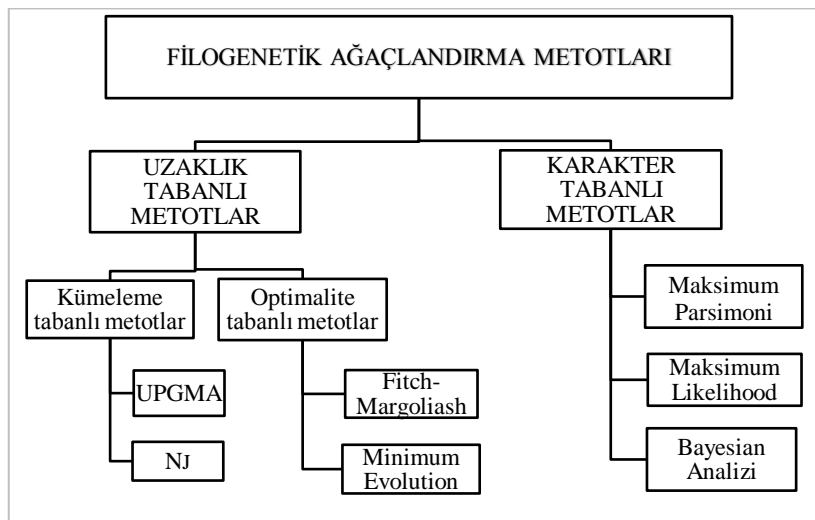
Yetmişdokuz ulaşılabilir veritabanı sayesinde *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* ve diğer organizmalara ait MLST dizileri, allel numaraları ve bu allelik profile atanan sekans tiplerine kolayca ulaşılabilir. Bunlardan en önemlileri; "mlst.net ve "pubmlst.org" (Imperial College, 2007; University of Oxford, 2010)'dir. Bu sayede; MLST analizi, sonuçlarının elektronik ortama aktarılabilmesi, kolayca saklanabilmesi ve tiplendirilen herhangi bir suşun sonucunu daha önceden var olanlarla kıyaslama olanağının bulunması, filocoğrafik ve konak sipesifitesi hakkında ipuçları vermesi bakımından oldukça avantajlıdır. Ayrıca bu veritabanları yeni sekans tiplerinin kaydedilebilmesine ve global bilgi değişimlerine göre güncel rakamların görülebilmesine olanak sağlar (Achtman ve ark., 2012). Hızlı ve uygulaması kolay olan bu tekniğin en önemli avantajlarından birisi de, genomun tamamının dizilenmesine gerek duyulmamasıdır (IRMA, 2012). MLST'nin rutin kullanımına geçiş, tüm genoma dayalı dizi tabanlı tiplendirme metotlarından daha uygun olarak; uzun vadede *Salmonella* bulaşma rotalarının net bir görüntüsünü sağlamakta ve kontrol çalışmalarını kolaylaştırmaktadır. Laboratuvarlar arası tekrarlanabilir sonuçlar alınabilme olasılığı oldukça yüksektir. MLST, doğrudan klinik örneklerle de uygulanabilmektedir (Kidgell ve ark., 2002; Taylor ve Fisher, 2003; David ve ark., 2005; Andrei ve Zervos, 2006). Bununla birlikte MLST analizi; daha çok klonal düzeyde değerlendirme sağlama, karşılaştırma yapılması, yorumlanmasının kolaylığı bakımından PFGE, AFLP, RFLP gibi genotiplendirme metotlarından daha avantajlıdır (Torpdahl ve ark., 2005; Nüesch ve ark., 2015). MLST; MLEE'nin tahmin edemediği aminoasit değişikliğine yol açmayan sessiz mutasyonlar dahil tüm dizi değişimlerini tespit eden hassasiyeti sayesinde, moleküler saat oranı karşılaştırmasına dayalı tüm bakteriyel gruplandırmalar için kullanılabilir (Kidgell ve ark., 2002). Ayrıca kısa vadeli epidemiyolojik çalışmalarda serotiplendirme, ek metotlar olmadan yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle subjektif gözlemlerin olmadığı MLST, *Salmonella* sınıflandırılmasında serotiplendirmenin yerini alabilecek güçlü bir metottur (Achtman ve ark., 2012; Ranieri ve ark., 2013).

En temel ve yaygın kullanıma sahip 7 *housekeeping* gene dayalı MLST şemasına ek olarak çeşitli şemalar geliştirilmiştir. Bunlardan birisi, “16S rRNA, *pduF*, *glnA*, ve *manB*” olmak üzere 4 polimorfik gene dayalı MLST şeması olup, serotipler arası ayırimda verimi artırmaya yönelik kullanılır (Kotetishvili ve ark., 2002). *Salmonella*'da polimorfik olmayan ve tek başına tiplendirmede kullanılamayan 16S rRNA gen bölgesinin identifikasyona kullanılabilmesine olanak sağlar. Virülens genler *spaM*, *hilA* ve fimbrial genler *pefB*, *fimH* şemaya eklenerek oluşturulan şemalar ile ayırım gücü daha yüksek seviyeye çekilir (Wattiau ve ark., 2011). Ayrıca Tankouo-Sandjong, tarafından geliştirilen *gyrB*, *atpD* *housekeeping* genleri ve *fljB*, *fliC* flagellin genleri ile yapılan MLST kombinasyonu da alternatif olarak mevcuttur (Tankouo-Sandjong ve ark., 2007). Bazı MLST şemaları ayırım gücü, PFGE ayırım gücünden daha yüksek olup insan sağlığıyla yakından ilişkili *Salmonella* serotiplerini ayrıntılı olarak incelemeye olanak sağlamaktadır. Ayrıca PFGE'nin sadece restriksiyon enzimi spesifik aktivitesine göre oluşan bantlar üzerinden tiplendirme yaparak, kesim bölgeleri dışındaki mutasyonları saptayamaması gibi dezavantajları düşünüldüğünde tek nokta mutasyonlarını kolaylıkla saptayarak, tek bir nükleotid farklılığında yeni bir allel atayan MLST'nin seçiciliği ön plana çıkmaktadır. 16S rRNA geni ile yapılan bir diğer kombin ise *pduF*, *glnA* ve *manB* genleri kombinasyonudur. Bu 4 gene dayalı MLST şeması PFGE'den daha yüksek ayırım gücüne sahip olup, 16S rRNA gen bölgesinin tiplendirmede kullanılabilmesine olanak sağlayan bir diğer şema olarak mevcuttur (Kotetishvili ve ark., 2002). Profaj genleri veya virülens *sseL*, *fimH* genleri ile CRISPR dizilerini hedef alan kombine MLST şeması da güncel ve ayırım gücü yüksek şemalardır (Ross ve Heuzenroeder, 2005; Liu, 2011). Tüm bu varyant MLST şemaları yeni kullanılmaya başlanmış olup, önümüzdeki yıllarda kapsamlı ve ulaşılabilir veritabanlarına sahip olacakları düşünülmektedir. Böylelikle MLST, tiplendirmeyi yüksek ayırım gücüyle suş bazında yaptığı için filogenetik analizlerde grup oluşturmakta kullanılamayan PFGE gibi genotiplendirme metotlarından avantajlı olup, suşları gruplar içine yerleştirmeyi amaçlayan epidemiyolojik çalışmalarda kullanışlı hale gelir (Durul ve ark., 2015).

## 1.6. Filogenetik Analiz

Filogenetik ağaç, organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi araştıran filogenetik bilimi kapsamında kullanılan ve belirli parametreler doğrultusunda organizmalar arası (morfolojik, genotipik, fizyolojik, vb.) farklılıkların grafiksel olarak gösterimine verilen addır. Organizmalar arası evrimsel ilişkileri gösteren filogeniler, “evrim ağacı” ya da “yaşam ağacı” olarak da bilinmektedir. Filogenetik ağaçlar; köklü, köksüz ya da dendrogram, kladogram ve filogram olarak farklı gruplandırmalara sahiptirler. Bu noktada oluşturulan ağaçta yer alan taksonlar ortak bir atadan köken alıp almaması ya da taksonlar arası mesafenin anlamlı ve farklı olup olmaması, filoogenetik ağaç tipini tayin etmektedir.

Filogenetik ağaç oluşturma metotları, uzaklık tabanlı ve karakter tabanlı olmak üzere ikiye ayrılır. Uzaklık tabanlı metotlar, bir hiyerarşi içinde düzenlenmiş birimler olan taksonların aralarındaki uzaklıklara göre kümelendirilerek yerleştirilmesi ya da oluşturulan birden fazla ağaçtan optimal olanın seçilmesine göre kendi içerisinde ikiye ayrılırken; karakter tabanlı metotlar tek başlık altında toplanabilen metotlardır (Şekil 5) (Sarıçam ve Müştak, 2015; Mount, 2017).



Şekil 5. Filogenetik ağaçlandırma metotları.

Uzaklık tabanlı ağaçlandırma metotları, belirli formülasyonlarla elde edilen tüm taksonların aralarındaki uzaklıklar dikkate alınarak yerleştirildiği filogenetik ağaçlardır. Tek tip ağaç oluşturur, oluşturulan ağaçta herhangi bir dal değiştirilemez, hızlı ve kolay olduğu için başlangıç analizleri için kullanışlıdır (Freeman ve Herron, 1999).

Organizmalarda karşılaştırılan dizi grubunda her bir çift arasında değişikliklerin sayısını temel alındığı ve birbirlerine genetik uzaklığı en az olan türler birleştirilerek bir ağaç oluşturulan kümeleme metotları; Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average (UPGMA) ve Neighbor joining (NJ) metotlarını kapsamaktadır. UPGMA köklü ve dal uzunlukları eşit ağaçlar oluşturan en hızlı ve basit yöntemken, bu metodun köksüz ve dal uzunlukları farklı ağaçlar oluşturan formatı ise NJ metodudur. Bu iki metot, MLST verileri üzerinden yapılan filogenetik analizlerde, eldeki verilere uygun olarak ağaçlandırma programlarınca önerilen ve sık tercih edilen filogenetik ağaç oluşturma metotlarının başında gelmektedir (Distance Methods, 2017).

Optimalite tabanlı metotlar, özellikle geniş veri setleri kullanılarak filogenetik ağaçlandırma yapılacağına tercih edilen metotlardır. Bu nedenle kapsamlı ve daha yavaş bir hesaplama ile ayrıntılı araştırma gerektirir. Fitch–Margoliash ve Minimum Evolution olmak üzere iki temel metottan oluşur. Fitch–Margoliash ve Minimum Evolution metotlarının farkı, dal uzunluğunu bulurken kullandığı cebirsel eşitliktir. Bu metotlar benzer bir prosedür ile ağaç oluşturur, muhtemel ağaçlar arasından en uygun olanı seçer (Xiong , 2006).

Karakter tabanlı metotlar, daha karmaşık olduğu için daha fazla emek ve zaman isteyen metotlardır. Tek veri seti üzerinden farklı ağaç topolojileri oluştururlar. Bunlar Maksimum parsimoni (MP), Maksimum likelihood (ML) ve Bayesian analizi'dir. Parsimoni (tutumluluk), biyolojik değişim süreci boyunca karmaşıklık yerine basit bir açıklama yaparak verilerin yorumlanması anlamına gelmektedir. Maksimum parsimoni metodunda ise bir ağaç elde etmek için gerekli en az mutasyonların saptanması esas

alınır. Buna bağlı olarak, dizi pozisyonlarının farklı puanlamaları (örneğin transversiyonları, transisyonlardan daha çok vurgulamak) sayesinde farklı yaklaşımların elde edildiği, çok sayıda örnek olduğunda kullanıma uygun olmayan bir metottur. MP'e alternatif olarak geliştirilen Maksimum Likelihood, her ağaç topolojisini değerlendirir. Farklı, ağaçta yer alan her dalın istatistikî olasılığının elde edilebilmesidir. Hızlı parsimoni metotlarına kıyasla, kapsamlı analiz edilemeyen bu olasılık metotları hesaplamada yavaştır (Freeman ve Herron, 1999). Bir diğer karakter tabanlı metod ise, İngiliz istatistikçi Thomas Bayes (1702–1761) tarafından oluşturulduğu için “Bayes Teoremi” olarak bilinen olasılık kuramıdır. Koşullu olasılıklar ile arasındaki ilişkiyi gösterir. Olasılık teorisi içinde incelenen bir olay olarak B olayına, koşullu bir A olayı (yani B olayı bilindiği durumdaki A olayı) için olasılık değeri; A olayına koşullu olarak B olayı (yani A olayı bilindiği durumdaki B olayı) için olasılık değerinden farklıdır. Ancak bu iki birbirine ters koşulluluk arasında çok belirli bir ilişki vardır ve bu ilişki Bayes Teoreminin temelini oluşturur. Ayrıca Bayes teoremi, olasılık değeri hakkındaki subjektif inanışların güncelleştirilip değiştirilmesini sağlayan temel bir gereçtir (Bayes Teoremi, 2017).

MLST veri analizi ile *Salmonella* suşlarından elde edilecek olan diziyeye göre en uygun filogenetik ağaçlandırma yöntemi belirlenerek, çizilecek filogenetik ağaç sayesinde; *housekeeping* genlerin kombinasyonlar halinde suşlar arası anlamlı bir evrimsel uzaklığı gösterip göstermediği tespit edilebilir (Sarıçam ve Müştak, 2015). Durul ve ark., (2015)'nin yapmış olduğu bir çalışmada 10 farklı serotipin MLST üzerinden filogenetik ağaçlandırılmasında NJ metodu kullanılmıştır. Bu ağaçlandırma metodu filogramik olup, farklı dal uzunluklarının evrimsel uzaklık bakımından anlamlı olduğu bir ağaç oluşturur. Çalışmada elde edilen ağaçta, 15 *S. Infantis* suşu; aynı sekans tipini (ST32) verdiği için tek bir takson olarak gösterilmiştir. MLST analizi sonrası ağaçlandırma yapılan pek çok çalışmada bu çalışmadaki gibi NJ metodu kullanılmıştır. Torpdahl ve ark. (2005)'nin yaptıkları bir çalışmada ise 1995 ile 2000 yılları arasında insan ve hayvan numunelerinden izole edilen 23 farklı serotipin UPGMA metodu ile filogenetik ağacı oluşturulmuştur. Oluşturulan filogenetik ağaçta dal uzunlukları değişken olmayıp, ortak atadan ayrılan her bir taksonun ortak ataya evrimsel uzaklığı

aynı kabul edilmiştir. Sekans tip 28, 42, 43 olarak tanımlanmış 3 adet *S. Paratyphi* suşu, 3 farklı taksonomik birim düzeyinde tek bir klan içerisinde birleştirilmiş ve *S. Thompson* ile benzerlik oranları diğer serotiplere göre daha fazla bulunmuştur. Bu da, serotipi aynı olan suşların bile evrimsel açıdan farklılığını ve sekans tipi farklı suşların benzerliğinin daha az olmasının görülebilmesi açısından MLST ile yapılan filogenetik ağaçlandırmaların önemini ortaya koymaktadır.

Bu tez çalışmasında, kanatlı kökenli *S. Infantis* suşlarının MLST analizi ile Türkiye'ye özgü sekans tiplerinin belirlenmesi ve incelenen *S. Infantis* suşlarının kendi içerisindeki ve farklı serotiplerle olan filogenetik ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. GEREÇ

#### 2.1.1. *Salmonella* İzolatları

2014-2017 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiş 113R036 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında; kanatlı kümeslerinin altlık, toz, çevresel, kemirici kapanları, yem ve su örneklerinden "ISO 6579 *Salmonella* İzolasyon ve İdentifikasyon Metodu" ile izole edilen 20 adet *Salmonella* Infantis suşu kullanıldı. Bu suşlar, rRNA kodlayan genlerin (5S, 16S ve 23S) restriksiyon enzimiyle (PvuII) spesifik olarak kesilmesiyle oluşan bant profilinin (ribopattern) değerlendirilmesine dayanan ribotiplendirme metodu ile identifiye edilmiş suşlar arasından seçildi. Ribotiplendirme sonucu, *S. Infantis* suşlarının oluşturduğu 2 farklı ribopattern'den (Dupont PvuII\_1071 ve PvuII\_2133) eşit sayıda olmak üzere 10'ar suş kullanıldı. Ayrıca sekans tipleri arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermek amacıyla yapılacak olan filogenetik analizde, dış gruplar göstermek amacıyla projede sık izole edilen serotipler olan *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* ve nadiren izole edilen serotipler olan *S. Agona*, *S. Mbandaka*, *S. Coeln* olmak üzere 6 farklı serotip çalışmaya dahil edildi. *S. Coeln* ve *S. Mbandaka* serotipinin seçilmesinde etkili faktör ise bu serotiplerin ülkemizde yapılan daha önceki MLST çalışmalarında hiç ele alınmamış olması oldu.

### 2.1.2. Besiyerleri, Ticari Kimyasal ve Solüsyonlar

**XLD Agar:** Oxoid marka XLD agar selektif besiyeri olarak kullanıldı.

**Nutrient Agar:** Oxoid marka Nutrient agar genel besiyeri olarak kullanıldı.

**DNA Purifikasyon Kiti:** GeneJET Genomic DNA Purification Kiti (Thermo Scientific, USA) kullanıldı.

**10x TBE:** Thermo Scientific B52 ticari solüsyon kullanıldı.

**1x TBE:** 10x'lik TBE'den 10 kat seyreltme ile 1x'lik TBE hazırlandı.

**Yükleme solüsyonu:** Thermo Scientific, 6x Loading Dye ve GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (SM0321) kullanıldı.

**Boyama solüsyonu:** Etidyum bromide boya alternatif olarak kanserojen olmayan SafeView (NBS Biologicals Ltd) boya kullanıldı.

**Agaroz:** Biomax Prona Agaroz kullanıldı.

**Saflaştırma kiti:** ExoSAP-IT marka exo-sap enzimi kullanıldı.

**Sephadex:** Jel filtrasyonu için Oxoid marka sephadex kullanıldı.

### 2.1.3. Laboratuvar Ekipmanları

**Biyolojik güvenlik kabini:** Safe 2020 Laminar flow içerisinde çalışmalar gerçekleştirildi.

**Isıtıcı blok:** DryBlock Heating Thermostat Bio TDB-200 kullanıldı.

**Vortex:** Fine Vortex (FinePCR) kullanıldı.

**Santrifüj:** Thermo Scientific MicroCL21 santrifüjü kullanıldı.

**Spektrofotometre:** Thermo Scientific NanoDrop 1000 cihazı kullanıldı.

**Pipetler:** Thermo Scientific (Finnpipette F1) 0.5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl'lik pipetler kullanıldı.

**Termal cycler:** Çalışmada Thermo Scientific ARKTİK Thermocycler PCR cihazı kullanıldı.



**Jel elektroforez ünitesi:** Thermo Scientific Thermo Owl A2 large Gel System, 20 x 25 cm ebatındaki jel elektroforez ünitesi kullanıldı.

**Jel elektroforez ünitesi tarakları:** Thermo Scientific A2-24D tarak (1.5 mm kalınlık, 6.5 mm genişlik, 7 µl hacim, 24 adet kuyucuk) ve A2-36D tarak (1.5 mm kalınlık, 3.5 mm genişlik, 4 µl hacim, 36 adet kuyucuk) kullanıldı.

**Güç kaynağı:** Gel elektroforez ünitesi olarak WEALTEC ELITE 300 Plus Power Supply kullanıldı.

**Hassas terazi:** SCALTEC hassas terazi kullanıldı.

**Görüntüleme cihazı:** SYNGENE G:Box, UV transillüminatörlü görüntüleme sistemi kullanıldı.

**Dizi analiz cihazı:** ABI 3500 Genetik Analyzer kullanıldı.

#### 2.1.4. Dizi Analiz Programları ve Veritabanları

**CLC Main Workbench:** Qiagen 7.7.3 versiyonu, Sanger DNA dizi analizi ile edilen dizileri hizalamada ve filogenetik ağaçlandırmada kullanılacak veriyi elde etmede kullanıldı.

**Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA):** Filogenetik ağaç oluşturmak için 7.0.20 versiyonu kullanıldı.

**MLST websitesi:** <http://pubmlst.org/data/> websitesi allel ve sekans tipleri elde etmek için kullanıldı.

## 2.2. YÖNTEM

### 2.2.1. DNA İzolasyonu

Selektif besiyeri XLD agarda üretilen her bir suş için şeffaf zona sahip, siyah, tek düşmüş bir koloniden alınıp Nutrient agara pasaj yapıldı. Nutrient agarda saf olarak üretilen her suş için, 1 koloni alınıp 200 µl DNase-RNase free PCR suyunda süspansedildi. DNA ekstraksiyonu, Genomik DNA Pürifikasyon kiti Gram negatif bakteri DNA'sı ekstraksiyon protokolüne göre yapıldı:

- Koloni, 180 µl digestion solüsyonu ile süspansedildi.
- 20 µl Proteinaz K solüsyonu eklendi ve vortekslendi.
- 56°C'de 60 dakika (dk) inkübasyon ile enzim aktivasyonu yapıldı.
- 20 µl RNase A solüsyonu eklenip vortekslenerek 10 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- 200 µl lizis solüsyonu eklendi. Homojen bir karışım elde etmek için 15 saniye vorteks yapıldı.
- 400 µl %50'lik etanol eklendi ve vorteks yapıldı. Hazırlanan lizat, spin column tüpüne aktarıldı. 6000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak yeni 2 ml'lik koleksiyon tüpü yerleştirildi.
- 500 µl etanol eklemesi tamamlanan wash buffer I solüsyonundan eklendi. 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak yeni koleksiyon tüpü yerleştirildi.
- 500 µl etanol eklemesi tamamlanan wash buffer II solüsyonundan eklendi. 12000 g'de 3 dk santrifüjten sonra koleksiyon tüpü atılarak, spin column yeni 1,5 ml'lik ependorfa yerleştirildi.
- 200 µl elution buffer eklendi ve 2 dk oda ısısında inkübasyonun ardından 8000g'de 1 dk santrifüj edildi. Spin column atılarak 1,5 ml'lik ependorf içerisinde saf DNA elde edildi.

UV ışıkta biyomoleküllerin sahip olduğu absorpsiyon üzerinden optik yoğunluk ölçmeye yarayan spektrofotometre ile elde edilen DNA'ların 260 ve 280 nm'deki absorpsiyon değerleri ölçüldü. Uygun konsantrasyon ve saflıkta elde edilen DNA örnekleri, amplifikasyon işlemleri yapılmaya kadar template DNA olarak kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

### 2.2.2. Gradyent PCR

*Salmonella* MLST analizinde incelenen 7 *housekeeping* gen için Pubmlst veritabanının öngördüğü primer çiftleri kullanıldı. Gradyent PCR ile primerler ve DNA zincirinin en uygun bağlandığı sıcaklıkların tespit edilmesi adına primer çiftleri için belirtilen ortalama bağlanma sıcaklıkları ( $T_m$ °C) üzerinden "Thermal Cycler" ile 5°C değişkenlik aralığına sahip Gradyent PCR yapıldı. Bunun için Çizelge 1 ve Çizelge 2'de belirtilen PCR karışım oranları ve PCR koşulları kullanıldı. PCR ürünlerinin elektroforezi sonrası UV görüntüleme ile elde edilen jel görüntüsü üzerinden her bir gen için en parlak ve spesifik bantların gözlemlendiği sıcaklık değeri, optimal bağlanma sıcaklığı olarak kabul edildi. Bu sıcaklıklar tespit edildikten sonra MLST analizi aşamasına geçildi.

**Çizelge 1.** Gradyent PCR karışımı.

Bileşen	Hacim
dH <sub>2</sub> O	14,8 µl
PCR buffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
F primer (10 pmol)	1 µl
R primer (10 pmol)	1 µl
Taq DNA polimeraz	0,2 µl

**Çizelge 2.** Gradyent PCR sıcaklık ve döngü koşulları.

PCR basamağı	Gen İsimleri					
	<i>aroC, hisD, purE</i>			<i>dnaN, hemD, sucA, thrA</i>		
	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	94°C	3 dk	-	94°C	3 dk	-
Denatürasyon	94°C	1 dk	30	94°C	1 dk	30
Bağlanma	60-65°C	30 sn		56-61°C	30 sn	
Uzama	72°C	1 dk		72°C	1 dk	
Son uzama	72°C	7 dk	-	72°C	7 dk	-

### 2.2.3. Multilocus Sequence Typing

Her bir örnek için 7 *housekeeping* gene ait spesifik primerlerin DNA dizileri ve gradyent PCR sonucu elde edilen optimal bağlanma sıcaklıkları Çizelge 3'te belirtildi. PCR karışımı 25 µl toplam hacimde Çizelge 4'de belirtildiği şekilde hazırlanarak amplifikasyon sıcaklık ve döngü parametreleri Çizelge 5'te gösterildi.

**Çizelge 3.** *Salmonella* MLST analizinde kullanılacak olan *housekeeping* genler, primer dizileri, bağlanma sıcaklıkları ve elde edilen PCR ürün büyüklükleri (University of Oxford, 2010).

Gen	Primer adı	5'- 3' Primer dizini	Büyüklük (bp)	Bağlanma sıcaklığı (Tm°C)
<i>aroC</i>	F	CCTGGCACCTCGCGCTATAC	826	61
	R	CCACACACGGATCGTGGCG		
<i>dnaN</i>	F	ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA	833	58
	R	AATTTCTCATTTCGAGAGGATTGC		
<i>hemD</i>	F1	GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG	666	58
	R	ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA		
<i>hisD</i>	F	GAAACGTTCCATTCGCGCAGAC	894	61
	R	CTGAACGGTCATCCGTTTCTG		
<i>purE</i>	F	ATGTCTTCCC GCAATAATCC	510	61
	R	TCATAGCGTCCCCCGGGATC		
<i>sucA</i>	F	AGCACCGAAGAGAAACGCTG	643	58
	R	GGTTGTTGATAACGATACGTAC		
<i>thrA</i>	F	GTCACGGTGATCGATCCGGT	852	57
	R	CACGATATTGATATTAGCCCG		

**Çizelge 4.** MLST PCR karışımı.

Bileşen	Hacim
dH <sub>2</sub> O	14,8 µl
PCR buffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
F primer (10 pmol)	1 µl
R primer (10 pmol)	1 µl
Taq DNA polimeraz	0,2 µl
DNA	2 µl

**Çizelge 5.** MLST PCR sıcaklık ve döngü koşulları.

PCR basamağı	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	94°C	3 dk	-
Denatürasyon	94°C	1 dk	30
Bağlanma	T <sub>m</sub> *	30 sn	
Uzama	72°C	1 dk	
Son uzama	72°C	7 dk	-

\*T<sub>m</sub> sıcaklıkları *aroC*, *hisD*, *purE* genleri için 61°C; *dnaN*, *hemD*, *sucA* genleri için 58°C; *thrA* geni için 57°C olarak kabul edildi.

PCR ürünlerinin elektroforez yöntemi ile analizi için, 3 gr agaroz 200 ml Tris Borate EDTA içerisinde eritilip 14 µl Safe View boyası eklenerek hazırlanan %1,5'lük agaroz jel kullanıldı. Tarakları yerleştirilmiş 20 cm'lik yatay jel elektroforez tablasına döküldü ve jelin uygun katılığa ulaşmasının ardından içerisinde yürütme tampon olarak yeterli miktarda 0,5 molar TBE bulunan elektroforez ünitesine yerleştirildi. Her bir örnekten 5 µl alınarak, 2µl 6x loading dye ile karıştırıldı. Elde edilen karışımlar, jele yüklendi. DNA örnekleri 180 voltta 60 dk elektroforez işlemine tabi tutuldu (Sambrook ve ark., 1989). Jel, bilgisayarlı UV transillüminatör cihazı içine yerleştirilerek görüntüledi ve fotoğraflar kaydedildi. Böylelikle her bir gen için spesifik bantlar görüntülenerek, elde edildiği teyit edilen ampliconlar saflaştırma aşamasında kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

### 2.2.4. Saflaştırma ve DNA Dizi Analizi

Amplifikasyon sonrasında 5 µl PCR ürünü için 2 µl Exosap enzimi ile 37°C’de 30 dk, 80°C’de 15 dk inkübasyon olmak üzere PCR ürünleri saflaştırıldı. Saflaştırılan bu ürünler, her bir gen için spesifik primerler olan Pubmlst veritabanında belirtilen DNA dizileme primerleri ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit kullanılarak DNA dizi analizi ile çoğaltıldı (Çizelge 6). Çizelge 7’de belirtilen oranlar dikkate alınarak PCR karışımı oluşturulup, Çizelge 8’de belirtilen koşullarda amplifikasyon gerçekleştirildi.

**Çizelge 6.** DNA dizi analizinde kullanılan primer dizileri ve bağlanma sıcaklıkları (University of Oxford, 2010).

Gen	Primer adı	Primer Çiftleri	Bağlanma sıcaklığı (°C)
<i>aroC</i>	sF1	GGCGTGACGACCGGCAC	50
	sR1	AGCGCCATATGCGCCAC	
<i>dnaN</i>	sF	CCGATTCTCGGTAACCTGCT	50
	sR1	ACGCGACGGTAATCCGGG	
<i>hemD</i>	sF2	GCCTGGAGTTTTCCACTG	50
	sR	GACCAATAGCCGACAGCGTAG	
<i>hisD</i>	sF	GTCGGTCTGTATATTCCCGG	50
	sR	GGTAATCGCATCCACCAAATC	
<i>purE</i>	sF1	ACAGGAGTTTTAAGACGCATG	50
	sR1	GCAAACCTTGCTTCATAGCG	
<i>sucA</i>	sF1	CCGAAGAGAAACGCTGGATC	50
	sR	GGTTGTTGATAACGATACGTAC	
<i>thrA</i>	sF	ATCCCGGCCGATCACATGAT	50
	sR	CTCCAGCAGCCCCCTTTTCAG	

**Çizelge 7.** DNA dizi analizi için gerçekleştirilen PCR reaksiyonu bileşen ve hacimleri.

Bileşen	Hacim
dH <sub>2</sub> O	2 µl
BigDye	2 µl
5xBuffer	2 µl
Primer (3.2 pmol)	2 µl
DNA	2 µl

**Çizelge 8.** DNA dizi analizi PCR sıcaklık ve döngü koşulları.

PCR basamağı	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	96 °C	1 dk	-
Denatürasyon	96 °C	10 sn	25
Bağlanma	50 °C	5 sn	
Uzama	60 °C	4 dk	

Cycle PCR ürünleri, 1 g Sephadex'in, 13 ml distile suda çözülmesiyle elde edilen çözeltilerden her bir örnek için 750 µl çözelti kullanılarak yapılan jel filtrasyonu ile saflaştırıldı. Saflaştırılan ürünler, Kapiller Elektroferez Dizi Analizi Cihazına (ABI 3500 Genetik Analyzer) yüklenerek genlerin DNA dizileri belirlendi. Elde edilen forward ve reverse dizilerinin birleştirilmesi ve hizalamanın yapılması için "CLC Main Workbench v.7.7.3." dizi analiz programından faydalanıldı. Her bir gen için Pubmlst veritabanında belirtilen uzunlukta korunmuş bölge dizileri elde edildikten sonra veritabanı aracılığıyla her bir genin allel profili saptandı. 7 gen için elde edilen allellerin kombinasyonu üzerinden her bir suşun sekans tipi belirlendi.

### 2.2.5. Filogenetik Analiz

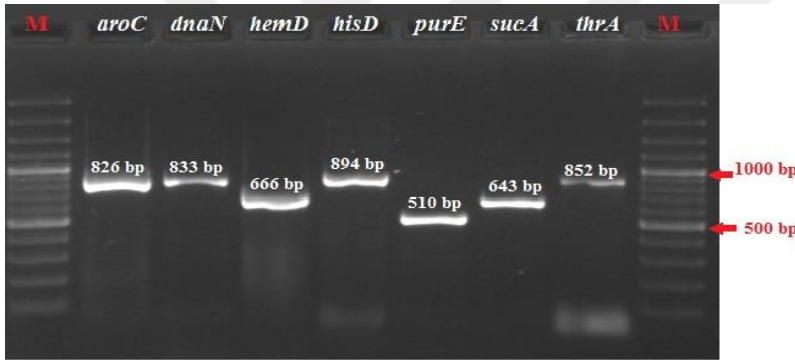
DNA dizi analizi ile elde edilen verilerin düzenlenmesinden sonra filogenetik ağaçlandırma aşamasına geçildi. Bu aşamada *aroC* için 501 bp, *dnaN* için 501 bp, *hemD* için 432 bp, *hisD* için 501 bp, *purE* için 399 bp, *sucA* için 501 bp ve *thrA* için 501 bp'lik standart allelik korunmuş bölge dizileri dizi analiz programı ile uc uca eklendi. Böylelikle her bir örnek için 3336 bp'lik tek bir DNA dizisi elde edildi (Kidgell ve ark., 2002). Bu diziler, filogenetik ağaç oluşturmak için veri olarak kullanıldı. Elde edilen diziye en uygun ağaçlandırma metodu ile en uygun yer değiştirme metodu MEGA v.7.0.20 programı ile belirlenerek, filogenetik ağaç çizimine geçildi. 26 örneğe ait tek bir dizi üzerinden yapılan veri girişi ile program otomatik olarak en uygun yer değiştirme modelini ve ağaçlandırma metodunu atadı.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. MLST Bulguları

Ele alınan tüm örneklerin MLST analizinde 7 *housekeeping* gen bakımından pozitif olduğu gözlemlendi. Elektroforez sonucunda her bir örneğin *aroC* için 826 bp, *dnaN* için 833 bp, *hemD* için 666 bp, *hisD* için 894 bp, *purE* için 510 bp, *sucA* için 643 bp ve *thrA* için 852 bp büyüklüğünde bantlar verdiği gözlemlendi (Şekil 6).



**Şekil 6.** Her bir *housekeeping* gene ait elektroforez sonucu. M:100 bp plus markeri göstermektedir.

DNA dizi analizi ile elde edilen diziler CLC Main Workbench v.7.7.3. dizi analiz programı ile düzenlenip hizalandıktan sonra Pubmlst veritabanı üzerinden her bir genin alleli saptanmak üzere kullanıldı. *aroC* 501 bp, *dnaN* 501 bp, *hemD* 432 bp, *hisD* 501 bp, *purE* 399 bp, *sucA* 501 bp ve *thrA* 501 bp'lik uzunlukta standart dizi karşılaştırması ile allelik profil elde edildi. Her bir suşa ait gen dizisinin veritabanına girilmesiyle elde edilen allellerin oluşturduğu kombinasyon ile sekans tipi belirlendi. Tüm *S. Infantis* suşları sekans tip 32, dış grup suşları olan *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Mbandaka*, *S. Coeln* suşları ise sırasıyla sekans tip 11, 13, 19, 33, 413 ve 2015

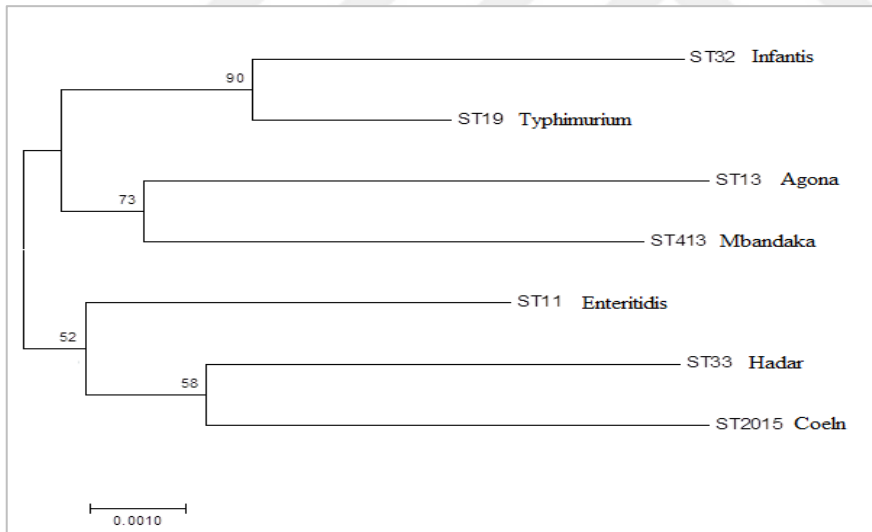
olarak bulundu (Çizelge 9). Pubmlst veritabanında kayıtlı sekans tipi ST2015 için serotip bilgisi bulunamadı ve *S. Coeln* olarak ilk kez serotip kaydı bu çalışmada yapıldı.

**Çizelge 9.** Her bir suşa ait gen allelleri ve allellerin kombinasyonu ile belirlenen sekans tipleri.

Örnek no	Serotip	<i>aroC</i>	<i>dnaN</i>	<i>hemD</i>	<i>hisD</i>	<i>purE</i>	<i>sucA</i>	<i>thrA</i>	Sekans tip
1	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
2	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
3	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
4	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
5	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
6	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
7	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
8	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
9	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
10	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
11	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
12	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
13	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
14	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
15	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
16	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
17	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
18	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
19	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
20	Infantis	17	18	22	17	5	21	19	32
21	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11	11
22	Agona	3	3	7	4	3	3	7	13
23	Typhimurium	10	7	12	9	5	9	2	19
24	Hadar	2	5	6	7	5	7	12	33
25	Mbandaka	15	70	93	78	113	6	68	413
26	Coeln	5	4	18	561	36	12	12	2015

### 3.2. Filogenetik Analiz Bulguları

MEGA v.7.0.20 programı ile ağaçlandırmada kullanılmak üzere *aroC* (501 bp), *dnaN* (501 bp), *hemD* (432 bp), *hisD* (501 bp), *purE* (399 bp), *sucA* (501 bp), *thrA* (501 bp) genleri korunmuş bölgelerinin birleştirilmesiyle her bir örnek için 3336 bp'lik tek bir dizi elde edildi (Kumar ve ark., 2016). Programın veriler üzerinden optimal ağaçlandırma metodunu atamasıyla Neighbor joining metodu ile 26 *Salmonella* izolatının 7 *housekeeping* gen dizisi üzerinden filogenetik ağaç elde edilerek, sekans tipleri arasındaki evrimsel ilişki gösterildi (Saitou ve Nei, 1987). Baz değişim oranlarını saptamak için Tamura 3 parametrelilik yer değiştirme modeli (T92), kümelerin birleştirilmesi için ise Bootstrap testi (1000 tekrarlık) kullanıldı (Şekil 7) (Felsenstein, 1985; Tamura, 1992).



**Şekil 7.** Taksonların evrimsel ilişkisi. Filogenetik ağacı oluşturmak için kullanılan evrimsel uzaklıklar dal uzunlukları şeklinde gösterilmiş olup taksonlar arası benzerlik oranı her bir dalın üzerinde gösterildi. %0,1'lik bootstrap değeri sol alt köşede belirtildi.

#### 4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, insan ve hayvanlarda sistemik hastalıklara neden olan major bakteriyel etkenlerden *Salmonella enterica* subsp. *enterica*'ya ait bazı serotiplerin (*S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Mbandaka*, *S. Coeln*) moleküler karakterizasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, kanatlı kökenli suşların genotiplendirilmesinde, *Salmonella* filogenetik ve epidemiyolojik çalışmaları ile populasyon yapısını belirlemede kullanılan genotiplendirme analizlerinin başında gelen MLST metodu kullanıldı. İnternal fragmentler olan 7 *housekeeping* gen (*aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* ve *thrA*) dizilenecek allelik form ve sekans tipleri belirlendi. Gen dizilerinin birleştirilmesiyle elde edilen tek bir DNA dizisi ile oluşturulan filogenetik ağaçta sekans tipleri arası evrimsel ilişki gösterildi. Elde edilen sonuçların; sekans tipi ile izolasyon kaynağı ilişkisi, yerel ve dünya çapında yaygın suşlar ile bunların bulaşma yolları hakkında bilgi vererek epidemiyolojik çalışmalara kaynak olması hedeflendi (Kidgell ve ark., 2002; Ho ve ark., 2017).

Türkiye'de *Salmonella enterica*'ya ait farklı serotiplerin MLST ile tiplendirilmesini konu alan 3 adet çalışma yapılmıştır. Durul ve ark.'nın 2015 yılında yapmış olduğu çalışmada; *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Telaviv*, *S. Newport*, *S. Anatum*, *S. Montevideo*, *S. Reading*, *S. Kentucky*, *S. Othmarschen* olmak üzere 10 farklı serotipten oluşan 56 *Salmonella* suşu kullanılmış olup tavuk eti ve sakatattan izole edilen 15 farklı *S. Infantis* suşunun tamamı ST32; sakatattan izole edilen 1 *S. Typhimurium* suşu, ST19; peynirden izole edilen 1 *S. Hadar* suşu, ST33 olarak bulunmuştur. Bu tez çalışmasında, kullanılan kanatlı kökenli 20 *S. Infantis* suşunun da ST32 olduğu göz önünde bulundurulduğunda; *S. Infantis* için ülkemizde mevcut, tek tip sekans tipi olduğu ve bu sekans tipinin izolasyon kaynağına göre değişmediği sonucuna varıldı. *S. Typhimurium* ve *S. Hadar* suşu için de sırasıyla ST19 ve ST33 olarak benzer sekans tipleri bulunmuş olup, örnek sayısı artırıldığında izolasyon kaynağı ve sekans tip ilişkisinin yorumlanabileceği sonucuna varıldı. Günel ve ark.'nın 2015 yılında yapmış olduğu çalışmada ise 1'er adet *S. Enteritidis*, *S.*

Anatum, *S. Mikawasima* ve *S. Charity* serotipleri olmak üzere 4 adet *Salmonella* suşu kullanılmıştır. *S. Enteritidis*, ST11; *S. Anatum*, ST64; *S. Mikawasima*, ST1815 ve *S. Charity*, ST383 olarak bulunmuştur. Bu tez çalışmasında kullanılan kanatlı kökenli *S. Enteritidis* suşunun da benzer olarak ST11 bulunması üzerine, izolasyon kaynağının bitkisel veya hayvansal olmasının sekans tipini değiştirmeyen bir parametre olduğu ve dünya çapında baskın olan *S. Enteritidis* sekans tipinin ülkemizde de mevcudiyetini koruduğu sonucuna varıldı. Acar ve ark.,'nın 2017 tarihli güncel *Salmonella* MLST analizi çalışmasında ise; *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Enteritidis*, *S. Telaviv*, *S. Newport*, *S. Anatum*, *S. Montevideo*, *S. Reading*, *S. Kentucky*, *S. Othmarschen*, *S. Caracas*, *S. Poona*, *S. Typhi* ve *S. Paratyphi B* olmak üzere 15 adet serotipten oluşan 158 adet *Salmonella* suşu çalışılmıştır. *S. Infantis* ST32; *S. Typhimurium*, ST19; *S. Hadar*, ST33; *S. Enteritidis*, ST11; *S. Telaviv*, ST1068; *S. Anatum*, ST64; *S. Kentucky*, ST314; *S. Othmarschen*, ST1832; *S. Caracas*, ST1521; *S. Poona*, ST812; *S. Typhi*, ST1 ve *S. Paratyphi B*, ST86 olarak bulunmuştur. 3 serotip için ise birden fazla sekans tip elde edilmiştir. Bunlar; *S. Montevideo* (ST138, ST195), *S. Newport* (ST31, ST166, ST1822) ve *S. Reading* (ST93, ST1831) serotipleridir. Tavuk etinden izole edilen *S. Infantis* suşlarının (15 adet), insan ve hayvan kaynaklı (sığır ve koyun) *S. Typhimurium* suşlarının (19 adet) ve peynir ile koyun dışkısından izole edilen *S. Hadar* suşlarının (2 adet); serotip bazında tek tip sekans tipi verdiği görülmüştür. Bu tez çalışmasında da kanatlı kökenli bu serotiplerin benzer sekans tipine sahip olduğu göz önünde bulundurulduğunda, ülkemizde yapılan *Salmonella enterica* MLST çalışmaları için en azından örnek hacmi artırılmadığı durumlarda izolasyon kaynağına göre sekans tipinin değişmediği düşünüldü. Bununla birlikte 2 yıllık bir zaman diliminde sekans tip çeşitliliğinde artış olmadığı sonucuna varıldı.

Günümüze dek yapılmış MLST analizlerinde *S. Infantis* serotipi için çok sayıda sekans tipi bulunmuştur. Bunlardan ilki ST32 olup; Danimarka (Torpdahl ve ark., 2005), Brezilya (Almeida ve ark., 2013), Çin (Cai ve ark., 2016) gibi çeşitli ülkelerde çoğunlukla gıda, insan, kanatlı kaynaklarından izole edilen suşlarda tespit edilmiştir. En sık bulunan ve hemen hemen tüm kıtalarda mevcut olan bu sekans tipinin bu tez çalışmasında da bulunmuş olması, *S. Infantis* kaynaklı enfeksiyonlardan sorumlu olan

baskın sekans tip olabileceği görüşünü desteklemektedir. Bu nedenle, Salmonellozisin kontrolünde yapılacak aşılamalarda kullanılmak üzere, bu sekans tipinden elde edilen ticari aşuların tercih edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Diğer *S. Infantis* sekans tipleri olan; ST41 yalnızca Danimarka'da (Torpdahl ve ark., 2005) insan kökenli, ST141 yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde kanatlı kökenli ve ST361 yalnızca İngiltere'de kanatlı kökenli olarak tespit edilmiştir (University of Oxford, 2010). Bu sekans tiplerinin yerel sekans tipleri olduğu, dolayısıyla ülkemizde yapılacak aşı uygulamalarında bu sekans tiplerinden oluşan herhangi ithal bir aşının kullanılmasının yüksek bağışıklık oluşturmayacağı düşünüldü.

Rappuoli ve Bagnolu'nun 2011 yılında *Neisseria meningitidis* için, Shome ve ark.'nın 2016 yılında *Brucella* spp. için yapmış olduğu çalışmayla anlaşıldığı üzere MLST ile saptanan bir ya da daha fazla sayıdaki sekans tipinin kombinasyonu şeklinde dizayn edilen protein içerikli aşuların mevcudiyeti, metodun önemini artırmaktadır. Clarke ve ark.'nın 2004 yılında yapmış olduğu çalışmada ise invaziv pnömokok enfeksiyonları için kullanılan konjugat polisakkarit yapısındaki aşılarda bulunan mevcut sekans tiplerin tespiti üzerinde durulmuştur. *Streptococcus pneumoniae* türü baskın serotipleri ve sekans tip ilişkisi üzerinden aşı etkinliği araştırılmıştır. Baskın serotiplere ait sekans tipleri bileşenlerinden oluşan aşının etkinliğinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. İnvaziv pnömokok enfeksiyonlarına neden olma potansiyeli düşük serotiplere ait sekans tipi bileşenlerinin mevcut aşılarda düşük oranda olduğu tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak, mevcut konjugat aşularının etkinliğinin araştırılmasında MLST analizinin avantaj sağladığı kabul edilmiştir. Xu ve ark.'nın 2015 yılında yapmış olduğu çalışmada ise *Leptospira* spp. enfeksiyonları kontrolünde önemli rolü olan inaktive aşuların genetik stabilite ve kalite kontrol tespitinde MLST referans metot olarak alınmıştır. 7 farklı inaktive aşı türünün, 7 farklı sekans tip bileşenlerinden oluştuğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda “bakteriyel aşuların kalite kontrol programlarında özellikle tek bir kaynaktan orijin alan suşlar tercih edildiğinde, farklı üreticiler arası genetik tutarlılığın değerlendirilmesinde önemli bir araçtır” sonucuna varılmıştır (Xu ve ark., 2015). Bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, *S. Infantis* kaynaklı enfeksiyonlarda kullanılan sekans tip esaslı mevcut bir aşının olmaması bu

konuda yapılacak çalışmaların önünü açmaktadır. Ayrıca aşı suşlarının kalite ve stabilitesinin değerlendirilmesi bakımından da MLST moleküler karakterizasyon yönteminin güvenilir bir yöntem olarak kullanılması uygundur (Clarke ve ark., 2004).

*S. Typhimurium*, *S. Infantis*'e göre çok daha geniş sekans tip çeşitliliğine sahiptir. Ranjbar ve ark.'nın İran'da 2016 yılında yapmış olduğu 21 *S. Typhimurium* suşunun MLST ile tiplendirildiği çalışmada; 18 suş ST19, 3 suş ST328 olarak bulunmuştur. *S. Typhimurium* için global sekans tip kabul edilen ST19; Avrupa (Torpdahl ve ark., 2005), Asya (Cai ve ark., 2016) ve Afrika (Feasey ve ark., 2012) kıtasında pek çok ülkede; insan, gıda, koyun ve sığır gibi çeşitli kaynaklardan izole edilerek tespit edilmiştir. Ülkemizde yapılmış *Salmonella* MLST çalışmaları ve bu tez çalışması sonuçları dikkate alındığında komşu ülkeler de dahil *S. Typhimurium* sekans tipi benzerliğinin global ST19 ile sınırlı olduğu ve diğer sekans tipler bakımından herhangi bulaşma olmadığı sonucuna varılmıştır. Cai ve ark., 2016 yılında 52 *S. Typhimurium* suşu ile Çin'de yapmış olduğu çalışmada 31 suş ST19 olarak bulurken 21 suşu ise ST34 olarak bulmuştur. Araştırmacılar *S. Typhimurium* için ST34'ün uzakdoğu ülkelerinde baskın sekans tiplerden olduğunu belirtmişlerdir (Li ve ark., 2014). Ancak ülkemiz ve komşu ülkelerde ST34 henüz saptanamamıştır.

*S. Enteritidis* ST11 sekans tipi; Amerika (Bado ve ark., 2012), Avrupa (Antunes ve ark., 2011) ve Asya (Noda ve ark., 2011) kıtasında pek çok ülkeye başarılı olarak adapte olmuş en yaygın sekans tipidir ve bu tez çalışmasıyla ülkemizde de tespit edilmiştir. Ayrıca Ghaderi ve ark.'nın 2015 yılında komşu ülke İran'da yapmış olduğu MLST çalışmasında, insan ve kanatlı kökenli 76 *S. Enteritidis* suşunun tamamı, ST11 olarak bulunmuştur. *S. Hadar* için ST12 yalnızca Danimarka'da (Torpdahl ve ark., 2005) kanatlı kökenli olarak, ST368 yalnızca Almanya'da (Meyer ve ark., 2008) insan kaynaklı olarak tespit edilmiştir.

Nadiren bulunan serotiplerden olan *S. Mbandaka*, *S. Agona* ve *S. Coeln* serotipleri ülkemizde ilk kez bu tez çalışmasında MLST ile tiplendirildi. *S. Mbandaka* ST413 Avrupa (Hoszowski ve ark., 2016) ülkeleri başta olmak üzere en yaygın bulunan sekans tipi olup, ST900 yalnızca İngiltere’de (Hayward ve ark., 2016). domuzlarda tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında ST413 bulunup, bu küresel sekans tipin ülkemizdeki varlığı tespit edildi. *S. Agona* için yaygın sekans tipi olan ST13 Afrika (Dione, 2010) Avrupa (Carattoli ve ark., 2002), Asya (Li ve ark., 2014) ülkelerinin çoğunda gıda, kanatlı ve insan kaynaklı olarak bulunurken, bu çalışmada da benzer sekans tipi elde edildi. İncelenen son nadir serotip *S. Coeln* serotipi ise ST2015 olarak tanımlanmıştır. Pubmlst veritabanında ST2015 allelik formülasyonu mevcut olup, serotip bilgisi bulunmadığından bu sekans tipe ait serotip bilgisi ilk kez veritabanına girildi.

MLST ile incelenen 7 *housekeeping* gen dizisinin birleştirilmesiyle elde edilen 3336 bp’lik dizinin temel alındığı filogenetik ağaçlandırma çalışmaları incelendiğinde uzaklık tabanlı metodların sıklıkla kullanıldığı görüldü (Kidgell ve ark., 2002) Torpdahl ve ark.’nın 2005 yılında yapmış olduğu 25 serotipten oluşan 110 *Salmonella* suşunun genotipik karakterizasyonuna dayanan çalışmada, uzaklık tabanlı UPGMA metodu ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Dal uzunluklarının değişmediği bu formatta, *S. Infantis* (ST32 ve ST41) ve *S. Typhimurium* (ST19, ST34, ST35) %90’dan büyük benzerlik oranı ile aynı klana yerleştirilmiştir. Durul ve ark.’nın 2015 yılında yapmış *Salmonella* suşları altiplendirmesine dayanan çalışmada ise 10 serotipten oluşan 56 örnek MLST ile tanımlanmış ve Neighbor joining ağaçlandırma metodu ile serotipler arası evrimsel ilişki gösterilmiştir. İkili dizi karşılaştırmasında farklı nükleotid sayısının karşılaştırılan total nükleotid sayısına oranı ile elde edilen benzerlik oranını (%90) en fazla *S. Infantis* (ST32) ve *S. Typhimurium* (ST19) serotipleri arasında olduğundan bu serotipler tek bir klanda birbirine en yakın taksonlar olarak gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında 26 farklı DNA dizisi (3336 bp) Neighbor joining metodu ile ağaçlandırıldı. Yukarıda bahsedilen çalışmalara benzer olarak, elde edilen filogenetik ağaçta yüksek benzerlik oranıyla (%90) en yakın sekans tipler ST32 ve ST19 olarak bulundu.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

2014-2017 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiş 113R036 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında kanatlı kümeslerinin altlık, toz, çevresel, kemirici kapanları, yem ve su örneklerinden ISO 6579 *Salmonella* İzolasyon ve İdentifikasyon Metodu ile izole edilen *Salmonella* Infantis suşları MLST analizi ile genotiplendirildi. MLST analizinde belirtilen housekeeping genlerin çoğaltılması, allel ve sekans tiplerinin belirlenmesi için Pubmlst veritabanı referans alındı. Analiz sonucunda 20 adet *Salmonella* Infantis suşunun tamamı ST32, 1'er adet olarak seçilen diğer serotipler *S. Enteritidis* ST11, *S. Agona* ST13, *S. Typhimurium* ST19, *S. Hadar* ST33, *S. Mbandaka* ST413, *S. Coeln* ST2015 olarak bulundu. *S. Mbandaka*, *S. Agona* ve *S. Coeln* serotipleri ülkemizde ilk kez MLST ile tiplendirildi. İlk kez bu çalışmayla ST2015 sekans tipi için *S. Coeln* olarak serotip bilgisi Pubmlst veritabanına kaydedildi.

Türkiye'de ve dünya çapında yapılan çalışmalar ile bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında küresel olarak dağılım göstermiş baskın sekans tiplerin ülkemizde de mevcut olduğu sonucuna varıldı. Buna bağlı olarak *Neisseria meningitidis*, *Leptospira spp.* ve *Brucella spp.* gibi türler için yapılmış aşı etkinliği ve sekans tip ilişkilendirilmesi temelli çalışmalar incelendiğinde, *Salmonella* Infantis'e yönelik bir sekans tip temelli aşı geliştirilebileceği ve bu süreçte mutlaka yerel suşlara ait genotipik özelliklerin dikkate alınması gerektiği anlaşıldı.

Bu çalışmada kullanılan serotipler için yeni sekans tiplerin tespit edilebilmesi adına, *Salmonella* izolatları coğrafik dağılımı göz önünde bulundurularak gerçekleştirilen kapsamlı bir örnekleme sonrası yapılacak MLST analiziyle ülkemizde mevcut tüm sekans tiplerin, kaynak ve izolasyon bölgesi bazında araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

## ÖZET

### **Kanathlı Kökenli *Salmonella* Infantis Suşlarının MLST ile Filogenetik Analizi**

2014-2017 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiş 113R036 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında izole edilen 20 adet *Salmonella* Infantis suşu MLST ile tiplendirildi. Farklı sekans tipleri ve serotipler arasındaki evrimsel ilişkiyi filogenetik ağaç ile ortaya koymak için, dış grup olarak birer adet *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Mbandaka* ve *S. Coeln* olmak üzere 6 farklı serotip kullanıldı. Her bir suşun 7 *housekeeping* geni (*aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* ve *thrA*) Pubmlst veritabanında belirtilen primerler kullanılarak çoğaltıldı. Veritabanından alınan dizi analizi primerleri ile DNA dizi analizi yapıldı ve gen dizileri saptandı. Elde edilen diziler ile her bir suşun Pubmlst veritabanı üzerinden sekans tipi saptandı. Suş bazında 7 gen dizisi (*aroC* için 501 bp, *dnaN* için 501 bp, *hemD* için 432 bp, *hisD* için 501 bp, *purE* için 399 bp, *sucA* için 501 bp ve *thrA* için 501 bp), 3336 bp'lik tek bir DNA dizisi oluşturacak şekilde birleştirildi. T92 yer değiştirme modeli ve NJ ağaçlandırma metodu kullanılarak 26 adet suşun DNA dizisi ile filogenetik oluşturuldu.

Tüm *S. Infantis* suşları sekans tip 32, dış grup suşları olan *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Mbandaka*, *S. Coeln* suşları ise sırasıyla sekans tip 11, 13, 19, 33, 413 ve 2015 bulundu. Tüm serotipler için ülke ve dünya çapında baskın kabul edilen sekans tipler bu çalışmada da tespit edildi. Ülkemizde ve dünya çapında geçmiş yıllarda yapılmış benzer çalışmalar göz önünde bulundurularak, incelenen serotipler için baskın ve küresel kabul edilen sekans tiplerinin mevcut olduğu ve yerel çalışmaların yapıldığı süreçte bu baskın sekans tiplerin değişmediği anlaşıldı. Çeşitli bakteri türleri için kullanılmakta olan sekans tipi temelli bileşenlerden oluşan aşılarda göz önünde alındığında, ülkemizde *S. Infantis* için yapılacak bir aşılama ST32 sekans tipinin esas alınması gerektiği sonucuna varıldı. 7 farklı sekans tipi arası evrimsel uzaklığın gösterildiği ağaçta, birbirine en yakın sekans tipler 32 ve 19 (*S. Infantis* ve *S. Typhimurium*) olarak bulundu. Gelecek çalışmalarda örnek sayısı artırıldığında *S. Infantis* serotipinin diğer sekans tiplerini bulma ihtimalinin artacağı ve bunlar filogenetik ağaçta farklı taksonlara yerleştirilebileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** *Housekeeping* gen, MLST, *Salmonella* Infantis

## SUMMARY

### Phylogenetic Analysis of *Salmonella* Infantis Strains from Poultry by MLST

20 strains of *Salmonella* Infantis isolated in the scope of the 113R036 TÜBİTAK project in Ankara University Veterinary Faculty Microbiology Department between 2014-2017 were typed with MLST. Six different serotypes, *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Mbandaka* and *S. Coeln*, were used to show the evolutionary relationship between different sequence types and serotypes on phylogenetic tree. For each strain 7 housekeeping gene (*aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* and *thrA*) were amplified using the primers indicated in the Pubmlst database. DNA sequence analysis was performed with sequence analysis primers from the database and gene sequences were determined. For each strain, sequence type was determined on Pubmlst database with obtained sequences. 7 genes sequences (501 bp for *aroC*, 501 bp for *dnaN*, 432 bp for *hemD*, 501 bp for *hisD*, 399 bp for *purE*, 501 bp for *sucA* and 501 bp for *thrA*) were combined to obtained 3336bp sequence based on a strain. A phylogenetic tree was constructed based on 26 DNA ssequences with T92 displacement model and NJ phylogenetic tree construction method.

All *S. Infantis* strains were found sequence type 32, external strain strains that *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Mbandaka* and *S. Coeln* respectively were found sequence type 11, 13, 19, 33, 413 and 2015. For all serotypes, the most common and dominant sequence types by the country and around the world were also identified in this study. Considering similar studies in our country and around the world in the past years, it has been understood that there are dominant and globally accepted sequence types for the serotypes studied and that these dominant sequence types have not changed in the course of local studies. Taking into account the vaccines consisting of sequence type-based components which are being used for various bacterial strains, we concluded that the ST32 sequence type s should be taken in a vaccination for *S. Infantias* in our country. In the tree showing the evolutionary distance between 7 different sequence types, the closest sequence types were 32 and 19 (*S. Infantis* and *S. Typhimurium*). In future studies, it is concluded that the probability of finding other sequence types of *S. Infantis* serotype increases when the number of samples is increased, and that these can be placed in different taxa in the phylogenetic tree.

**Key Words:** *Housekeeping* genes, MLST, *Salmonella* Infantis

## KAYNAKLAR

- ACAR S, BULUT E, DURUL B, UNER I, KUR M, AVSAROGLU MD, KIRMACI HA, TEL YO, ZEYREK F, SOYER Y (2017). Phenotyping and genetic characterization of *Salmonella enterica* isolates from Turkey revealing arise of different features specific to geography. *International Journal of Food Microbiology*. 98-107.
- ACHTMAN M, WAIN J, WEIL FX, NAIRZ S, ZHOU Z, SANGAL V, KRAULAND MG, HALE JL, HARBOTTLE H, UESBECK8 A, DOUGAN G, HARRISON LH, BRISSE S (2012). Multilocus Sequence Typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica* . *Plos Pathogens*, **8**: 15-16.
- ADAMS MR, MOSS MO ( 1995). *Salmonella*. *Food Microbiology*. 192-200.
- AKAN M (2008). Kanatlılarda *Salmonella* infeksiyonları ve kontrolünde temel prensipler. *Mektup Ank*, **6**: 2-3.
- ALMEIDA F, PITONDO-SILVA A, APARECIDA OM, FALCÃO JP (2013). Molecular epidemiology and virulence markers of *Salmonella* Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, **19**: 145-151.
- ANDREI A, ZERVOS MJ (2006). The application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Arch Pathol Lab Med*, **130**: 662-668.
- ANTUNES P, MOURÃO J, MACHADO J, PEIXE L (2011). First description of *qnrS1*-IncN plasmid in a ST11 *Salmonella* Enteritidis clinical isolate from Portugal. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **69**: 463-465.
- BADO I, GARCÍA-FULGUEIRAS V, CORDEIRO NF, BETANCOR L, CAIATA L, SEIJA V, ROBİNO L, ALGORTA G, CHABALGOİTY JA, AYALA JA, GUTKİND GO, VİGNOLIA R (2012). First Human Isolate of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Harboring blaCTX-M-14 in South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2132-2134.
- BAYES TEOREMİ. Erişim Adresi: [[http://tr.wikipedia.org/wiki/Bayes\\_teoremi](http://tr.wikipedia.org/wiki/Bayes_teoremi)]. Erişim Tarihi: 07.04.2017
- BELL C, KYRIAKIDES A (2002). *Salmonella*. *Foodborne Pathogens*. 283-331.
- BIONUMERICS COMPANY (2017). Multilocus sequence typing (MLST) analysis. Erişim Adresi: [<http://www.applied-maths.com/applications/mlst>]. Erişim Tarihi:04/04/2017.
- CAI Y, TAO J, JIAO Y, FEI X, ZHOU L, WANG Y, ZHENG H, PAN Z, JIAO X (2016). Phenotypic characteristics and genotypic correlation between *Salmonella* isolates from a slaughterhouse and retail markets in Yangzhou, China. *International Journal of Food Microbiology*, **222**: 56-64.
- CARATTOLİ A, FİLETİCİ E, VİLLA L, DİONİSİ AM, RİCCİ A, LUZZİ I (2002). Antibiotic Resistance Genes and *Salmonella* Genomic Island 1 in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolated in Italy *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2821-2828.

- CHERAGHCHI N, KHAKI P, BIDHENDI SM, SABOKBAR A (2014). Identification of isolated *Salmonella enterica* serotype gallinarum biotype Pullorum and Gallinarum by PCR-RFLP. *Jundishapur J Microbiol*, **7**: 1-2.
- CHESSA D, DORSEY CW, WINTER M, BAUMLER AJ (2008b). Binding specificity of *Salmonella* plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics. *J Biol Chem*, **283**: 8118–8124.
- CLARKE SC, SCOTT KJ, MCCHLERY SM (2004). Serotypes and Sequence Types of Pneumococci Causing Invasive Disease in Scotland Prior to the Introduction of Pneumococcal Conjugate Polysaccharide Vaccines. *Journal of Clinical Microbiology*. 4449–4452.
- D'AOUST JY, SEWELL AM, DALEY E, GRECO P (1992). Antibiotic resistance of agricultural and foodborne *Salmonella* isolates in Canada. *J. Food Prot*, **55**: 428-434.
- DAVID M. AANENSEN DM, SPRATT BG (2005). The Multilocus Sequence Typing Network: mlst.net *Nucl Acids Res*, **33**: 772-733.
- DIONE M (2010). Epidemiology of Non-Typhoidal *Salmonella* (Nts) in Humans and Animals in the Gambia and Senegal. *Tropicicultura*, **28**: 253-256.
- DISTANCE METHODS. Erişim Adresi: [\[http://www.life.umd.edu/labs/delwiche/MSyst/lec/Distance1.html\]](http://www.life.umd.edu/labs/delwiche/MSyst/lec/Distance1.html). Erişim tarihi: 04.04.2017.
- DURUL B, ACAR S, BULUT E, KYERE EO, SOYER Y (2015). Subtyping of *Salmonella* food isolates suggests the geographic clustering of serotype Telaviv. *Foodborne Pathogens And Disease*, **12**: 1-4
- EFSA (2012). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on special measures to reduce the risk for consumers through *Salmonella* in table eggs-e.g. cooling of table eggs. *The EFSA J*. **957**: 1-19.
- FEASEY NA, DOUGAN G, KINGSLEY RA, HEYDERMAN RS, GORDON MA (2012). Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet*; **379**: 2489–2499.
- FELSENSTEIN J (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783-791.
- FREEMAN S, HERRON JC (1999). Evrimsel Analiz. Ankara. Palme Yayıncılık. 438-708.
- GHADERI R, TADAYON K, KHAKI P, MOSAVARI N (2015). Iranian clonal population of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, characterized by multi-locus sequence typing (MLST) Method. *IJM*, **7**: 251-259.
- GÜNEL E, KILIC G, BULUT E, DURUL B, ACAR S, ALPAS H, SOYER Y (2015). *Salmonella* surveillance on fresh produce in retail in Turkey. *International Journal of Food Microbiology*. 72-77.
- HAYWARD MR, PETROVSKA L, JANSEN VAA, WOODWARD MJ (2016). Population structure and associated phenotypes of *Salmonella enterica* serovars Derby and Mbandaka overlap with host range. *BMC Microbiology*, **16**: 1-9.

- HO YN, CHOU MY, TSAI HC HUANG TY, FAN CW, HSU BM (2017). Empirical testing of modified *Salmonella* MLST in aquatic environmental samples by in silico analysis. *Science of the Total Environment*. 378–380.
- HOSZOWSKI A, ZAJAC M, LALAK A, PRZEMYK P, WASYL D (2016). Fifteen years of successful spread of *Salmonella enterica* serovar Mbandaka clone ST413 in Poland and its public health consequences. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **23**: 237–241.
- IMPERIAL COLLEGE (2007). Multi Locus Sequence Typing. Erişim Adresi: [<http://www.mlst.net/>]. Erişim Tarihi:05/04/2017.
- INFORMATION RESOURCES MANAGEMENT ASSOCIATION (2012). Data Mining: Concepts, Methodologies, Tools, and Applications: Concepts, Methodologies, Tools, and Applications. 1138.
- ISO 6579 (2002) . General guidance on methods for the detection of *Salmonella*. International organisation for standardization. *4th Ed. Microbiology*.
- ISO 6579 (2012). Microbiology of food and animal feed - horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique (EN ISO/TS 6579-2). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- İZGÜR M (2006). *Salmonella* İnfeksiyonları In: *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*. 116-121
- JIN XIONG (2006). Essential Bioinformatics. 127-169.
- KIDGELL C, REICHARD U, WAIN J , LINZ B, TORPDAHL M, DOUGAN GO, ACHTMAN M (2002). *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infection, Genetics and Evolution*, **2**: 39–40.
- KOTETISHVILI M, STINE O, KREGER A, MORRIS JG, SULAKVELIDZE A (2002). Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *salmonella* strains. *J. Clin. Microbiol*, **40**: 1626-1635.
- KUMAR S, STECHER G, TAMURA K (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **33**: 1870-1874.
- LE MINOR L, POPOFF MY (1987). Designation of *Salmonella enterica* ssp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int. Journal of Syst.Evol.Bacteriol*, **37**: 465-467.
- LI YC, PAN ZM, KANG XL, GENG SZ, LIU ZY, CAI YQ, JIAO XA ( 2014). Prevalence, Characteristics, and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella* in Retail Pork in Jiangsu Province, Eastern China. *Journal of Food Protection*, **77**: 236–245.
- LIU F. *et al* (2011). Novel virulence gene and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) Multilocus Sequence Typing scheme for subtyping of the

- major serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Appl. Environ. Microbiol*, **77**: 1946–1947.
- LUBLIN A, MALER I, MECHANI S, PINTO R, SALDINGER SS (2015). Survival of *Salmonella enterica* serovar Infantis on and within stored table eggs. *J. Food Prot.*, **78**: 287-292.
- MAIDEN MCJ, BYGRAVES A, FEIL E, MORELLI G, RUSSELL JE, URWIN R, ZHANG Q, ZHOU J, ZURTH K, CAUGANT DA, FEAVERS IM, ACHTMAN M, SPRATT BG (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**: 3140–3145.
- MEYER TF, ACHTMAN M, STEINHOFF U (2008). Multilocus Sequence typing analyses of *Salmonella enterica* subspecies *enterica*: population structure, asymptomatic carriage and host association. 1-50.
- MILLER T, PRAGER R, RABSCH W, FEHLHABER K, VOSS M (2010). Epidemiological relationship between *Salmonella* Infantis isolates of human and broiler origin. *Lohmann Information*, **45**: 27.
- MOUNT DW (2017). Bioinformatics Sequence and Genome Analysis. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 52-137.
- MULTILOCUS SEQUENCE TYPING . Erişim Adresi:  
[[https://en.wikipedia.org/wiki/Multilocus\\_sequence\\_typing#MLST\\_databases](https://en.wikipedia.org/wiki/Multilocus_sequence_typing#MLST_databases)]. Erişim Tarihi: 04/04/2017.
- NODA T, MURAKAMI K, ASAI T, ETOH Y, ISHIIHARA T, KUROKI T, HORIKAWA K, FUJIMOTO S (2011). Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis strains in Japan between 1973 and 2004. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **53**: 1.
- NUESCH IM, CERNELA N, ALTHAUS D, HACHLER H, STEPHAN R (2015). *Salmonella Enterica* serovar Szentés, a rare serotype causing a 9-month outbreak in 2013 and 2014 in Switzerland. *Foodborne Pathogens And Disease*, **12**: 889.
- PATRICK AD, GRIMONT & FRANÇOIS X (2007). Weill Antigenic formulae of b the *Salmonella* serovars. WHO Institut Pasteur. 6-24.
- POPOFF MY, BOCKEMUHL J, BRENNER FW (1998). Supplement 1997 (no.41) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*, **149**: 601-604.
- RANIERI ML, SHI C, SWITT MAI, BAKKER HC, WIEDMANN M (2013). Comparison of Typing Methods with a New Procedure Based on Sequence Characterization for *Salmonella* Serovar Prediction. *JCM*, **51**: 1796.
- RANJBAR R, ELHAGHI P, SHOKOOHIZADEH L (2016). Multilocus Sequence Typing of the Clinical Isolates of *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium in Tehran Hospitals. *IJMS*. 1-6.
- RAPPUOLI R, BAGNOLU F (2011). Vaccine Design: Innovative Approaches and Novel Strategies. *Caster Academic Press*. 226-293.

- ROSS IL, HEUZENROEDER MW (2005). Discrimination within phenotypically closely related definitive types of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by the multiple amplification of phage locus typing technique. *J. Clin. Microbiol*, **43**: 1604-1611.
- SAITOU N, NEI M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**: 406-425.
- SARIÇAM S, MÜŞTAK HK (2015). Filogenetik ağaçlandırma metotları. *Vet. Mikrobiyol Derg*, **26**: 58-64.
- SHIVAPRASAD HI (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, **19**: 405-424.
- SHOME R, KRITHIGA N, SHANKARANARAYANA PB, JEGADESAN S, UDAYAKUMAR V, SHOME BR, SAIKIA GK, SHARMA NK, CHAUHAN H, CHANDEL BS, JEYAPRAKASH R, RAHMAN H (2016). Genotyping of Indian antigenic, vaccine, and field *Brucella* spp. using multilocus sequence typing. *J. Infect Dev Ctries*. 237-244.
- SONGER JG, POST KW (2005). Hayvan hastalığı etkeni olan bakteriler ve mantarlar. *Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi*. 131-136.
- TAMURA K (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, **9**: 678-687.
- TANKOUO-SANDJONG B, SESSITSCH A, LIEBANA E, KORNSCHÖBER C, ALLERBERGER F, HÄCHLER H, BODROSSY L (2007). MLST-v, Multilocus Sequence Typing based on virulence genes, for molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars. *Journal of Microbiological Method*, **69**: 23-25.
- TAYLOR JW, FISHER MC (2003). Fungal Multilocus Sequence Typing-it's not just For bacteria. *Current Opinion in Microbiol*, **6**: 351-356.
- TEPLITSKI M, AHMER BM (2004). The control of secondary metabolism, motility, and virulence by the two-component regulatory system Bara/Sira of *Salmonella* and other C-Roteobacteria. *In Global Regulatory Networks in Enteric Bacteria*. 107-133.
- TOBOLDT A, TIETZE E, HELMUTH R, JUNKER E, FRUTH A, MALORNY B (2013). Population structure of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:b: strains and likely sources of human infection. *Appl Environ Microbiol*, **79**: 5121-5129.
- TORPDAHL MIA, SKOV MN, SANDVANG D, BAGGESEN DL (2005). Genotypic characterization of *Salmonella* by Multilocus Sequence Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Amplified Fragment Length Polymorphism. *Journal of Microbiological Methods*. 173– 184.
- UNIVERSITY OF OXFORD (2010). Multi Locus Sequence Typing. Erişim Adresi: [<http://pubmlst.org/>]. Erişim Tarihi:05/04/2017.
- WATTIAU P, BOLAND C, BERTRAND S (2011). Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Appl Environ Microbiol*. 7881-7882.



XU Y, ZHANG J, CUI S, LI M, ZHANG Y, XUE H, XIN X, WANG J (2015). Genetic stability of vaccine strains by Multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis analysis: Implications for qualitycontrol of the leptospiral vaccine. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, **11**: 1272-1276.



## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

**Adı:** Seyyide  
**Soyadı:** SARIÇAM  
**Doğum yeri ve tarihi:** Çamlıdere, 03/10/1992  
**Uyruğu:** TC  
**Medeni durumu:** Bekar  
**E-mail adresi:** S.SARICAM-92@hotmail.com  
**Telefon:** 05433916787

### II- Eğitimi

2010-2014 Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü  
2006- 2010 Milli Eğitim Bakanı Ali Naili Erdem Anadolu Lisesi  
2006-2002 Satuk Buğra İlköğretim Okulu  
2002-1998 Atatürk İlköğretim Okulu

Yabancı dili: İngilizce

### III- Ünvanları

Moleküler Biyolog

### IV- Mesleki Deneyimi

09/2014 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji A.B.D.  
TÜBİTAK Proje Bursiyeri  
07/2013 T.C. Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesi  
Stajyer

## V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneği

## VI- Bilimsel Etkinlikleri

### V.I.I- Projeler

Kanatlı Hayvanlardan ve Gıdalardan Salmonella İzlenmesi Ve Kontrol Programları Geliştirilmesi. TÜBİTAK 1003 Öncelikli Alanlar Ar-Ge Destekleme Projesi. Araştırmacı.

Kanatlı Kökenli Salmonella Infantis Suşlarının MLST ile Filogenetik Analizi. Bilimsel Araştırma Projesi. Araştırmacı.

Kanatlıların Salmonella İnfeksiyonunu Engelleyen Bağırsak Mikrobiyomunun Metagenomik Analiz İle Belirlenmesi: Antibiyotiklere Alternatif Bir Yaklaşım. TAGEM Ar-Ge Projesi. Araştırmacı.

### V.I.II- Yayınlar

SARIÇAM S, MÜŞTAK HK. Filogenetik Ağaçlandırma Metotları ( 2015). *Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 26/2: 58-64.

### V.I.III- Poster Sunum

AKDOĞAN KF, KAYA I, HASCELİK AG, SARIÇAM S, GÜRLER N, DIKER K (2017). Erythromycin Resistant Streptococcus pneumoniae: Phenotypes, Genotypes, Transposons and Coverage Rates for Pneumococcal Vaccines. ASM Microbe. New Orleans.

KAYA İ, SARIÇAM S, ÖZEN D, DIKER K (2016). Bazı *Salmonella* Serotiplerinin Üremesi Üzerine Farklı Sıcaklık Değerlerinin Etkisi. XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi. Nevşehir.

SARIÇAM S, KAYA İ, MÜŞTAK HK (2016). Fungal Teşhiste rDNA ITS1 VE ITS2 Bölgeleri Dizi Analizinin Kullanılması. XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi. Nevşehir.

#### **V.I.IV- Seminer**

Önemli Kanatlı Hastalıkları: Epidemiyoloji ve Kontrol-2 (2017)

XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (2016)

Therapeutic Peptides and Antibodies: Design & Manufacturing Workshop (2016)

II. Kök Hücre Sempozyumu (2011)

Moleküler Biyoteknoloji Okulu (2011)

ISO 9001 (2010)