

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DEĞİŞKEN ALAN JEL ELEKTROFOREZİ YÖNTEMİ İLE
Salmonella SEROTİPLERİNİN TANISI**

Ahmet Caner SÖNMEZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2013**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DEĞİŞKEN ALAN JEL ELEKTROFOREZİ YÖNTEMİ İLE *Salmonella* SEROTİPLERİNİN TANISI

Ahmet Caner SÖNMEZ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu çalışmada Türkiye’den izole edilen ve tanımlanan *Salmonella* serotiplerinde, genetik farklılığın analizinde değişken alan jel elektroforezi (PFGE) yönteminin ülkemiz şartlarındaki kullanım olanakları araştırılmıştır. DNA’ları XbaI Fastdigest restriksiyon endonükleazı ile kesilerek PFGE analizi gerçekleştirilen 98 adet DMC kodlu *Salmonella* serotipi, evrensel standart suş *S. Braenderup* H9812 baz alınarak 36 farklı PFGE profil grubuna ayrılmıştır. Her profil grubu kendi içerisinde ve diğer profillerle karşılaştırılarak benzerlik (similarity) matrisleri oluşturulmuştur. Buna göre tüm suşların PFGE profillerinin birbirleriyle en az % 12,6 en fazla % 96,5 oranında benzerlik taşıdıkları tespit edildi. Profillerin filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi için NTSYS pc. ver. 2.2 paket programı ile kümelenme (Cluster) analizi yapılmış ve UPGMA (Unweighted pair group with mathematical averaging) dendogramı çizilmiştir. Elde edilen dendogram ile 98 adet suşun % 75,5’lik kısmı A kolunda; % 24,5’lik kısmı ise B kolunda olmak üzere 2 ana kolda gruplandırılmıştır. *S. Bispebjerg* suşunun A kolunda diğer suşlardan ayrı olarak tek dalda yer aldığı görülmüş ve çalışmamızda genotipik açıdan en az benzerliğe sahip suş olarak değerlendirilmiştir. En yüksek profil çeşitliliği *S. Montevideo* serotipinde (% 100) belirlenmiş; *S. subsp. I Roughform* serotipi *S. Enteritidis* ile; *S. Group C1* serotipi *S. Thompson* ile yüksek oranda benzerlikler göstermiştir. Bu çalışma ile laboratuvarımızdaki DMC kodlu *Salmonella* suşları koleksiyonumuzda serotipi belirlenmemiş bulunan DMC 21 kodlu suş *S. Infantis* profiline (INF 2) sahip bulunmuştur. Ayrıca tiplendirme metotlarının ayırım gücünün tespitinde kullanılan Simpson nümerik ayırmalandırma indeksi, çalışmamız için % 95,6 olarak hesaplanmıştır. *S. Corvallis*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Group C1*, *S. Thompson* ve *S. Virchow* suşlarının oluşturdukları PFGE profil gruplarının kendi içlerinde birbirlerine çok yakın oldukları (sırasıyla; % 93,3; % 89,6; % 97,4; % 96,1; % 96,1 ve % 94,1) tespit edilmiştir.

Haziran 2013, 78 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Salmonella*, Değişken Alan Jel Elektroforezi, Tanı.

ABSTRACT

Master Thesis

IDENTIFICATION OF *Salmonella* SEROTYPES BY PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In this study, the capabilities of analyzing genetic differences of isolated and identified *Salmonella* serotypes originated from Türkiye by using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) method, was investigated. All 98 *Salmonella* strains' DNA were digested by XbaI Fastdigest restriction endonuclease and determined as of 36 different PFGE profile groups via using the universal size standard strain *Salmonella* Braenderup H9812. Similarity matrices were constituted by comparing every profile group within and between all the other groups. Accordingly, a minimum of 12,6 % and a maximum of 96,5 % similarity ratios were found among all the profile groups. In order to determine phylogenetic relationships of the profiles, cluster analysis and UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) dendrogram was constructed via using NTYSY pc. ver. 2.2 software. With the constructed dendrogram, a two-main branched tree was shown and 75,5 % part of all the 98 strains were collected on A side of the branch, while 24,5 % part of the strains were collected on B side. In our study, *S. Bispebjerg* was considered as the most different strain of all serotypes and it was constituted on a single branch next to the other strains of A side in the phylogenetic tree. The highest profile variability was shown at *S. Montevideo* strain with a 100 % score, and the highest similarity showing strains were *S. subsp. I* Roughform and *S. Enteritidis*, *S. Group C1* and *S. Thompson*. In this study, DMC 21 coded strain of our laboratory collection, which its serotype name was not known, has been identified as *S. Infantis* (INF 2) serotype. Simpson's numerical index of discrimination; a calculation method which is used to determine the power of subtyping methods, was also applied for our study and resulted in 95,6 %. In addition, it was shown that *S. Corvallis*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Group C1*, *S. Thompson* and *S. Virchow* strains had the highest similarity ratios within their profile group members; the ratios were found such as; 93,3 %; 89,6 %; 97,4 %; 96,1 %; 96,1 %; and 94,1 %, respectively.

June 2013, 78 pages

Key Words: *Salmonella*, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Identification.

TEŞEKKÜR

Çalışma konusu ve seçiminde, çalışmanın gidişatında ve değerlendirilmesinde yardımları ve eleştirileri ile bana yol gösteren, çeşitli zorluklar karşısında yılmamamı sağlayan ve bilgilerini, tecrübelerini benimle koşulsuzca paylaşan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) ve çalışmam süresince yardımını ve güler yüzünü esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e teşekkür ederim.

Tezimin deneysel kısımlarında, yapabileceklerinin en iyisini yaparak, içlerinden gelen büyük bir özveriyle bana yardımcı olan başta Uzman Biyolog Özlem GÜNAY EŞİYOK ve Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı'na geldiğim ilk günden bu yana tanıdığım tüm çalışma arkadaşlarıma; ayrıca Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda çalıştığım dönem içerisinde tanıma şansına eriştiğim değerli arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Çalışma sürecim boyunca gösterdikleri büyük sabır ve her şarttaki fedakârlıklarından dolayı canım aileme ve her an yanımda olan, bütün enerjisiyle, sevgisiyle beni destekleyen ve azimlendiren hayat arkadaşım Alev ARSLAN'a varlıkları için teşekkür ederim.

Ahmet Caner SÖNMEZ

Ankara, Haziran 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 <i>Salmonella</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	4
2.2 <i>Salmonella</i> Cinsinin Taksonomisi.....	5
2.3 <i>Salmonella</i> 'nın Dünya Genelindeki Dağılımı ve Epidemiyolojisi.....	6
2.4 <i>Salmonella</i> Üzerine Türkiye’de Yapılan Epidemiyolojik Çalışmalar.....	14
2.5 Bakteriyel Tanımlamada Kullanılan Yöntemler.....	14
2.5.1 Fenotipik yöntemler.....	16
2.5.2 Genotipik ve moleküler yöntemler.....	17
2.6 Değişken Alan Jel Elektroforezi (PFGE).....	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1 Materyal.....	29
3.1.1 Mikroorganizmalar.....	29
3.1.2 Mikroorganizmaların saklanma koşulları.....	29
3.1.3 Besiyerleri.....	29
3.1.4 Çözeltiler.....	30
3.2 Yöntem.....	32
3.2.1 Suşların hazırlanması.....	32
3.2.2 Suşların agaroz tapalar içerisine gömülmesi.....	33
3.2.3 Tapalara gömülen hücrelerin lizisi.....	33
3.2.4 Saf DNA eldesi için agaroz tapaların yıkanması.....	34
3.2.5 Tapalara XbaI restriksiyon endonükleaz kesimi uygulanması.....	34
3.2.6 CHEF DR-III cihazında <i>Salmonella</i> 'ya özgü jel yükleme koşulları.....	36

3.2.7 PFGE jel görüntülerinin alınması.....	37
3.2.8 Simpson nümerik ayımlandırma indeksi.....	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	39
4.1 Elde edilen PFGE Profillerinin Karşılaştırılması ve Filogenetik Analizi.....	39
5. SONUÇ.....	57
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	78

KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
NTS	Non-Tifoidal <i>Salmonella</i>
PFGE	Değişken Alan Jel Elektroforezi
S.	<i>Salmonella</i>
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
TE	Tris-EDTA
L/P	Liziz-Proteinaz K
HST	Hücre Süspansiyon Tamponu
TBE	Tris Borik asit EDTA
g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
L	Litre
s	Saniye
sa	Saat
Mb	Megabaz
kb	Kilobaz
RT-PZR	Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
VNTR	Çeşitli Sayıda Ardarda Tekrarlayan Bölgeler
MLST	Çoklu Lokus Sekans Tiplendirmesi
AFLP	Çoğaltılmış Fragment Uzunluğu Polimorfizmi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	<i>Salmonella</i> 'nın peritriş flagella yapısını gösteren elektron mikrografı.....	5
Şekil 2.2	Halk sağlığının korunması için takip mekanizmasının risk tespiti, risk yönetimi ve araştırma giderlerinin ele alınması sürecindeki yerini belirten döngü.....	7
Şekil 2.3	EQAS değerlendirmesine katılan ülkelerin dünya üzerindeki dağılımı.....	10
Şekil 2.4	En yaygın serotipler olan <i>S. Enteritidis</i> ile <i>S. Typhimurium</i> 'un yıllara bağlı olarak toplam 37 ülkedeki genel yüzdesi.....	12
Şekil 2.5	Seçilmiş olan 37 ülkedeki diğer <i>Salmonella</i> serotiplerinin genel yüzdelерinin zaman içindeki değişimleri.....	13
Şekil 2.6	<i>Salmonella</i> 'nın tiplendirilmesinde kullanılan yöntemlerin evrimi.....	18
Şekil 2.7	Genetik olayların PFGE bant profillerinde ifadenmesi.....	27
Şekil 3.1	Simpson nümerik ayırmalandırma indeksinin formülasyonu.....	38
Şekil 4.1	<i>Salmonella</i> Agona serotipinin PFGE bant profilleri.....	42
Şekil 4.2	<i>Salmonella</i> Anatum serotipinin PFGE bant profilleri.....	43
Şekil 4.3	<i>Salmonella</i> Bispebjerg serotipinin PFGE bant profili.....	43
Şekil 4.4	<i>Salmonella</i> Braenderup serotipinin PFGE bant profilleri.....	44
Şekil 4.5	<i>Salmonella</i> Corvallis serotipinin PFGE bant profilleri.....	44
Şekil 4.6	<i>Salmonella</i> Enteritidis serotipinin PFGE bant profilleri.....	45
Şekil 4.7	<i>Salmonella</i> Group C1 serotipinin PFGE bant profilleri.....	46
Şekil 4.8	<i>Salmonella</i> Infantis serotipinin PFGE bant profilleri.....	47
Şekil 4.9	<i>Salmonella</i> Kentucky serotipinin PFGE bant profilleri.....	47
Şekil 4.10	<i>Salmonella</i> Montevideo serotipinin PFGE bant profilleri.....	48
Şekil 4.11	<i>Salmonella</i> Nchanga serotipinin PFGE bant profilleri.....	49
Şekil 4.12	<i>Salmonella</i> subsp. I Roughform serotipinin PFGE bant profilleri.....	49
Şekil 4.13	<i>Salmonella</i> Salford serotipinin PFGE bant profili.....	50
Şekil 4.14	<i>Salmonella</i> Senftenberg serotipinin PFGE bant profili.....	51

Şekil 4.15 <i>Salmonella</i> Telaviv serotipinin PFGE bant profilleri.....	51
Şekil 4.16 <i>Salmonella</i> Thompson serotipinin PFGE bant profilleri.....	52
Şekil 4.17 <i>Salmonella</i> Typhimurium serotipinin PFGE bant profilleri.....	53
Şekil 4.18 <i>Salmonella</i> Virchow serotipinin PFGE bant profilleri.....	53
Şekil 4.19 Türkiye kökenli <i>Salmonella</i> suşlarının XbaI makrorestriksiyon profillerinin PFGE analizi.....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>Salmonella enterica</i> alttürlerinin şematik gösterimi.....	6
Çizelge 2.2 Dünya çapında <i>Salmonella</i> serotiplendirilmesine katılan ülkeler.....	8
Çizelge 4.1 Serotiplerin oluşturduğu PFGE profil grupları.....	39

1. GİRİŞ

Altıplendime, bakterilerin tür ve alttür seviyesindeki özelliklerinin belirlenmesi ve tanımlanmalarını esas alır. Bu tanımlama, fenotipik ve genotipik yöntemlerle yapılabilir. Altıplendirme işlemi, taksonomik amaçlar için, bir türün populasyon yapısının çalışılması için, hedef organizmanın diğer organizmalarla ilişkisinin belirlenmesi yolundaki filogenetik analizler için, hedef organizmanın evrimsel süreçlerini betimlemek için veya moleküler epidemiyolojik çalışmalar için yapılabilir (Barrett vd. 2006).

Suş tanımlaması ve bakteriyel taksonomik sınıflandırma tarihsel açıdan bakıldığında, fenotipik analiz yöntemleri olan biyotiplendirme, antimikrobiyal duyarlılık testleri, serotiplendirme, bakteriyofaj tiplendirme, multilokus enzim elektroforezi gibi yöntemlerle yapılagelmiştir (Holt 1994, Tenover vd. 1997, Soll vd. 2007).

Levin ve çalışma arkadaşları (1999) moleküler epidemiyolojiyi; enfeksiyon hastalıklarından sorumlu mikroparazitlerin belirlenmesi ve bunların fiziksel kaynaklarının, biyolojik ilişkilerinin ve aktarılış yollarının anlaşılması; ayrıca virülans etkilerinden sorumlu genlerin, aşıyla bağlantılı antijenlerin ve ilaç dirençliliklerinin tespit edilmesi olarak tanımlamaktadır.

Bulaşıcı hastalık salgını, bir patojenin sebep olduğu, zamansal ve coğrafik açıdan belirgin, tekrarlayan hastalıklar kümesi olarak tanımlanır. Hastalığın, belirli bir zaman aralığında ve yerde beklenenden fazla gerçekleşmesi salgının önemli bir belirtisidir (Barrett vd. 2006).

Salmonella cinsinin üyeleri geniş ve evrimsel açıdan yüksek ilişkileri olan zoonotik patojenler grubunu içerir. Bu cinsin üyeleri, insanlar ve evcil hayvanlar da dahil olmak üzere memelileri, kuşları, sürüngenleri ve amfibileri enfekte eder (Yue vd. 2012). Hastalık Kontrol Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention, CDC)'nin en son raporlarına göre, bütün gıda kaynaklı bakteriyel patojenler içerisindeki genel sıralamada en yaygın ikinci cins olup, salgınların % 23'ünü, hastalıkların % 31'ini ve hastaneye kaldırılma vakalarının % 62'sini *Salmonella* vakaları kapsamaktadır (Painter

vd. 2009, Zou vd. 2012). *Salmonella* cinsinin non-tifoidal türleri dünya genelinde yaklaşık olarak 1.3 milyar gıda kökenli diyareli gastroenterit vakası ile 3 milyon ölüme yol açmaktadır (Pang vd. 1995). *Salmonella* salgınlarının epidemiyolojik olarak verimli bir şekilde araştırılması için serotip tanısını içeren detaylı suş tanımlamaları kritik önem taşımaktadır (Liebana vd. 2001). Salgın vakalarının birbirleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi, salgın kaynağının takibi açısından büyük önem arz etmektedir (Tenover vd. 1995).

Değişken alan jel elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) yöntemi *Salmonella* 'ya 1990'larda uyarlanmış bir moleküler tiplendirme metodudur (Olsen vd. 1994, Weide-Botjes vd. 1998, Garaizar vd. 2000, Murase vd. 2004). Yöntem, salgın durumlarında suşların parmakizi analizinde kullanışlı olmakta ve uygulaması görece daha az maliyetle gerçekleştirilmektedir. Salgınlara kökeninin belirlenmesindeki başarısından dolayı oldukça yaygın kullanım alanına sahip bir yöntem bir haline gelmiştir (Wattiau vd. 2011) Çok sayıda raporda PFGE yönteminin, farklı serovaryetelerdeki *Salmonella* enfeksiyonlarının takibinde yüksek oranda belirleyici olduğu ifade edilmiştir (Threlfall vd. 1999a, Sivapalasingam vd. 2003, Dionisi vd. 2006, Best vd. 2009).

Çok sayıda çalışmada gösterildiği üzere, özellikle PFGE gibi epidemiyolojik tiplendirmeye ilişkin elektroforez bazlı yöntemlerin laboratuvarlar arasındaki eşgüdümü zorluk yaratabilmektedir (Cookson vd. 1996,2007, Van Belkum vd. 1998, Chung vd. 2000, Murchan vd. 2003, Te vd. 2010). Ancak Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Hastalık Kontrol Merkezleri (CDC) PulseNet ve Uluslararası PulseNet laboratuvarlar konsorsiyumu tarafından, PFGE'nin eşgüdümü ve tekrar edilebilirliği hedefinin kesinlikle gerçekleştirileceği açıklanmış (Swaminathan vd. 2001, 2006, Graves ve Swaminathan 2001, Ribot vd 2006, Cooper vd. 2006, Martin vd. 2006, Gerner-Smidt ve Scheutz 2006, Kam vd. 2008, Halpin vd. 2009) ve PulseNet, elde edilen PFGE paternlerinin yüksek oranda standardize edilmiş protokoller ve bilgisayar destekli yöntemlerle giderek geliştirildiğini ve sonuç olarak da laboratuvarlar arasında çok yüksek seviyede tekrar edilebilirlik seviyesinin arttığını belirtmiştir (Swaminathan vd. 2001).

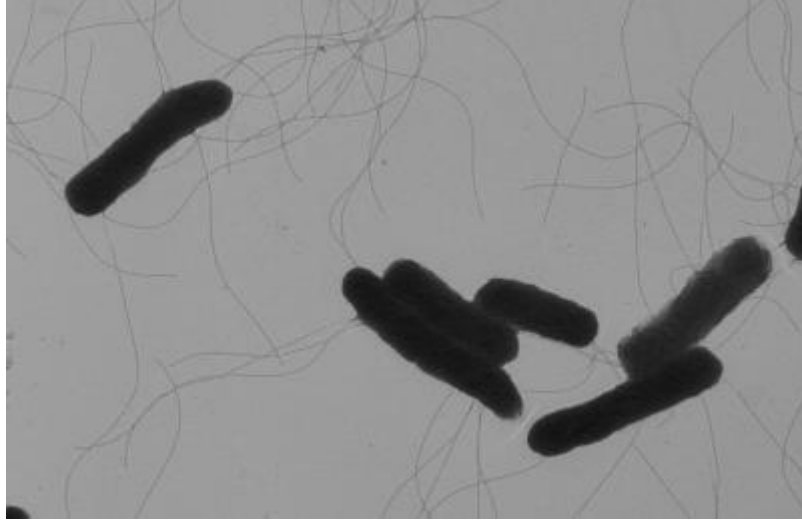
DNA temelli ayırlandırma yöntemi PFGE ile yapılan makrorestriksiyon analizi, geniş uygulanabilirliği ve epidemiyolojik olarak birbiri ile uyumlu sonuçlar vermesi sayesinde bakteriyel patojenlerin tanımlanmasında özellikle son on yılda altın standart haline gelmiştir (Barrett vd. 2006).

Bu çalışmada, *Salmonella* serotiplerinin hızlı tanısının ülkemiz koşullarında gerçekleştirilmesi için değişken alan jel elektroforezinin kullanım ve standardizasyon olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 *Salmonella* Cinsinin Genel Özellikleri

Salmonella ailesi; fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen, gram negatif, oksidaz negatif, çomak biçiminde ve peritriş flagellaya sahip çoğunlukla hareketli bakterileri içermektedir (Şekil 2.1) (Bell ve Kyriakides 2002, Molbak vd. 2006). *Salmonella* yaklaşık olarak 0.7 ile 1.5 µm genişlikte, 2.0 ile 5.0 µm uzunluktadır (Gianella 1996). İnsan, hayvan ve hatta böceklerin gastrointestinal sistemleri gibi doğal ortamlarında ve enfekte edebilecekleri ya da kolonize olabilecekleri her yerde bulunabilirler. Bu organizmalar insanların ve hayvanların gastrointestinal yollarında kommensal olarak kalabilir ya da diyareden enterik ateşli bakteremiye, damarlarda, kemiklerde ve yerleştikleri diğer bölgelerde işgale sebep olabilirler (Winokur 2003, Husnik vd. 2011). Salmonelloz dünyada en sık rastlanılan gıda kaynaklı hastalık olmaya devam etmektedir. Yumurta, tavuk eti, domuz eti, biftek gibi hayvansal gıdalar ve bunların yan ürünleri, *Salmonella*'nın insanlara birincil geçiş yollarıdır (Rabsch vd. 2005). Değişen gıda üretim biçimleri, alanları ve global gıda ticareti, *Salmonella* enfeksiyonları için yeni geçiş yolları oluşturmuş; son zamanlarda Brüksel lahanası, baharatlar (özellikle toz biber) ve çikolatadan bile *Salmonella* izole edilmiştir (Awang vd. 2003, Werber vd. 2005). Non-tifoidal *S. enterica* (NTS) dünya genelinde halk sağlığına karşı önemli bir tehdit oluşturan gıda kaynaklı salgın enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Rabsch vd. 2001, Pegues vd. 2005). Yaklaşık olarak 200 serotip insanları enfekte etmektedir, fakat özellikle birkaçının çok büyük önemde olduğu düşünülmektedir. Çoğu gelişmiş ülkede, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*, NTS enfeksiyonlarının büyük bir çoğunluğundan sorumludur (Tauxe 1999).



Şekil 2.1 *Salmonella*’nın peritriş flagella yapısını gösteren elektron mikrografı (Sangwei Lu, UC Berkeley. www.eurekalert.org, 2012)

2.2 *Salmonella* Cinsinin Taksonomisi

Salmonella cinsi Proteobacteria şubesinin, Gama Proteobacteria sınıfı, *Enteriobacteriales* takımındaki *Enterobacteriaceae* ailesine aittir (Guthrie 1991). *Salmonella*, *enterica* ve *bongori* olmak üzere iki tür içermektedir. *S. enterica* türü taksonomik isimlendirmesi yapılmış altı farklı alttüre ayrılır (Çizelge 2.1). IIIa ve IIIb alttürleri ilk başlarda *Arizonae* olarak ayrı bir tür şeklinde düşünülmüştür. Bazı araştırmacılar halen bu sınıflandırmayı kullanmaktadır. *S. bongori* ise önceleri *S. enterica* subspecies V olarak belirtilmiş fakat daha sonra *Salmonella*’nın ayrı bir türü olduğu anlaşılmıştır. Yine de basitliği ve uygunluğu göz önünde bulundurularak bu suşlar halen “alttür V” olarak anılmaktadır (Anonymous, 2011)

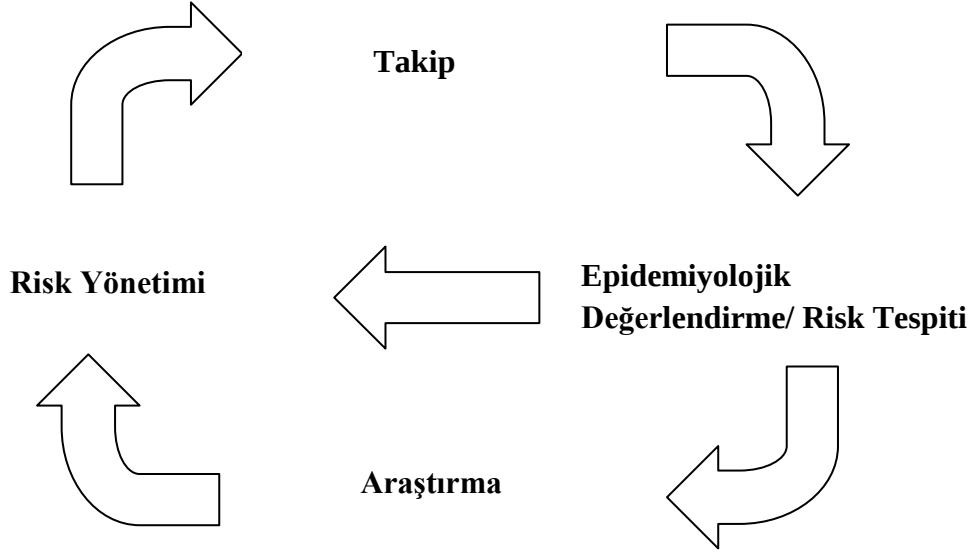
Yaklaşık olarak 2500’ün üzerinde *Salmonella* serotipi bulunmaktadır ve bunların %60’ı alttür I’e aittir. Bu alttür, insanlardaki *Salmonella*’ya bağlı hastalıkların % 99’unun kaynağını teşkil ederler (Anonymous,2009) Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO), Pasteur Enstitüsü’ndeki *Salmonella* Araştırmaları ve Referans Merkezi’nde 2501 adet *Salmonella* serotipinin bulunduğu bir liste oluşturulmuş ve her yıl bu liste geliştirilmiştir (Brenner vd. 2000)

Çizelge 2.1 *Salmonella enterica* alttürlerinin şematik gösterimi (Anonymous 2011)

<i>Salmonella enterica</i> alttürleri	
I	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>
II	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i>
IIIa	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
IIIb	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>
IV	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>
VI	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>indica</i>

2.3 *Salmonella*'nın Dünya Genelindeki Dağılımı ve Epidemiyolojisi

Salmonella serotiplendirmesi, salgınların tespiti, zamana bağlı değişikliklerin hesaplanması ve insanlara hastalık geçişindeki çeşitli yiyecek ve hayvan kaynaklarına ulaşmada halen en yaygın kullanılan yöntemdir. Buna rağmen, *Salmonella* serovarlarının dünya üzerindeki dağılımına dair kısıtlı bilgi bulunmaktadır. Son on yılda bazı ülkeler, insanlarda *Salmonella* serotiplerinin dağılımına yönelik yıllık vaka bilgisi toplamaya başlamış fakat insan enfeksiyonlarından sorumlu serotiplerin dünyadaki dağılımını inceleyen çok az sayıda yayın yapılmıştır (Herikstad vd. 2002, Galanis vd. 2006). Salgın takibi için önemli diğer nitelikler, güvenilir bilginin garantilenmesi için gerekli olan kalite kontrolü ve kalite güvencesidir (Şekil 2.2). Dünya genelindeki ulusal referans laboratuvarları tarafından yürütülen serotiplendirme çalışmalarının kalitesini değerlendirecek çok az sayıda uluslararası güvence kuruluşu bulunmaktadır (Petersen vd. 2002, Anonymous 2007).



Şekil 2.2 Halk sağlığının korunması için takip mekanizmasının risk tespiti, risk yönetimi ve araştırma giderlerinin ele alınması sürecindeki yerini belirten döngü (Lo Fo Wong vd. 2004)

Ocak 2000’de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bünyesinde, Küresel Gıda Kaynaklı Enfeksiyonlar Ağı (Global Foodborne Infections Network, GFN) adıyla *Salmonella* enfeksiyonu ve diğer gıda kökenli patojen enfeksiyonlarının takibini güçlendirmek, korunma ve kontrol mekanizmalarını harekete geçirmek için küresel bir girişim başlatılmıştır. *Salmonella*’nın dünya genelinde serotiplendirilmesi çalışmalarının hızlandırılması WHO GFN girişiminin ana hedeflerinden birisidir. Bu oluşuma katılan laboratuvarların verimliliklerini değerlendirmek ve bu sayede, laboratuvara dayalı takip sistemlerini güçlendirip desteklemek amacıyla da 2000 yılından bu yana WHO GFN çatısı altında Dış Kalite Güvence Sistemi (External Quality Assurance System, EQAS) bölümü kurulmuştur (Petersen vd. 2002). Her yıl EQAS tarafından ilgili laboratuvarlara tanımlanması, serotiplendirilmesi ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılması için şahit bakteriyel kültürler gönderilmektedir. Bu program içerisinde büyük önem taşıyan internet tabanlı Ülke Veri Bankası (Country Data Bank, CDB) oluşumu dahilinde üye ülkelerden bankaya her yıl en yaygın görülen 15 *Salmonella* serotipi verilerinin bildirmeleri istenmektedir (<http://www.antimicrobialresistance.dk>, 2012). 2000 yılı ile 2007 yılı arasındaki EQAS verilerinin sonuçlarına göre 96 ülkeden 249 laboratuvar yıllık EQAS testine en az bir defa katılmıştır. (Çizelge 2.2, Şekil 2.3)

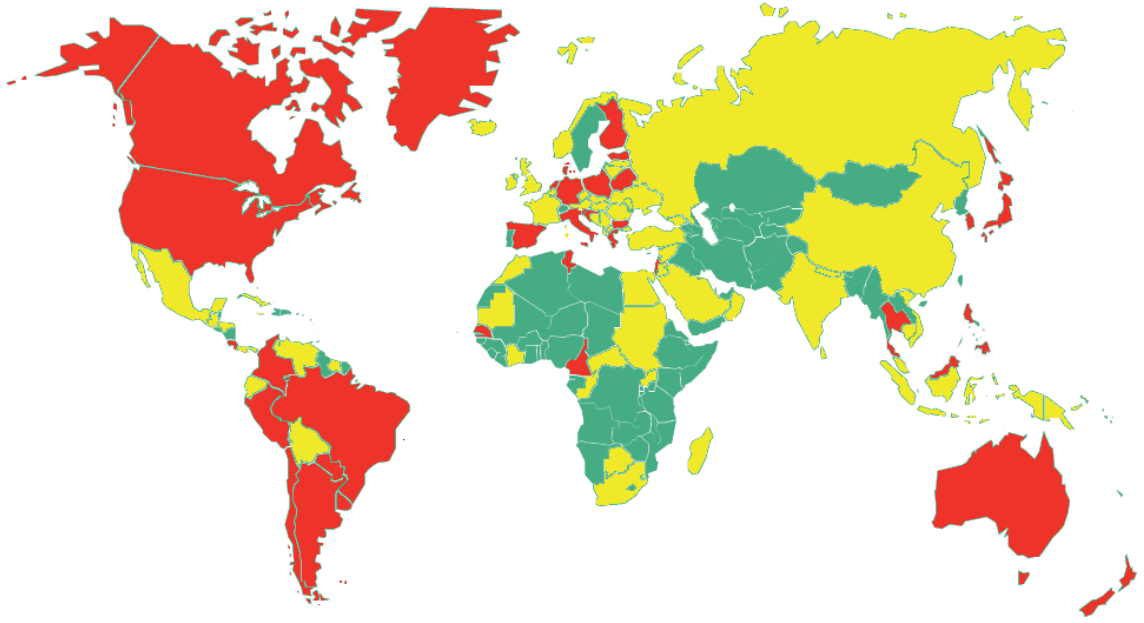
Çizelge 2.2 Dünya çapında *Salmonella* serotiplendirilmesine katılan ülkeler^a

Bölge	Yıl	Laboratuar Sayısı	Serotiplenen Suş Sayısı	Doğru Serotiplenen Suş Yüzdesi	Programa Katılan Ülkeler
Afrika	2001	6	37	73.0	Botsvana, Kamerun,
	2002	9	62	87.1	Orta Afrika Cum.
	2003	11	70	71.4	Kongo Dem. Cum.
	2004	9	51	62.7	Fil Dişi Sahilleri, Mauritanya,
	2006	16	95	71.6	Madagaskar, Mauritius,
	2007	11	73	80.8	Fas, Senegal, Güney Afrika, Sudan, Tunus, Uganda.
Asya/ Orta Doğu	2001	10	60	50.0	Mısır, Hindistan, İsrail, Ürdün,
	2002	5	30	83.3	Kuveyt, Lübnan, Umman,
	2003	5	35	54.3	Suudi Arabistan, Suriye.
	2004	5	33	54.5	
	2006	5	35	74.3	
	2007	5	40	55.0	
Karayipler	2001	0	0	0	Barbados, Guatemala, Honduras
	2002	0	0	0	Jamaika, Surinam,
	2003	3	18	61.1	Trinidad/Tobago
	2004	2	8	87.5	
	2006	3	14	78.6	
	2007	2	9	77.8	
Çin	2001	4	32	96.9	Çin
	2002	3	24	100.0	
	2003	8	60	75.0	
	2004	7	46	78.3	
	2006	6	48	85.4	
	2007	10	80	91.3	
Avrupa	2001	43	323	80.5	Arnavutluk, Bosna Herzek,
	2002	50	384	90.0	Bulgaristan, Hırvatistan,
	2003	60	401	84.8	Kıbrıs, Çek Cum., Danimarka,
	2004	57	392	84.7	Estonya, Finlandiya, Fransa, Almanya,
	2006	52	403	86.4	Yunanistan, Macaristan, İzlanda
	2007	54	415	89.4	İrlanda, İtalya, Litvanya, Letonya, Lüksemburg, Makedonya, Malta, Moldova, Hollanda, Norveç, Polonya, Romanya, Sırbistan Karadağ, Slovakya, Slovenya, İspanya, Türkiye, Birleşik Krallık.
Kuzey Amerika	2001	4	32	87.5	
	2002	2	16	100.0	
	2003	6	41	95.1	Kanada, Birleşmiş Milletler
	2004	8	55	81.8	
	2006	10	80	96.3	
	2007	12	94	97.9	
	2007	4	32	100.0	

Çizelge 2.2 Dünya çapında *Salmonella* serotiplendirilmesine katılan ülkeler^a (devam)

Bölge	Yıl	Laboratuvar Sayısı	Serotiplenen Suş Sayısı	Doğru Serotiplenen Suş Yüzdesi	Programa Katılan Ülkeler
Okyanusya	2001	4	30	100.0	Avustralya, Yeni Kaledonya, Yeni Zelanda, Papua Yeni Gine
	2002	6	43	93.0	
	2003	6	46	93.5	
	2004	5	38	97.4	
	2006	5	37	94.6	
Rusya	2001	1	8	12.5	Beyaz Rusya, Gürcistan, Rusya, Ukrayna
	2002	1	8	62.5	
	2003	1	7	14.3	
	2004	4	26	69.2	
	2006	5	40	80.0	
	2007	8	51	80.4	
Latin Amerika	2001	11	78	57.7	Arjantin, Bolivya, Brezilya, Şili, Kolombiya, Kosta Rika, Küba, Ekvador, Meksika, Panama, Paraguay, Peru, Uruguay, Venezüella
	2002	11	82	87.8	
	2003	13	83	75.9	
	2004	15	88	79.5	
	2006	13	84	84.5	
	2007	15	107	88.8	
Güneydoğu Asya	2001	15	113	54.0	Kamboçya, Endonezya, Japonya, Malezya, Filipinler, Singapur, Güney Kore, Sri Lanka, Tayvan, Tayland, Vietnam
	2002	12	90	92.2	
	2003	15	100	81.0	
	2004	17	130	81.5	
	2006	15	117	84.6	
	2007	19	140	91.4	

^a2000 yılına dair herhangi bir veri yoktur (Hendriksen vd. 2009).



Şekil 2.3 EQAS değerlendirmesine katılan ülkelerin dünya üzerindeki dağılımı

Kırmızı (koyu gri) ve sarı (açık gri) renkteki ülkeler en az bir defa EQAS testine katılmış olan ülkeleri göstermektedir. Kırmızı (koyu gri) renkteki ülkeler EQAS tarafından gerçekleştirilen kalite güvencesi (QA) değerlendirmesinde eşik değerini aşmış ve bir yıldan üç yıla kadar CDB'ye veri aktarımı yapmış ülkelerdir. Yeşil (orta gri) renkteki ülkeler ise herhangi bir programa katılmamıştır

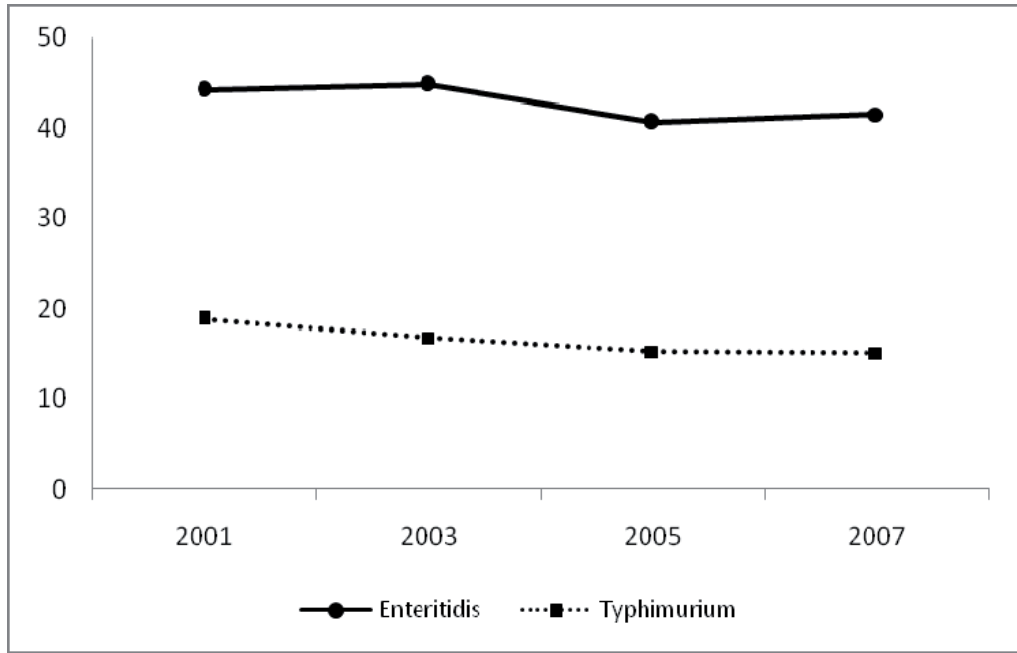
(Herikstad vd. 2002, Petersen vd. 2002, Galanis vd. 2006, Anonymous 2007)

Katılımcı laboratuarlardan, EQAS'ın yedi yıllık değerlendirmesi boyunca; toplam 756 rapor alınmıştır. EQAS programının amacı olarak, bütün katılımcı laboratuvarlar tarafından *Salmonella* serotiplendirmesinin en fazla bir hata ile gerçekleştirilmesi belirlenmiş ve değerlendirme sonucunda laboratuvarların % 76'sının sekiz suşun tamamının verisini bildirdiği; suşların da % 82'sinin doğru bir şekilde serotiplendirildiği tespit edilmiştir. 2000 ile 2007 yılları arasında en fazla bir defa hata yapan ya da hiç hata yapmayan laboratuvarların yüzdesi önemli oranda artmıştır (2000'de % 48 iken 2007'de % 68). EQAS'ın değerlendirmesinde kalite kontrol suşu olarak belirlenen *S. Enteritidis*, laboratuvarlar tarafından % 84 ile % 96 oranları arasında doğru tanımlanmıştır. Bazı bölgesel farklılıklar gözlemlenmiş ve Asya'nın merkezindeki laboratuvarlar ile Orta Doğu'daki laboratuvarların diğer bölgelere göre daha düşük performans gösterdikleri saptanmıştır. Yanlış serotip tespiti ile sonuçlanan hataların genellikle faz II flagellar antijenin tespitinin zorluğundan veya antijen kompleksleri içerisindeki farklılıklardan kaynaklandığı anlaşılmış; diğer hataların ise yüksek

ihtimalle kullanılan antiserumların kalitesiyle ilgili olduğu düşünülmüştür (Petersen vd. 2002). Aynı yargıya, Avrupa Birliği içerisinde oluşturulmuş ve *Salmonella* üzerine halk referans laboratuvarı olarak hizmet veren Çevre ve Halk Sağlığı Ulusal Enstitüsü (RIVM) tarafından H antijeninin tespitinde hata ortaya çıkınca varılmıştır. RIVM, 2007 yılında 26 Avrupa ulusal referans laboratuvarını incelemeye almış ve laboratuvarların O ile H antijenleri kullanılarak yapılan serotiplendirme çalışmalarında sırasıyla % 98 ve % 96 oranlarında başarı yakaladığı belirlenmiştir (Anonymous 2007).

2008’de ülke başına *Salmonella* serotiplerinin küresel dağılımı üzerine, WHO GFN CDB’nin çalışmalarının verilerine dayanarak, 2001 yılından 2007 yılına kadarki gelişmeler analiz edilmiş ve özetlenmiştir. Bütün veriler WHO GFN EQAS tarafından belirlenmiş kalite güvencesi barajını aşan ülkelere alinan güvenilir bilgilere dayanmaktadır (Sirichote vd. 2010).

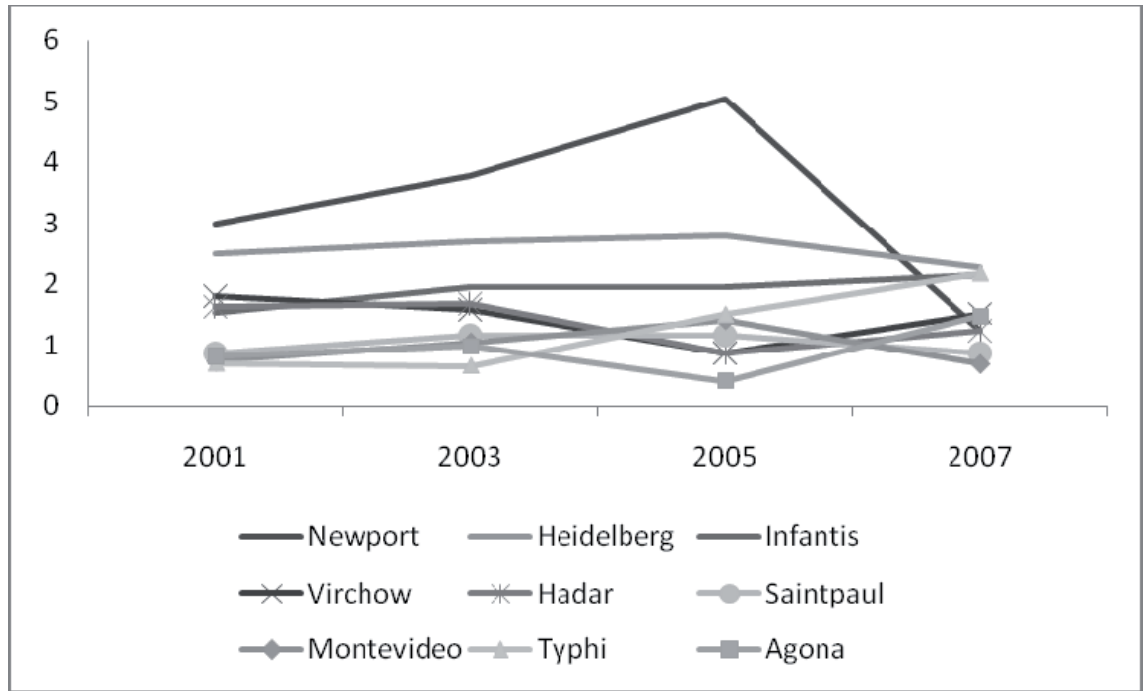
Bu verilere dayanarak, Okyanusya ve Kuzey Amerika bölgeleri haricindeki diğer bölgelerde *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*, sırasıyla en yaygın birinci ve ikinci serotipler olarak göze çarpmaktadır. Kuzey Amerika ve Okyanusya bölgelerinde ise bu iki serotip tam tersi bir sıralamda yer almaktadırlar. Küresel yüzdeler olarak her iki serotipin oranı zamanla düşüşe geçmiştir; *S. Enteritidis* % 44.2’den % 41.5’e, *S. Typhimurium* % 18.9’dan % 15’e gerilemiştir (Şekil 2.4) (Sirichote vd. 2010).



Şekil 2.4 En yaygın serotipler olan *S. Enteritidis* ile *S. Typhimurium*'un yıllara bağlı olarak toplam 37 ülkedeki genel yüzdesi (Sirichote vd. 2010)

Bu durumun ana nedeni gelişmekte olan ülkelerdeki *S. Enteritidis* vakalarının oranında dikkate değer bir azalmayla beraber, *S. Typhimurium*'un gelişmiş ülkelerdeki vaka oranında önemsiz bir azalma yaşanmasıdır. *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*'a ek olarak, *S. Infantis* bütün bölgelerde gözlemlenen serotipler arasındadır. Bu serotipin yol açtığı enfeksiyonlar, çoğunlukla hastanelerde ortaya çıkmış ve uzun süre kalıcı olabilen vakalar görülmüştür (Pessoa-Silva vd. 2004, Fonseca vd. 2006). Bazı durumlarda septisemik semptomlara ve ölümcül sonuçlara yol açan *S. Infantis*, öncelikli olarak çocukları, ayrıca da yetişkinleri etkilemektedir. 1970'lerin sonlarından itibaren Arjantin, Avustralya, Brezilya, Hollanda, Finlandiya, Kanada, Macaristan, Japonya, Yeni Zelanda ve Rusya'da belirlenmiştir (Hasenson vd. 1995). Dünya genelinde *S. Infantis*'in oranı artmaktadır (% 1.5'dan % 2.2'ye). Ancak istikrarlı ve dikkate değer bir artış tespit edilmemiştir. *S. Infantis* Avrupa bölgesinde en yaygın beşinci serotiptir. *S. Agona*, Asya ve Latin Amerika'da sıklıkla görülmekte olup, sıralamada en yaygın üçüncü serotiptir. *S. Agona* ayrıca Avrupa'da en yaygın yedinci; Kuzey Amerika'da en yaygın on üçüncü serotiptir. Genel olarak, bu serotipin yüzdesi 2001 ile 2007 yılları arasında % 0.8'den % 1.5'a çıkmıştır. Dünya genelindeki yaygınlık oranlarında küçük miktarda bir düşüş, *S. Heidelberg*'de, % 2.5'dan % 2.3'e olacak şekilde görülmüştür. Bu serotip gelişmiş

ülkelerde daha yaygındır. S. Heidelberg Kuzey Amerika’da ilk dörtte yer almakta ancak Avrupa ve Latin Amerika’da daha düşük sıklıkta görülmektedir. S. Virchow sadece Asya, Avrupa ve Okyanusya bölgelerinde yüksek oranlarda yaygındır. Takip edildiği yıllar içerisindeki genel yüzdesi istikrarsız olmakla birlikte, 2005’ten itibaren gelişmiş ülkelerde görülen artış yüzdesi ile gelişmekte olan ülkelere rapor edilen azalış yüzdesi birbirine benzerdir. S. Thompson, Avrupa ve Kuzey Amerika’da yüksek sıklıkta görülmektedir. S. Newport da bu iki bölgede, ek olarak da Latin Amerika’da sık görülen serotiptir. Ancak, S. Newport’un genel yüzdesi 2005’te % 5.0’ten, 2007’de % 1.2’ye düşmüştür. S. Montevideo, Kuzey ve Latin Amerika’da yaygın suştur. S. Saintpaul ise Okyanusya ve Kuzey Amerika’da çoğunluktadır. Bu iki serotip geçen zaman boyunca benzer değişiklikler göstermiştir, 2003’ten 2005’e doğru oranları yükselmiş ancak 2007’ye doğru düşmüştür (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Seçilmiş olan 37 ülkedeki diğer *Salmonella* serotiplerinin genel yüzdelilerinin zaman içindeki değişimleri (Sirichote vd. 2010)

Araştırmada, aynı bölge içindeki ülkeler arasında en yaygın olarak izole edilen 15 serotipin aralarındaki farklılıklarda azalma gösterdiği; ancak bölgeler arasında en yaygın izole edilen 20 serotip içerisinde büyük farklılıklar gözlemlendiği sonucuna varılmıştır (Hendriksen vd. 2011).

2.4 *Salmonella* Üzerine Türkiye’de Yapılan Epidemiyolojik Çalışmalar

Bütün dünyada olduğu gibi, *Salmonella* enfeksiyonları Türkiye’de de yaygındır ve salmonelloz önemli bir halk sağlığı sorunudur. Yeterli bildirimin yapılmaması ve ulusal bir *Salmonella* referans merkezinin bulunmaması nedeniyle klinik, hayvan veya gıda kökenli *Salmonella* enfeksiyonlarının, salgınlarının, serotip yaygınlığının gelişimleri hakkında sağlıklı tespitler yapılamamakta ve vakalar takip edilememekte, yalnızca bireysel çalışmalardan ortaya çıkan bulgulara dayanan veriler oluşturulabilmektedir (Sürücüoğlu vd. 2001, Avşaroğlu 2007).

Tarım Bakanlığı’na ait enstitü laboratuvarları tarafından Türkiye’deki gıdalardan elde edilen *Salmonella* izolatlarının rutin serotiplendirilmesi ve antibiyotiplendirilmesi üzerine girişimlerde bulunmaktadır. Ankara ve Adana’da bakanlığa bağlı bulunan Veterinerlik Araştırma Enstitülerinin ortaklaşa yürüttükleri bir araştırmaya göre, kümes hayvanlarından alınan boyun ve kanat örneklerinde en yaygın serotiplerin % 32 ile *S. Enteritidis*, % 31 ile *S. Virchow* ve *S. Typhimurium* oldukları belirlenmiştir (Yazıcıoğlu vd. 2005).

Erdem vd. (2005) tarafından Türkiye’deki *Salmonella* serotiplerinin dağılımı üzerine yapılan çalışmada, 2000-2002 yılları arasında 10 farklı kentte toplanan klinik örneklerden alınan verilerle elde edilen sonuçlara göre en yaygın serotipler *S. Enteritidis* (% 47.7) ve *S. Typhimurium* (% 34.7) olarak bulunmuştur.

2.5 Bakteriyel Tanımlamada Kullanılan Yöntemler

Bakteriyel tanımlamada dünya genelinde kullanılan yöntemler, fenotipik ve moleküler esaslar üzerinde temellendirilmiştir. Fenotipik tanımlamanın kökeni, Antonie van Leeuwenhoek’ün 1676’da tek lensli mikroskop dizaynına dayanmaktadır (Porter 1976). Bakterilerin sınıflandırılması için en temel teknik ise, 1884’te Danimarka’lı Christian Gram tarafından geliştirilen Gram boyamadır (Science Encyclopedia, <http://science.jrank.org>, 2013).

Salmonella'nın epidemiyolojik incelemesinde serolojik analiz genellikle ilk basamaktır (Threlfall vd. 1990). *S. enterica*'nın altıtiplendirilmesi, 80 yıldan fazla bir süredir rutin olarak serotiplendirme ile gerçekleştirilmiştir. Serotiplendirme, yüzey antijenlerinin özel antikorlarla aglütine edilmesi (kümelenendirilmesi) esasına dayanan bir yöntemdir. Kavram olarak serotiplendirme, farklı *S. enterica* türleri içerisindeki filetik ilişkilere dair herhangi bir bilgi sunmaz (Wattiau vd. 2011). Bu gıda kaynaklı zoonozun kontrolü ve etkili önlemler alınması için hızlı ve hassas belirleme teknikleri gereklidir (Nagappa 2007, Rabie vd. 2012).

Ancak, fenotipik metotlar birbiriyle yakın ilişkili izolatların ayırımında zayıf kaldığı için *Salmonella*'nın epidemiyolojik analizindeki kullanımları sınırlanmıştır (Olsen vd. 1994, Johnson vd. 2001). *Salmonella*'nın yüzeyindeki somatik (O) ve flagellar (H) antijenlerin belirlenmesi esasına dayanan standart serotiplendirme yöntemi çok zaman alan yorucu bir çalışma gerektirmektedir (Kotetishvili vd. 2002, Li vd. 1994). Bu yüzden, *Salmonella*'nın genetik ayrımı için genotiplendirme metodları geliştirilmiş ve değişken alan jel elektroforezi (PFGE) *Salmonella* salgını araştırmalarında standart tiplendirme yöntemi olmuştur (Olsen vd. 1994, Garaizar vd. 2000, Liebana vd. 2001). Birçok laboratuvar PFGE'yi bir bakteriyel hastalığın salgın olup olmadığını doğrulamada kullanmaktadır. Bu yüzden yalnızca PFGE profilinin belirlenmesi ile bir *Salmonella* izolatının teşhisi oldukça önemli olup ayrıca hem geleneksel serotiplendirme hem de PFGE'nin kullanılmasına ihtiyaç bırakmaması açısından da kolaylık sağlayıcıdır. Liebana vd. (2001) tarafından *Salmonella*'nın 5 serotipi seçilerek birkaç moleküler tiplendirme metodu ile analizi yapılmış ve çalışma sonucunda PFGE profilleri esas alınarak *Salmonella* serotiplerinin belirlenmesi sağlanmıştır. Gaul vd. (2007) tarafından, 12 *Salmonella* serotipi içeren 674 adet izolatın analizi sonucunda, bunların 66 farklı XbaI PFGE altıtipi oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu 66 altıtip daha sonra küme analiziyle belirli serotiplerin oluşturduğu gruplara ayrılmıştır. Böylelikle, PFGE parmakizi profillemeye yöntemi potansiyel açıdan, *Salmonella* serotiplerinin tanımlanması ve görüntülenmesi için önemli bir alternatif yöntem olarak önerilmektedir (Zou vd. 2010).

2.5.1 Fenotipik yöntemler

S. enterica izolatları biyokimyasal profillemeye, serotiplendirme ve faj tiplendirme gibi geleneksel yollardan tanımlanabilmektedir (Wattiau vd. 2011). Bunların içinde serotiplendirme geniş olarak kullanılır ve antijenik formül çeşidine göre yüksek kesinlikte bir tanımlama olanağı sunar. Genellikle, Kauffmann-White şemasına dayanan lââm üzerinde kümelenme testleri (slide agglutination tests) kullanılır. Bu yöntemle 2500'ün üzerinde serotip belirlenmiştir. Ancak yaygın serotiplerin sebep olduğu salgınlara araştırılmasında serotiplendirme güçlü bir yöntem değildir. Faj tiplendirme (Anderson vd. 1977) ve antimikrobiyal direnç profillemeye (Holmberg vd. 1984) gibi bazı fenotipik yöntemler *Salmonella* serotiplerinin çeşitliliğinin çalışılmasında kullanılmıştır ve epidemiyolojik araştırma yöntemleri arasında önemli yer tutmaktadır.

Salmonella'nın Kauffmann-White-Le Minor (KW) şemasına dayanan lââm üzerinde kümelenme (slide agglutination) serotiplendirmesi 1930'lardaki orijinal şemadan çeşitli değişikliklerle bugüne gelmiştir (Anonymous 1934, Grimont ve Weill 2007, Guibourdenche vd. 2010). Serotiplendirme, somatik (O) ve flagellar (H) antijenlerinin çeşitlerinin belirlenmesi için özel serumlarla bakterinin kümelendirilmesi (aglutinasyonu) esasına dayanır. Bu antijenler yüksek çeşitliliktedir ve 64 O ile 114 H antijen çeşidi belirlenmiştir (Grimont ve Weill 2007, McQuiston vd. 2008). Bakteriyel hücre yüzeyine uygulanan işlemde hedef alınan O antijeni, lipopolisakkaritin sakkarit bileşenidir (Schneitman ve Klena 1993, Reeves vd. 1996). Bu antijenin özel serumlarla beraber yol açtığı tepkimeler, *Salmonella* serotiplendirme şemasının temelini oluşturur (Grimont ve Weill 2007).

Üzeri, Kauffmann-White şemasına uygun bir şekilde antikorlarla bezenmiş SuperEpoksi mikrodizin lâamlarına dayalı serotiplendirme yöntemi Cai vd. (2005) tarafından geliştirilmiştir. Kanada'daki toplam *Salmonella* izolatlarının % 90 civarındaki kısmını içeren ve yaygın bir şekilde izole edilen klinik açıdan önemli 20 adet serovaryetenin bu yöntemle tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde, çalışılan *Salmonella* suşunun mikrohacim düzeyinde gerçekleştirilen antikor ve antijen tepkimelerini; floresan ile işaretlenmesi izlemekte ve bu işaretin tesbiti için floresan tarayıcı kullanılmaktadır. Antikorlu mikrodizin yöntemine dayalı serotiplendirmenin geleneksel

serotiplendirmeye göre üstünlüklerinden birkaçı, analiz süresinin düşüklüğü, standardize kümelenme tesbiti ve O ile H antijenlerinin gerçek zamanlı tesbitidir (Wattiau vd. 2011).

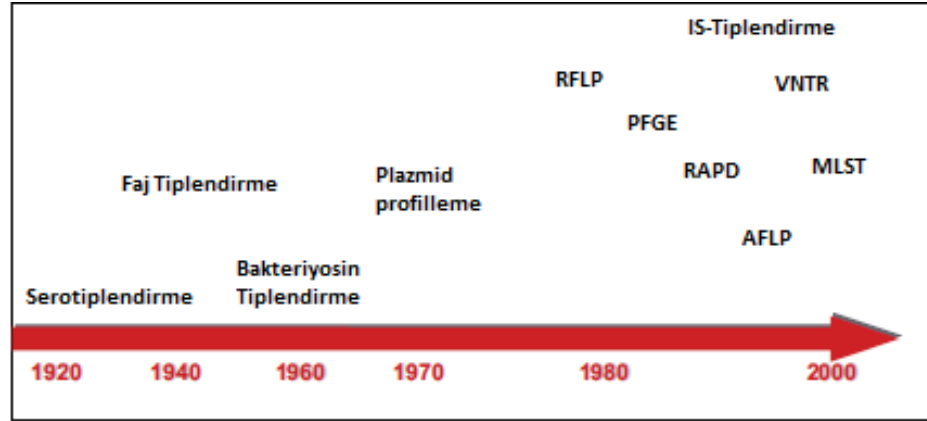
Faj tiplendirme aynı serotipten *Salmonella* suşlarının ayrımında kullanılır. Faj tiplendirme, çalışılan suşun belirlenen faj ile lize olup olmadığına bakılarak yapılır (Anderson ve Williams 1956). Başlangıçta *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* ve *S. Typhimurium* için tasarlanan faj tiplendirme yöntemi, daha sonra *S. Enteritidis* (Ward vd. 1987) ve diğer bazı serovarlar için de kullanılmıştır (Hickmann-Brenner vd. 1991). Faj tiplendirmenin avantajı uygulandığındaki basitlikten ileri gelmektedir ve temel laboratuvar ekipmanları ile gerçekleştirilebilir. Çok sayıda liziz tepkimesi gerektirmesi yöntemin kullanışlılığına genel bir engel teşkil eder ve yöntemin tekrar edilebilirliğinin garantilenmesi, referans laboratuvarlar arasında dikkatli bir koordinasyonu gerektirir (Baggesen vd. 2010).

Fenotipik analizler *Salmonella*'nın epidemiyolojik olarak ele alınmasında bir temel teşkil etmiştir. Ancak, moleküler biyolojinin 1970'lerdeki büyük etkisi sonucunda, fenotipik karakterizasyonun organizmanın genotipindeki sınırlı bir ifade olduğu açıklık kazanmıştır. Bu yüzden moleküler yöntemler, epidemiyolojik analizleri de içine alan klinik uygulama alanlarında öne çıkmış ve “moleküler epidemiyoloji” terimi literatüre kazandırılmıştır (Goering 2010).

2.5.2 Genotipik ve moleküler yöntemler

Çoğu gıda kökenli hastalıktan, belirlenen birkaç önemli serotipin sorumlu olduğu gözlemlenmektedir. Bunun yanı sıra, bazı izolatların antimikrobiyal ilaçlara duyarlılığı ve faj tiplendirilmesinin yapılamaması fenotipik tanımlamalarını imkânsız kılmaktadır. Bu yüzden son zamanlarda yeni, hızlı ve verimli moleküler tanımlama ve altiplendirme araçları kullanılmaktadır. Örneğin, aynı serotipin izolatları arasındaki farklılıkların belirlenmesi ve takip edilmesi için Değişken Alan Jel Elektroforezi (PFGE) (Ridley ve Threlfall 1998), çoğaltılmış fragment uzunluğu polimorfizmi (AFLP) (Aarts vd. 1998, Torpdahl ve Ahrens 2004) yöntemleri ile, sekans-bazlı yöntemlerden çoklu lokus sekans tiplendirme analizi (MLST) (Kotetishvili vd. 2002, Sukhnanand vd. 2005) ve çeşitli

sayıda ardarda tekrarlayan bölge analizi (VNTR) (Lindstedt vd. 2004, Torpdahl vd. 2007) yöntemleri kullanılmıştır (Kérounton vd. 2007) (Şekil 2.4).



Şekil 2.6 *Salmonella*'nın tiplendirilmesinde kullanılan yöntemlerinin evrimi (Hendriksen 2010)

Bunların yanında kromozomal restriksiyon-hibridizasyon yöntemleri, *Salmonella* üzerine epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Ribotip analizi, ribotiplendirme denilen ve rRNA kodlayan gen bölgelerinin parmakizi tekniği ile belirlenmesi esasına dayanan bir analizdir. *Salmonella* kromozomu içerisinde rRNA operonlarından çoklu kopyalar mevcuttur (Mendoza ve Landeras 1999) ve bu rRNA genlerinin kopyaları kendi içlerinde ve izolatlar arasında oldukça benzerdir. Ancak araya giren diziler, uzunlukları ve nükleotid kompozisyonları bakımından çeşitli özellikler gösterir. Ribotiplendirme, kromozomal DNA'nın agaroz jel üzerinde endonükleaz kesimi ile başlar ve DNA daha sonra bir membrana aktarılır. Membran üzerinde problemlerin hibridize edildiği fragmentler, 16S ve 23S rRNA bölgelerini tanıyarak bu dizileri tutar. Birden çok restriksiyon endonükleaz kullanarak yapılan analiz ribotiplendirmenin ayırım gücünü artırır (Millemann vd. 1995). Ribotip analizi bazı yaygın serotiplerin alttiplendirilmesinde kullanılmaktadır (Thong vd. 1995, Landeras vd. 1996).

Bir diğer kromozomal DNA restriksiyon-hibridizasyon yöntemi olan IS200 tiplendirme *Salmonella* izolatlarının moleküler ilişkilerini değerlendirmek için kullanılmaktadır. IS200, *Salmonella* kromozomu içerisinde çok sayıda kopyalar halinde var olan 708 bp'lık bir insersiyon sekansıdır (Lam ve Roth 1983). Enzim kesimi uygulanmış kromozomal DNA'nın bir IS200 probuyla hibridizasyonu çeşitli *Salmonella*

serotiplerindeki klonal mirasın ortaya çıkarılması açısından kullanışlıdır, ancak *S. Enteritidis*, *S. Typhi* ve diğer bazı serotipler için faj tiplendirme kadar ayırmalandırma gücüne sahip değildir (Threlfall vd. 1994). *S. Typhimurium*'daki bazı belirli faj tiplerinde, örneğin İngiltere'de yaygın bulunan DT204c ve 193 tiplerinde suş ayrımı, PFGE ve ribotiplendirmeden bile üstün şekilde yapılabilmektedir (Baquar vd 1993, 1994, Jeffreys vd. 2001). Yine de PFGE, IS200 tiplendirmesinden çoğunlukla daha iyi sonuç vermektedir (Liebisch ve Schwarz 1996, Navarro vd. 1996, Casin vd. 1999, Amavisit vd. 2001).

Salmonella'nın lokusa özgü polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemine dayalı tiplendirmesi de yukarıda değinilen yöntemlerle yakın temellere dayanmaktadır. Millemann ve arkadaşları (2000) *S. Typhimurium* için IS200 PZR yönteminin, PZR'ye dayalı ribotiplendirme yöntemine kıyasla daha az ayırım gücünde olduğunu ispatlamışlardır. Çalışmalarında IS200 kopya sayısının belirlenmesi için IS200'ün uç bölgelerini tamamlayıcı (komplementer) primerler kullanılmış ve genomdaki ilgili insersiyon bölgelerine bakılmıştır. PZR ribotiplendirme ile, kromozom içerisinde 16S ve 23S rRNA genleri arasındaki kodlama yapmayan diziler çoğaltılır (Jensen vd. 1993, Lagatolla vd. 1996). PZR ribotiplendirme, salgın hastalıkların araştırılmasında hızlı ve öncelikli yöntem olarak tavsiye edilmektedir çünkü serotip ayrımını tipik bir şekilde belirlemektedir (Lagatolla vd. 1996).

Belirli salgın vakalarında kullanışlı olmak üzere kromozom üzerinde bilinen diğer lokusların PZR'ye dayalı analizi yapılmaktadır. Sınıf I integronlar, sıklıkla bir ya da daha fazla antimikrobiyal direnç geni taşıyan hareketli DNA öğeleridir (Hall ve Collis 1995, Recchia ve Hall 1995). Bu genlerin girdiği çeşitli kaset bölgelerini çoğaltan primerler dizayn edilmiştir (Levesque vd. 1995). Dünya geneline yayılmış olan ve yüksek derecede çoklu ilaç dirençliliğine sahip *S. Typhimurium* DT104 klonu, integronlar içerisinde kodlanan çok korunaklı antibiyotik direnç genlerine sahiptir (Ridley ve Threlfall 1998, Sandvang vd. 1998, Ng vd. 1999). Integron PZR analizi, taşıdığı 13.000 bç'lik korunmuş bölgesinde ampicilin, kloramfenikol, streptomisin, sülfasoksazol ve tetrasiklin direnç genlerini içeren iki integronu kodlayan DT104 klonlarını belirlemede yardımcı olmak amacıyla kullanılmıştır (Daly vd. 2000). Integron

PZR ayrıca *S. Virchow* üzerindeki çalışmalarda diğer tiplendirme yöntemlerine tamamlayıcı olarak kullanılmış; bu noktada çalışma, benzerlik arayışından çok, belli bölgelere girmiş integron kasetlerinin çeşitliliğine bakılarak suşların ayırlandırılması yolunda yapılmıştır (Martin vd. 2001). Bu bölgeye özgü PZR yöntemleri, laboratuvarlar arasında ve içinde iyi bir tekrar edilebilirlik göstermektedir (Olive ve Bean 1999).

Aralara serpiştirilmiş, ifade olunmayan, tekrarlayan DNA dizilerinin, kesin işlevleri açıklığa kavuşmasa da birçok bakteriyel genomda bulunduğu tespit edilmiş (Hulton vd. 1991, Versalovic vd. 1991, Koeuth vd. 1995), gen-dışı (extragenic) tekrarlayan palindromik (REP) öğeler, enterobakteriyel genler-arası (intergenic) tekrarlayan konsensus dizileri (ERIC) ve BOX A öğelerinin *Salmonella*'da bulunduğu belirlenmiştir. REP PZR ifadesi, sıklıkla bu üç tekrarlayan öğeden herhangi biri için tasarlanan primerlerin çalışıldığı PZR uygulamalarını tanımlamakta kullanılır ve REP PZR'nin, izolatları serotip seviyesinde ayırlandırdığı gösterilmiştir (Van Lith ve Aarts 1994, Johnson vd. 2001). REP PZR; Johnson vd. (2001) tarafından ERIC2, BOXA1R veya bu iki primer setinin bir bileşiminden yararlanılarak, *S. Infantis*'in sebep olduğu, hastane kafeteryası ile ilişkili bir gastroenterit vakasının analizinde kullanılmıştır. Bu yöntem serotip ayırımında oldukça etkili olmuş ve hatta koleksiyonlarındaki izolatlar içerisinde tarihsel serotiplendirme hataları da belirlenmiştir. Ancak alttip ayırımı için hiçbir bulgu edinilememiş ve bu yöntem sonucunda salgınla ilişkisiz *S. infantis* kontrol suşları, salgın suşlarından ayırt edilememiştir (Van Lith ve Aarts 1994, Johnson vd. 2001). Diğer yandan tüm *Salmonella* serotiplerinin ERIC PZR ile ayırlandırılabilirdiği gösterilememiştir. Milleman vd. (1996) *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* suşları tarafından paylaşılan genel bir ERIC PZR profili keşfetmiştir. Başka bir çalışmada ERIC PZR hemen her izolat için özgün birer parmak izi verisi sunmuş olsa da serotipler tanımlanamamıştır (Burr vd. 1998). ERIC PZR çalışmalarında laboratuvar içi tutarsızlıkların da sorun yarattığı gözlemlenmiştir (Van lith ve Aarts 1994, Burr vd. 1998, Garaizar vd. 2000).

PZR temelli DNA parmak izi yöntemlerinin birçok çeşidi tiplendirmede daha hızlı ve daha tekrar edilebilir sonuçlar almak için geliştirilmektedir. Çoğaltılmış fragment uzunluğu polimorfizmi (AFLP), bir diğer ifadeyle sık olmayan restriksiyon bölge PZR

analizi (IRS PCR), uçları oligonükleotit adaptörlere bağlanan iki restriksiyon endonükleazı kullanılarak başlatılır ve PZR adaptöre-özüğü primerler kullanılarak gerçekleştirilir (Savelkoul vd. 1999). *Salmonella* için restriksiyon enzimlerinin ve adaptöre-özüğü primerlerin optimizasyonu devam etmektedir (Garaizar vd. 2000, Lindstedt vd. 2000), fakat yöntem tekrar edilebilirliği yönünden REP PZR yönteminden daha iyi gözükmeğedir (Savelkoul vd. 1999, Garaizar vd. 2000).

DNA dizi analizi, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Neisseria meningitidis* suşlarını da içeren bir dizi bakteriyel patojenin genetik ilişkilerini ve filogenilerini karakterize etmek için kullanılmaktadır. Çoklu-bölge sekans tiplendirmesi (MLST) analizinde, moleküler tiplendirme stratejisi olarak; DNA dizileri, housekeeping genleri veya virulans genleri ve/veya rRNA sekanslarının belirli bölümleri incelenerek karşılaştırılması yapılır (Maiden vd. 1998). 2002’de *S. Typhi*’nin klonalitesi ve diğeri *S. enterica* alttürlerinden 50.000 yıl önce gerçekleştiğı varsayılan ayrılışının üzerine 7 housekeeping gen bölgesi temel alınarak yapılan çalışma ile ilk MLST şeması oluşturulmuştur (Kidgell vd. 2002). ABD’de en yaygın 11 serotipi içeren *S. enterica* türünün MLST ile ayrımlandırılması çalışması ise 3 yıl sonra yapılmış ve yöntemin özellikle polifiletik serotiplerin değeriendirilmesi söz konusu olduğunda serotip düzeyinin altında ayrımlandırma için oldukça verimli olduğu kanıtlanmıştır (Sukhnand vd. 2005). Ancak MLST’nin dezavantajları arasında, hedef DNA fragmentlerinin nükleotid dizilerinin çoğaltılması, tanımlanması ve düzeltme okumalarının (proof-reading) yapılabilmesi için yüksek maliyet ve uzun süreli laboratuvar çalışmasının gerekmesi gösterilmektedir. Bu durum da yöntemin rutin laboratuvar testi olarak benimsenmesinde zorluk yaratmaktadır (Wattiau vd. 2011).

Serotiplerin tanımlanması için bir başka alternatif yöntem olarak ve geleneksel serotiplendirmenin yüksek derece teknik uzmanlık ile el emeğı isteyen yapısının da üstesinden gelmek için, DNA temelli serotiplendirme, ya da “moleküler serotiplendirme” yöntemi geliştirilmiştir. Yaklaşık 10 yıldır *S. enterica*’nın somatik O ve H antijenlerinin genetik kodlarına dayalı olarak tanımlanmasını öngören yöntemler üzerinde çalışılmaktadır. Moleküler serotiplendirme sistemlerinin geliştirilmesi ile var olan her antijenik tip için genetik belirteçlerin tanımlanması ve ilgili serotipin tayini

amaçlanmaktadır. Diğer yandan, birinci ve ikinci faz H antijenlerini ve serogrupları, çoğaltılmış DNA fragmentlerine dayalı olarak belirleyebilen kombine edilmiş üçlü multipleks PZR tepkimesi dizayn edilmiştir (Echeita vd. 2002, Herrera-Leon vd. 2004, Herrera-Leon vd. 2007). Bu kombine edilmiş yöntem ile 500 adet izolatin % 84.6'sının serotiplendirilmesi yapılmıştır (Herrera-Leon vd. 2007). CDC'de gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, flagellin genlerinin çeşitli allellerinin sistematik sekanslaması yapılmıştır. Sonuç olarak, bilinen 114 adet flagellar antijenik tipten 67'si belirlenmiş ve genetik ifadeleri tanımlanmıştır (McQuiston vd. 2008). Moleküler serotiplendirme yöntemlerinin avantajları arasında laboratuvarıdan laboratuvara tekrar edilebilirlik derecesinin yüksekliği, sonuçların daha hızlı alınması ve yöntemin çok fazla teknik uzmanlık gerektirmemesi gösterilebilir. Ancak dezavantajları olarak da, H antijenlerinin ifade edildiği suşların sadece bir kısmında sonuç alınabilmesi ve hiçbir genetik imzanın belirlenememesi; ayrıca allelik olarak çok çeşitli kompleks H antijenleri ile karakterize edilen bazı serotiplerin mikrodizin üzerindeki problemler tarafından her zaman yakalanamaması yüzünden tutarsız sonuçların alınması ve hareketsiz suşların genomlarında (örn. Paratyphi A genomunda) ifade olunmayan flagellin genlerinin de tespit edilmesi gösterilebilir. *Salmonella* genomunun görüntülenmesi için dizayn edilmiş birçok farklı mikrodizin yöntemi bulunmaktadır. Malorny vd. (2007) tarafından *S. enterica* izolatlarının eş zamanlı moleküler karakterizasyonu ve tiplendirilmesi için bir bileşik (kompozit) mikrodizin yöntemi geliştirilmiştir. Mikrodizin, 35-40 birim yapı 109 adet oligonükleotit problemleri içermekte ve antibiyotik direnç belirleyici bölgelerinin, patojenite adalarının içinde veya dışında yer alan virülans genlerinin, faj-ilişkili genlerin ve serotip ya da serogruba özgü flagellar ve somatik antijenleri kodlayan genlerin tespiti gerçekleştirilmektedir (Wattiau vd. 2011).

Birbirinden bağımsız çalışmalarda *Salmonella* alttürlerinin antijen çeşitlilikleriyle küresel boyuttaki genom çeşitliliği arasında paralel bir evrimleşme olduğu gözlemlenmiştir (Sukhnand vd. 2005, McQuiston vd. 2008). Bu yüzden, O ve H antijenlerine bağlı olmayan genetik belirteçlere dayalı birtakım moleküler yöntemler *Salmonella* suşlarının serotip tespiti için önerilmiştir. Analizinin düşük yoğunluklu DNA mikrodizin platformunda gerçekleştirildiği multipleks ligaz zincir reaksiyonu (LZR) çalışmasına dayanan bir moleküler serotiplendirme sistemi, "PremiTest

Salmonella” adı altında ticari olarak kullanıma sunulmuştur (Andreoli vd. 2004, Wattiau vd. 2008). Özgün mikrodizin hibridizasyon profilleri vermesi için seçilen genetik belirteçlerin kullanıldığı sistem ile, en çok karşılaşılan *S. enterica* serovarlarının çoğunun cins ve serovar düzeyinde tanımlanması sağlanmaktadır. PremiTest yönteminin hassasiyeti, özellikle polifiletik suşlar için serovar düzeyinden daha fazla bilgi sağlanmasını mümkün kılarken, salgın durumlarında salgın suşunun parmakizi analizi için yetersiz kalmaktadır. *S. enterica*’nın karşılaştırmalı genomikten köken alan tüm genom (ORFeom) karşılaştırmaları ile moleküler alttıplendirmesinin yapılmasını sağlayan yöntemler sayesinde, *Salmonella* suşlarının genetik içeriğinin derinliğine araştırılması için çeşitli olanaklar elde edilmiştir. *S. Typhimurium* LT2 ve *S. Typhi* CT18 suşlarının her ikisinde de anotasyonu yapılmış neredeyse tüm açık okuma kalıplarını (ORF) içeren mikrodizinlerin kullanılması ile, Amerika’da en yaygın *S. enterica* serovarlarının klinik izolatlarının tüm genom içeriklerinin tanımlanması gerçekleştirilmiştir (Porwollik vd. 2004). Bu çalışmalar sırasında, bir serovara dair gen içeriğinin, serovarlar arasındaki değişimlere kıyasla kendi içerisinde daha çok farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Ne var ki, tüm *Salmonella* genomunun probunun mikrodizin üzerinde yapılandırılması için, pahalı, otomatize edilmesi zor ve yüksek hızlı işlemlerin gerçekleştirilmesine uygun olmayan bir sisteme ihtiyaç duyulmaktadır ve bu yüzden rutin laboratuvar uygulaması olarak düşünülmemektedirler. Ayrıca şu anda bu tür moleküler uygulamaların tüm serovarların tespiti için yeterli altyapısı bulunmamaktadır. Ek olarak, klasik serotiplendirme gibi, moleküler serotiplendirme de salgın çalışmalarında suşların parmakizi analizi için uygun görülen sistem değildir (Wattiau vd. 2011).

2.6 Değişken Alan Jel Elektroforezi (PFGE)

Bakteriyel hücrelerde hücre içi nükleik asit içeriğinin görüntülenmesi için agaroz jel elektroforezinin kullanımı yöntemi (Meyers vd. 1976), moleküler epidemiyolojiyi de içine alan çeşitli klinik uygulamalarda kendisine önemli bir yer edinmiştir. Agaroz jel elektroforezinin, bakteriyel kromozomal restriksiyon fragmentlerindeki profillerin karşılaştırmalı analizinde kullanımı ise, genom temelli epidemiyolojik analiz yaklaşımlarında önemli bir ikinci nesil yöntem olarak öne çıkmış; fakat yöntemde çeşitli

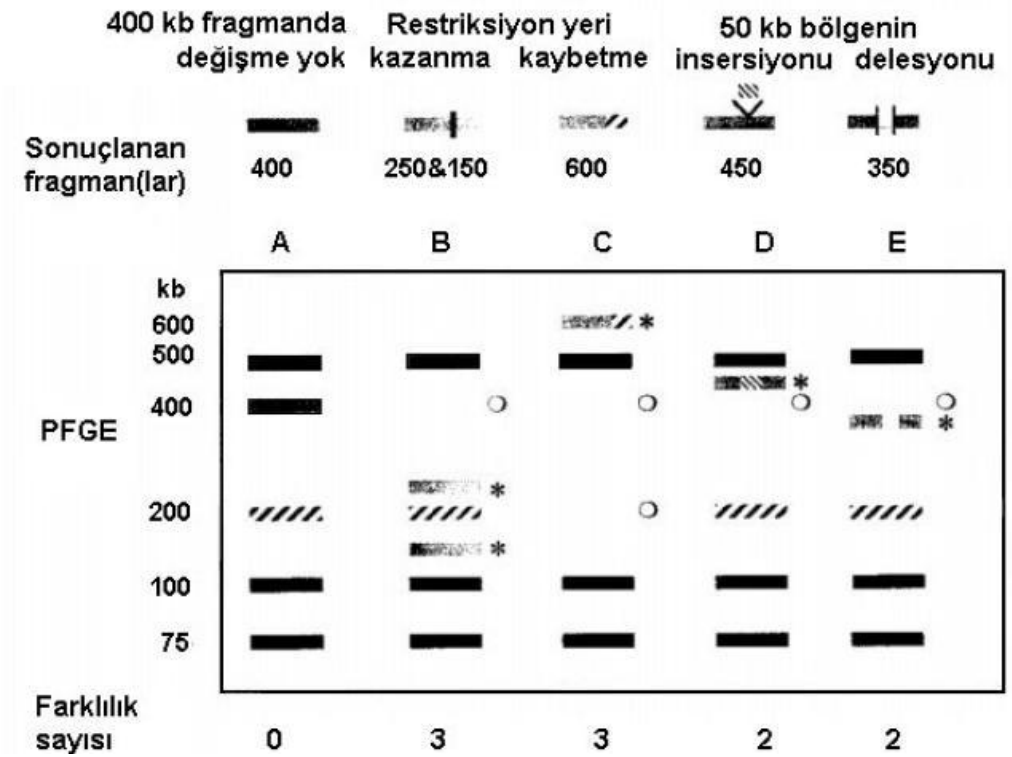
zorluklarla karşılaşılmıştır. Genellikle kullanılan EcoRI ve HindIII gibi restriksiyon enzimlerinin tanıdığı DNA dizileri ile, tipik olarak 2-4 Mb büyüklüğünde olan bakteriyel kromozomun çok fazla sayıda parçalara bölünmesi sebebiyle elektroforetik ayırım gücünün düştüğü gözlenmiştir. Bir restriksiyon enziminin, genomik DNA'yı keseceği umulan ortalama kesim frekansı matematiksel olarak hesaplanabilmektedir (Stephenson 2004). Bakteriyel genom üzerinde nadir tanıma bölgelerine sahip bulunan restriksiyon enzimleri ise 1970'lerin sonlarından beri bilinmektedir (Stephenson 2004, Roberts vd. 2010). Ancak bu enzimlerin megabaz büyüklüğünde ürettikleri fragmentler, 40-50 kb'dan daha büyük DNA moleküllerini görüntüleyemeyen geleneksel agaroz jel elektroforezi yöntemiyle doğru bir biçimde ayrıştırılamadığı için; 1980'lerin başında ortaya çıkan "alternatif" elektroforetik yaklaşımlar ile bu durumun üstesinden gelinmiştir (Schwartz vd. 1982, Schwartz ve Koval 1989, Struelens vd. 2001). 1982'de Schwartz vd. tarafından 50 kb'dan büyük DNA moleküllerinin iki değişkenli elektrik alan ile ayırımının yapılması fikri temellendirilmiştir (Schwartz vd. 1982). Bu prensibe dayanan çeşitli araçlar geliştirilmiş ve değişken alanların DNA moleküllerini birkaç kb'dan 10 megabaz çiftinin üzerindeki büyüklüklerde bile ayırabilmesi sağlanmıştır (Basım ve Basım 2000). Genotipik farklılıkların araştırılmasına öncülük eden yöntemlerin geliştirilmesi 80'lerin başlarında önem kazanmış, değişken alan jel elektroforezi yöntemi (PFGE) *Salmonella* gibi mikroorganizmaların tanımlanmasında en çok başvurulan yöntemlerden biri haline gelmiştir (Schwartz ve Cantor 1984). PFGE ayrıca hayvan yetiştirilmesinde (Sandvang vd. 2000) ve bitkisel gıdalarda oluşabilen kontaminasyonların takibinde de kullanılmaktadır (Nde vd. 2006). En önemli avantajları arasında ayırım gücü, tekrar edilebilirliği ve belirlenen profillerin tutarlı oluşu belirtilmiştir (Olive ve Bean 1999, Laconcha vd. 2000). Alternatif elektroforetik yaklaşımlar prensip olarak, DNA'nın jel üzerindeki göçünün belirli zaman aralıklarıyla yönü değiştirilen elektriksel alan ile sağlanması esasına dayanmaktadır. Küçük moleküller, büyük olan moleküllere kıyasla daha kısa zamanda yönlerini değiştirebileceklerinden, farklı yönlerdeki elektroforetik atım (pulse) sürelerinin uzunluğundaki kademeli artış ile DNA fragmentlerinin kilobazdan megabaza kadar geniş aralıklarda ayrıştırılabilesine olanak tanınmıştır. Değişken alan jel elektroforezi için birçok yapısal model üzerinde durulmuştur, bunlardan bazıları ortogonal alan jel elektroforezi (Carle ve Olson 1984), çapraz değişken alan elektroforezi (Gardiner vd.

1986), ters alan jel elektroforezi (FIGE) (Carle vd. 1986) ve CHEF (Contour clamped homogeneous electric field electrophoresis) olarak gösterilebilir (Chu vd. 1986). Değişken alan jel elektroforezindeki bütün bu metot çeşitliliğine rağmen laboratuvarların büyük bir bölümünde artık PFGE ile neredeyse aynı anlama gelmiş durumda olan CHEF metodu kullanılmaktadır (Goering 2010). CHEF günümüz laboratuvarlarında en yaygın kullanımda olan PFGE biçimidir (Maule 1998). Altıgen yapıya dağıtılmış 24 adet elektrot, elektrik alanda 120°'lik açılarla elektrik atımları (pulse) yapılabilmesini sağlar. Sabit bir elektrik alanı sağlamak için de elektrotlar belirli bir voltajda sabitlenir. Bu voltaj, göç hızına kısmen etki yapar ve ayırılacak olan fragmentlerin boyutlarındaki farklılıklara bağlıdır. Homojen elektrik alanı, düşük agaroz konsantrasyonu, yön değişikliğini sağlayacak darbe değişim zamanlarının (switching times) uzunluğu ve elektrik alan kuvvetinin düşürülmesi ile kombine edildiğinde büyük DNA moleküllerinin (>5Mb) ayrımı sağlanır (Townsend ve Dawkins 1993). DNA kesimi için kullanılacak restriksiyon enziminin seçimi PFGE sürecinde kritik önem taşır. İzolatların ilişkilendirilmesinde varılacak kararlar, restriksiyon fragmentlerinin oluşturduğu bant profillerinin karşılaştırılabilmesi esasına dayanır. Kromozomal DNA'nın çalışılabilir oranda kesiminin PFGE profillerinin yorumlanmasında önemi vardır ve 10 banttan fazla, 25-30 banttan az olmak koşulu ile sağlıklı bir yorumlama yapılabilir (Goering 2004, Van Belkum vd. 2007). Bu kesim frekansları, restriksiyon enziminin bakteriyel kromozom içerisindeki tanıma bölgelerinin sıklığıyla bağlantılıdır. Genel olarak, tanıma dizisi uzunluğu ile kesimin gerçekleşme sıklığı arasında bir ters orantı vardır. Bu yüzden Gram negatif organizmalarda sekiz veya daha fazla nükleotidi kesen enzimler (örneğin NotI, 5'GC^GGCCGC3'; SfiI, 5'GGCCNNNN^NGGCC3') genomu nadir bölgelerden keserler. Ancak, kromozomdaki G+C içeriği restriksiyon bölgelerinin sıklığını etkileyen bir unsurdur. Çoğu A+T zengini bakteriyel genomlarda CCG ve CGG en nadir üçlü nükleotit (trinükleotit) dizisi olup; G+C zengini genomlarda ise genellikle CTAG en nadir dördü nükleotit (tetranükleotit) dizisidir (McClelland vd. 1987). Bu sebeptendir ki, altı nükleotit (hekzanükleotit) dizisine sahip XbaI (5'T^CTAGA3') ve SpeI (5'A^CTAGT3') enzimleri G+C zengini Gram-negatif genomlarını nadir bölgelerden keserken; SmaI (5'CCC^GGG3') enzimi A+T zengini Gram-pozitif genomlarını nadir bölgelerden keser (Goering 2010).

İyi bir PFGE sonucu almak için; standardize edilmiş başlangıç hücre konsantrasyonu (610 nm dalgaboyunda 0.5-1.5 optik yoğunluk aralığında), kuyular arasındaki bant yoğunluklarında oluşabilecek farklılıkları en aza indirmek ve belirgin restriksiyon fragment profilleri elde etmek için yeterli derecede DNA eldesini sağlamak önemlidir (Struelens vd. 2001, Goering 2004).

PFGE ile oluşturulan DNA fragment profillerinin yorumlanması ve kullanılabilir bilgiye dönüştürülmeleri için, bir mikrobiyoloğun PFGE profillerinin nasıl karşılaştırılacağını ve rastlantısal genetik olayların bu profilleri nasıl değiştirebileceğini bilmesi gereklidir. İdeal olarak, salgın suş izolatlarının PFGE profilleri birbirinden farksızken; epidemiyolojik açıdan salgınla ilintisiz suşların profilleri ise çok farklı olmalıdır. Bu sayede salgın suşun tespiti kolaylaşacaktır (Haley vd. 1995). Daha çok karşılaşılan durum; salgın suşlarına ait PFGE bant profillerinin, salgın süreci içerisinde nokta mutasyonları, insersiyonlar ve delesyonlar gibi rastlantısal genetik olaylarla değişmesidir. Bu durum, profillerin yorumlanmasında çeşitli güçlükler ortaya çıkarsa da, rastlantısal genetik olayların profilleri nasıl etkileyebileceği bilgisine sahip bir mikrobiyolog, her izolat profilini dört kategoriden birisine doğru bir şekilde yerleştirebilir. Bu kategoriler: salgın suşunun profilinden farksız; salgın suşuyla yakından ilişkili; salgın suşuyla olası ilişkili ve salgın suşuyla ilişkisiz; olmak üzere gruplandırılır. PFGE ile oluşan bant profilleri en az 10 fragment oluşturuyorsa bu kriterler güvenilir denebilir. Eğer daha az fragment oluşumu gözleniyorsa kriterlerin ayırım gücü ve güvenilirliği hakkında herhangi bir veri bulunmamaktadır. Restriksiyon profillerinin karşılaştırılmasının, birtakım katı algoritmalara indirilemeyecek düzeyde kısmen öznel bir yapıya sahip olduğu düşünülmektedir. Yorumlama süreci, tecrübeye dayalı olarak kolaylaşmakta ve tutarlı hale geçmektedir. Bilgisayar tabanlı görüntü alma ve analiz ekipmanlarının kullanımı mümkün olmasına rağmen, klinik laboratuvarlarda yaygınlaşmaması yüzünden bu ekipmanların kriterlere uyumlandırılarak kullanımları henüz gerçekleştirilmemiştir. Tenover vd. (1995) tarafından, bu birtakım rastlantısal genetik olayların PFGE bant profilleri üzerindeki etkileri şematize edilerek, yorumlanmaları için kriterler belirlenmiştir (Şekil 2.7). Bunlar “Tenover kriterleri” olarak anılmaktadır (Tenover vd. 1995). DNA’da oluşan bir nokta mutasyon ile yeni bir restriksiyon bölgesi oluşur ve yeni profilde, salgın profilinde bulunan bir bant

kaybolarak yerini salgın profilinde olmayan iki yeni ve daha küçük banda bırakır. İki küçük bandın boyutlarının toplamı, yaklaşık olarak büyük bandın boyutu kadar olacaktır. Bu değişim, üç bant profilinin farklı olması ile açıklanmaktadır (Şekil 2.7B). Bir restriksiyon kesim bölgesinde nokta mutasyon meydana gelir ve yeni profilde, salgın suşta olmayan, iki küçük bandın birleşmesiyle daha büyük bir bant meydana gelir. Bu değişim, üç farklı bant profilinin oluşmasına sebep olmaktadır (Şekil 2.7C). Genoma yeni bir DNA parçasının eklenmesi durumunda yeni profilde, salgın profiliyle aynı sayıda bant görülür ancak bir bant daha büyük görülecektir (Şekil 2.7D). Genomdan bir DNA parçasının delesyonu durumunda ise yeni profilde, salgın profiliyle aynı sayıda bant görülür ancak bir bant daha küçük görülecektir (Şekil 2.7E).



Şekil 2.7 Genetik olayların PFGE bant profillerinde ifadenmesi A: Salgın suş profili B: Yeni bir restriksiyon bölgesinin oluşması C: Bir restriksiyon bölgesinin kaybolması D: DNA parçasının insersiyonu E: DNA parçasının delesyonu (o, salgın suşunda bulunan fakat izolatta bir genetik olay neticesinde kaybedilen bandı; *, salgın suşunda bulunmayan fakat izolattaki bir genetik olay neticesinde kazanılan bandı ifade eder) (Tenover vd. 1995, Durmaz ve Durmaz 2001)

Değişken alan jel elektroforezi ya da kısaca “PFGE”, on yıllardır yapılan araştırmalarda epidemiyolojik olarak ilişkili olduğundan şüphelenilen izolatlar arasındaki genetik ilişkinin sağlam bir şekilde değerlendirilmesini mümkün kılmıştır (Tassios vd. 2000, Mammina vd. 2004, Woo ve Lee, 2006) ve günümüzde birçok referans laboratuvarı tarafından da gıda kaynaklı hastalıkların araştırılması ve takip edilmesi için “altın standart” olarak kabul görmüştür (Swaminathan vd. 2001).

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan 98 adet DMC kodlu *Salmonella* bakteri örneklerinin tamamı Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Prokaryot Genetiği Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.2 Mikroorganizmaların saklanma koşulları

Bakterilerin geliştirilmesinde; *Salmonella* suşları için LB broth besiyeri kullanılmıştır. Bakteriler uygun süre ve sıcaklıkta, LB broth besi ortamında geliştirildikten sonra % 30 oranında steril gliserol ilave edilerek -20°C’de saklanmıştır.

3.1.3 Besiyerleri

Luria Bertani (LB) Broth, Miller Besiyeri (Difco, France)

İçerik

Trypton	10 g
Maya ekstratı	5 g
NaCl	10 g

Luria Bertani Broth, Miller besiyeri dH₂O içerisinde çözüldükten sonra otoklavda sterilize edilmiştir (121°C, 15 dk) .

3.1.4 Çözeltiler

0.5 M Tris stok çözeltisi (pH:8.0)	300 ml
------------------------------------	--------

Tris	18,171 g
dH ₂ O	300 ml

Sterilizasyondan önce pH:8.0'e ayarlanmış ve otoklavda sterilize edilmiştir (121°C'de 15 dk).

0.5 M EDTA stok çözeltisi (pH:8.00)	300 ml
-------------------------------------	--------

EDTA	55,836 g
dH ₂ O	300 ml

Sterilizasyondan önce pH:8.0'e ayarlanmış ve otoklavda sterilize edilmiştir (121°C'de 15 dk).

%10'luk Sarkozil Çözeltisi	50 ml
----------------------------	-------

Sarkozil	5 g
dH ₂ O	50 ml

Tiyoüre Çözeltisi	50 ml
-------------------	-------

Thiourea	5 g
dH ₂ O	50 ml

Hücre Süspansiyon Tamponu (HST)	100 ml
100 mM Tris (0.5 M, pH:8.0)	20 ml
100 mM EDTA (0.5 M, pH: 8.0)	20 ml
dH ₂ O	60 ml
0.5 M Tris-EDTA Tamponu (TE)	500 ml
10 mM Tris (0.5 M, pH:8.0)	10 ml
1 mM EDTA (0.5 M, pH: 8.0)	1 ml
dH ₂ O	489 ml
Lizis/Proteinaz K Tamponu (L/P)	500 ml
50 mM Tris (0.5 M, pH:8.0)	20 ml
50 mM EDTA (0.5 M, pH: 8.0)	20 ml
%10 Sarkozil	50 ml
Proteinaz K (20.2 mg/ml)	0.1 mg/ml
dH ₂ O	350 ml

Lizis tamponu hazırlanıp otoklavda sterilize edilmiştir (121°C’de 15 dk). Proteinaz K ilâvesi 20.2 mg/ml stoktan (Fermentas) alınıp, son konsantrasyon 0.1 mg/ml olmak üzere çalışma sırasında yapılmıştır.

Tris Borat EDTA (TBE) Tamponu (10X)	1000 ml
-------------------------------------	---------

Tris	108 g
Borik Asit	55 g
EDTA (0.5 M, pH:8.0)	40 ml

İlk önce Tris ve Borik asit 700 ml dH₂O içerisinde çözüldükten sonra 40 ml EDTA stok çözeltisi (0.5 M, pH:8.0) eklenmiş ve hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklavda sterilize edilmiştir (121°C, 15 dk).

3.2 Yöntem

Değişken alan jel elektroforezi işlemlerinde koşullar, PulseNet International web sitesindeki *Salmonella*'ya özgü yöntem bilgileri takip edilerek gerçekleştirildi (www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf 2009, Ribot vd. 2006).

3.2.1 Suşların hazırlanması

LB Broth besiyerine %1'lik ekimi yapılan DMC kodlu 98 adet *Salmonella* serotipi, her çalışma için 10'ar suş ve bir adet standart suş *S. Braenderup* H9812 olmak üzere 37 °C'de 17-18 saat arasında geliştirildi. Geliştirilen bakterilerin optik yoğunluğu 610 nm'de 0.8 ile 1.0 arasında olacak şekilde ayarlandı. Yoğunlukları belirlenen bakteri kültürleri, 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri içerisinde (toplam hacim 1.0 ml) +4°C, 10.000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj işlemine tabi tutuldu. Üst faz atılarak hücre çökeltisi 500 µl steril hücre süspansiyon tamponu (HST) ile çözüldü ve tekrar +4°C, 10.000 rpm'de 5 dk santrifüje alındı. Daha sonra üst faz atıldı. Hücre bütünlüğü parçalanmadan yıkanan bakteriler, 100'er µl HST ile pipet aracılığıyla karıştırıldıktan sonra agaroz tapalara gömülmeden önce +4°C'de 10 dk süreyle bekletildi.

3.2.2 Suşların agaroz tapalar içerisine gömülmesi

Bakterilerin süspansiyonunda kullanılan HST ile % 2'lik düşük erime ısılı agaroz (Low melt grade agarose, Bioshop) hazırlandı. 5 ml HST içerisinde 0.1 g düşük erime ısılı agaroz çözüldü ve oda sıcaklığında çok çabuk katılaştığı için 55 °C'ye ayarlı ısı bloğu üzerinde önceden ısıtılmış olan 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Çalışılan örnek sayısı kadar 500 µl'lik mikrosantrifüj tüpü ısı bloğu üzerine dizildi ve her bir tüp içerisine 100 µl düşük erime ısılı agaroz aktarıldı. Bakteriler, bekletildikleri +4 °C 'ten alınarak her bir örnek, ısı bloğu üzerindeki içerisinde 100'er µl düşük erime ısılı agaroz bulunan mikrosantrifüj tüplerine dağıtıldı. İşlem sırasında donmasını önlemek için ısı bloğu üzerinden uzaklaştırılmadan hızlı bir pipetleme sonucu homojenize edilip tek kullanımlık tapa kalıbındaki (Plug mold, 10 mm x 5 mm x 1.5 mm, BioRad, USA) kuyucuklara aktarıldı. Tapa kalıbı, bakterilerin gömüldüğü agaroz jel kalıplarının katılaşması için +4°C 'ye kaldırıldı ve Liziz/Proteinaz K ile yıkama aşaması için gerekli hazırlıklara geçildi.

3.2.3 Tapalara gömülen hücrelerin lizizi

Agaroz tapalar +4°C'de polimerize olurken 15 ml'lik Falcon tüp içerisinde çalışılan suş sayısına eşdeğer olarak, önce 1'er ml liziz tamponu, sonra -20°C'de saklanan Proteinaz K (20.2 mg/ml Fermentas, 1ml) örnek başına 5 µl (son konsantrasyon 0.1 mg/ml) ilâve edildi (10 örnek ve 1 standart suş için 11 ml liziz tamponuna 55 µl proteinaz K). Pipet aracılığı ile homojenize edilen karışım, örnek sayısı kadar kullanılan 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine 1'er ml dağıtıldı. Bu arada +4°C'de polimerizasyonu tamamlanan agaroz tapaların her biri dikkatli bir şekilde spatulayla itilerek önceden Liziz/Proteinaz K karışımı eklenmiş mikrosantrifüj tüplerine düşmeleri sağlandı. Örnekler bu aşamada 50°C'de 200 rpm'de çalkalamalı inkübatöre alındı ve 2 saat süreyle çalkalama işlemine tabi tutuldular.

3.2.4 Saf DNA eldesi için agaroz tapaların yıkanması

Çalkalamalı inkübatörde 50 °C’de 200 rpm’de 2 saat süreyle liziz işlemine alınan agaroz tapalar, bir cam petri kapağı üzerinde sırayla Liziz/Proteinaz K karışımlarından dikkatlice ayrılarak, önceden etüvde 175 °C’de 3 saat süreyle steril edilmiş cam tüplere aktarıldı. Her bir tapanın içerisinde bulunduğu steril cam tüplere önceden 54 °C’ye ısıtılmış steril dH₂O’dan 5’er ml dağıtıldı ve örnekler 2 kere 15’er dk’lık yıkama işlemine alındı. Steril dH₂O ile yıkama tamamlandıktan sonra örnekler, yine önceden 54 °C’ye ısıtılmış 0.5M TE tamponundan 5’er ml dağıtılarak 4 kere 15’er dk’lık yıkama işlemine alındı. Yıkamalar sonunda elde edilen ve içerisinde saf DNA bulunan agaroz tapalar, içerisinde 1 ml 0.5M TE tampon bulunan 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine alındı ve XbaI restriksiyon enzimi ile kesime hazır hale geldi.

3.2.5 Tapalara XbaI restriksiyon endonükleaz kesimi uygulanması

İlk önce XbaI restriksiyon endonükleazı (Fermentas FastDigest) –20°C’den alındı ve steril ortamda çalışılarak, örnek sayısı ve standart suş için gerekli olan toplam hacimde hazırlandı. Bir mikrosantrifüj tüpüne, örnek başına 89 µl steril saf su, 5 µl FastDigest tamponu, 1 µl BSA ve en son olarak 5 µl XbaI enzimi konuldu. Bu işlemten sonra, her bir örneğin agaroz tapası, içlerine gömülmüş haldeki saf DNA’nın XbaI restriksiyon endonükleaz enzim kesimine tabi tutulması için 4 eşit parçaya ayrıldı. Kesim işlemi bir petri kapağı üzerinde gerçekleştirildi. Kesilen her örneğin 1/4’lük parçası yeni bir steril mikrosantrifüj tüpüne (1.5 ml) aktarıldı. Geri kalan 3/4 parça, önceki tüpüne geri konularak üzerine TE tamponu eklendi ve +4 °C’ye kaldırıldı. Standart suş S. Braenderup’a ait agaroz tapa 4’e bölünerek, her bir parça ayrı mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Böylece örneklerle beraber toplam 14 adet mikrosantrifüj tüpü oldu. Buna göre hazırlanmış olan toplam 1400 µl hacimdeki XbaI enzim karışımı, her örnek ve standart suş tapası için 100’er µl olacak şekilde paylaştırıldı. Bütün tapalara 100’er µl enzim eklendikten sonra, tüpler XbaI enziminin optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C’de 1 saat süreyle su banyosunda inkübasyona alındı. 1 saat sonunda su banyosundan çıkarılan örnekler, petri kapağı içerisinde kurutma kağıdına emdirilerek enzimlerinden arındırıldı ve mikrosantrifüj tüplerine konuldu. Enzimlerinden arındırılan tapaların

üzerine enzim çalışmasının durdurulması için 500'er µl 0.5XTBE tampon ilâve edilerek oda sıcaklığında 175 rpm'de çalkalamaya alındı.

XbaI Toplam Enzim Karışımı (Fermentas FastDigest,Thermo Scientific, 300µl) (Bir tapa için 100 µl)

dH ₂ O	89 µl
FastDigest Tamponu	5 µl
BSA	1 µl
XbaI	5 µl

BSA (Sığır serum albümin) Çözeltisi	10 mg/ml
-------------------------------------	----------

BSA (Bioshop,CA)	0.05g
dH ₂ O	5ml

Toz halindeki BSA (Bioshop, Canada) tartıldıktan sonra steril dH₂O ile BSA stok çözeltisi (10mg/ml) hazırlanmıştır. Toplam miktar (5 ml) 0.5ml'lik mikrosantrifüj tüplerine paylaştırılarak -20°C'de saklanmıştır.

0.5XTBE Tamponu	50 ml
-----------------	-------

10XTBE Tamponu	2.5 ml
dH ₂ O	47.5 ml

3.2.6 CHEF DR-III cihazında *Salmonella*'ya özgü jel yükleme koşulları

CHEF DRIII (BioRad) cihazını elektroforez için hazırlama işleminde ilk olarak tank 2000 ml ultra saf suyla doldurulup yaklaşık 15 dk boyunca elektrik akımı çalıştırılmadan, sadece suyun pompalanması sağlandı. Böylece her çalışma öncesinde tankın temizliği yapıldı. Saf su boşaltıldıktan sonra, elektroforez için koşturma tamponunu hazırlamak üzere 10XTBE stok çözeltisinden 100 ml alınıp üzerine 1900 ml ultra saf su ile % 10'luk tiyoüre çözeltisinden 3 ml ilâve edildi. Böylelikle toplamda 2000ml'lik 0.5XTBE + tiyoüre tampon çözeltisi hazırlandı. Bu tampondan 100ml'lik miktar, hazırlanacak olan PFGE agaroz (High gel grade, Bioshop) için ayrıldı ve geri kalan 1900ml 0.5XTBE+tiyoüre tamponu elektroforez tankına döküldü. CHEF DRIII cihazı 14 °C'ye soğuması için pompa çalıştırıldı.

XbaI Enzimi için *Salmonella* 'ya Özgü Elektroforez Koşulları

Başlangıç Darbesi	2.2 s
Bitiş Darbesi	63.8 s
Voltaj	6V
Yönlendirme Açısı	120°
Koşu süresi	18 sa

Elektroforez için % 1'lik PFGE agaroz jeli hazırlandı. 1 gr agaroz, ayrılmış bulunan 100 ml 0.5XTBE+tiyoüre çözeltisine eklendi. 10 dk boyunca mikrodalgada belirli aralıklarla çalkalanıp eritildi. Erime tamamlandıktan sonra soğumak üzere oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler çalkalamadan alınarak, petri kapağı üzerinde, 0.5XTBE tamponlarından kurutma kağıdı yardımıyla arındırıldı. Diğer yanda agaroz kasedi hazırlandı ve 15 kuyucuklu tarak agaroz kasedi üzerine yatay olarak yerleştirildi. Her çalışmada, tarak üzerindeki 10 kuyu örneklerle ayrıldı; 1-5-10-15 numaralı kuyulara çalışmanın standart suşu olan *S. Braenderup*; 14 numaralı kuyuya da Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs-5 µg/ml) yerleştirildi. Örnek tapaları, yatay haldeki tarak üzerinde her dişin en ucuna getirildi. Diğer yanda yaklaşık 50-55 °C'ye soğuyan agaroz, tarak dikey konuma getirildikten sonra, baloncuk oluşmamasına dikkat edilerek

döküldü. Agaroz oda sıcaklığında 20dk boyunca soğutulup, polimerize oldu. Agarozu dikey olarak gömülü durumdaki tarak yavaşça yukarı çekildi ve agarozdan çıkarıldı. Tarak çıkarıldıktan sonra 14 numaralı kuyuya Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs-5 µg/ml) bistüri yardımıyla 1 mm kalınlığında kesilerek dikkatlice konuldu. Jel, altındaki tablası ile birlikte kaydırılarak çıkarıldı ve etrafındaki atık agaroz jel parçaları temizlendikten sonra 14°C'ye soğutulmuş tankın içerisindeki bölmesine yerleştirildi. Sistem çalıştırıldı ve alternatif akım (AC) göstergesindeki rakamın başlangıçta 110-170 miliamper arasında olması gözlemlendi ve rakam, 0.5XTBE koşturma tamponunun uygun hazırlanıp hazırlanmadığının göstergesi olması bakımından dikkate alınarak not edildi. Çalışma, 18 saatlik elektroforez koşusu sonrasında ertesi gün jel görüntüsü alınacak şekilde 1 gece boyunca devam ettirildi.

3.2.7 PFGE jel görüntülerinin alınması

Çalışmanın ertesi gününde tanktan çıkarılan jel, etidyum bromid (10 mg/ml) ile hazırlanan çözeltiye alınarak 40 dk süreyle bekletildi. Çalışma bitiminde PFGE tankı içerisindeki 0.5XTBE tampon boşaltıldı; yerine 2000 ml ultra saf su konularak tankın yıkaması yapıldı ve temizlendi. Jel, etidyum bromidin arındırılması ve görüntü alınırken bant profilleriyle arka plan arasındaki kontrastın kuvvetini artırmak için 1 saat içinde her 20 dk'da bir değiştirilecek şekilde ultra saf su içerisine alındı.

Etidyum Bromid Çözeltisi

Etidyum Bromid (Stok 10mg/ml)	50µl
dH ₂ O (Ultra saf)	500ml

Jel görüntüleri Kodak Gel Logic Imaging System kullanılarak alındı. DNA bant görüntüleri, TIFF formatında kaydedildikten sonra analiz edildi. Normalizasyon işlemi, her jel içerisindeki 1-5-10-15 numaralı kuyularda bulunan standart suş *S. Braenderup* H9812 yardımı ile gerçekleştirildi. Bant büyüklükleri, standart suş ile karşılaştırılarak hesaplandı. Suşlar arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesi için çok değişkenli küme analizi (Cluster Analysis) yöntemi, NTSYS pc. ver. 2.2 programı (Rohlf 1993) ile

kullanıldı ve UPGMA (Unweighted pair group method with mathematical averaging) dendogramı çizildi.

3.2.8 Simpson nümerik ayırlandırma indeksi

Çalışmamız, en son olarak Simpson nümerik ayırlandırma indeksi (Simpson's numerical discriminatory index) hesaplamasıyla değerlendirildi (Simpson 1949, Hunter ve Gaston 1988, Gebreyes vd. 2006, Soyer vd. 2010). Simpson indeksi (D), Hunter ve Gaston (1988) tarafından belirtildiği üzere; bir örnek populasyonundan alınan birbirleriyle ilişkisiz iki suşun, belirli bir yöntemle farklı profillere ayırlandırılma olasılığını vermektedir. N toplam örnek sayısı, s tespit edilen profil sayısı, n_j ise j profiline ait suş sayısıdır (Şekil 3.1).

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

Şekil 3.1 Simpson nümerik ayırlandırma indeksinin formülasyonu

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Elde Edilen PFGE Profillerinin Karşılaştırılması ve Filogenetik Analizi

Çalışılan 98 adet DMC kodlu *Salmonella* serotipi için, 36 farklı PFGE profili belirlendi. Suşların kendi içlerindeki profil grupları, her bant değişikliği farklı profil grubu oluşturacak şekilde düzenlendi (Çizelge 4.1). Bu gruplandırma sistemine göre birden fazla profil grubu içerenler; *S. Agona* (3), *S. Corvallis* (2), *S. Enteritidis* (3), *S. Group C1* (3), *S. Infantis* (2), *S. Kentucky* (3), *S. Montevideo* (4), *S. subsp. Roughform* (3), *S. Thompson* (3), *S. Virchow* (3) serotipleridir. Serotipler arasındaki en yüksek profil çeşitliliği % 100 ile *S. Montevideo*; % 60 ile *S. Agona*; % 37.5 ile *S. Group C1*; % 30 ile *S. Kentucky* suşları içerisinde elde edildi. En fazla suş sayısına sahip profil grupları ENT 3 (12); INF 2 (8); KEN 1 (8); VİR 3 (8) olarak belirlendi.

Çizelge 4.1 Serotiplerin oluşturduğu PFGE profil grupları

Serotip	Profil Kodu	Suş Kodu
<i>S. Agona</i>	AGO 1	DMC 59
	AGO 2	DMC 60
	AGO 3	DMC 61, DMC 62, DMC 64
<i>S. Anatum</i>	ANA	DMC 90, DMC 91, DMC 92
<i>S. Bispebjerg</i>	BİSP	DMC 78
<i>S. Braenderup</i>	BRA	-
<i>S. Corvallis</i>	COR 1	DMC 36, DMC 86, DMC 87
	COR 2	DMC 100

Çizelge 4.1 Serotiplerin oluşturduğu profil grupları (devam)

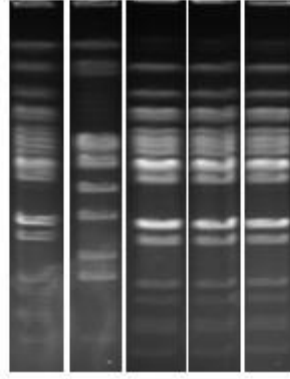
Serotip	Profil Kodu	Suş Kodu
S. Enteritidis	ENT 1	DMC 8, DMC 14
	ENT 2	DMC 28, DMC 29
	ENT 3	DMC 3, DMC 22, DMC 24, DMC 25, DMC 26, DMC 30, DMC 31, DMC 43, DMC 53, DMC 94, DMC 96, DMC 98
S. Group C1	GrC 1	DMC 1, DMC 2, DMC 46
	GrC 2	DMC 27, DMC 37, DMC 38, DMC 50
	GrC 3	DMC 49
S. Infantis	INF 1	DMC 7, DMC 12, DMC 71, DMC 75, DMC 76, DMC 77
	INF 2	DMC 20, DMC 21, DMC 23, DMC 40, DMC 41, DMC 57, DMC 58, DMC 70
S. Kentucky	KEN 1	DMC 56, DMC 65, DMC 72, DMC 73, DMC 74, DMC 79, DMC 80, DMC 85
	KEN 2	DMC 34
	KEN 3	DMC 35
S. Montevideo	MON 1	DMC 81
	MON 2	DMC 82
	MON 3	DMC 88
	MON 4	DMC 89
S. Nchanga	NCH	DMC 15, DMC 99

Çizelge 4.1 Serotiplerin oluşturduğu profil grupları (devam)

Serotip	Profil Kodu	Suş Kodu
S. subsp. I Roughform	SUR 1	DMC 13
	SUR 2	DMC 52, DMC 54
	SUR 3	DMC 63
S. Salford	SAL	DMC 93
S. Senftenberg	SNF	DMC 55
S. Telaviv	TEL	DMC 66, DMC 67
S. Thompson	THO 1	DMC 39, DMC 44, DMC 47, DMC 48
	THO 2	DMC 45
	THO 3	DMC 51
S. Typhimurium	TYP	DMC 4, DMC 95
S. Virchow	VİR 1	DMC 5
	VİR 2	DMC 6, DMC 19, DMC 32, DMC 42, DMC 83, DMC 84
	VİR 3	DMC 9, DMC 10, DMC 16, DMC 17, DMC 18, DMC 33, DMC 68, DMC 69

Çalışmada XbaI enzim kesimi ile elde edilen PFGE profillerinin birbirleriyle olan filogenetik ilişkileri; NTSYS pc. ver. 2.2 programı ile %1,5 Dice benzerlik katsayısı kullanılarak (Dice 1945, Ribeiro vd. 2007) ve UPGMA metoduyla küme analizi (Sneath ve Sokal 1973) yapılarak belirlendi. Çalışılan jel görüntüleri, her jelde DMC kodlarındaki sıraya göre 10'ar adet örnek olacak şekilde düzenlendiği için; yorumlama aşamasında farklı jellerdeki aynı serotipe ait olan kuyular, fotoğraflardan kesilip yan yana dizilerek bant profillerindeki benzerlikler incelendi.

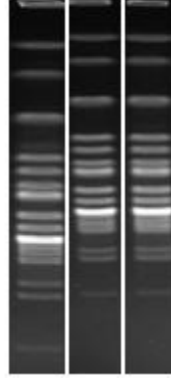
S. Agona (DMC 59-60-61-62-64)



Şekil 4.1 S. Agona serotipinin PFGE bant profilleri

S. Agona suşlarının XbaI enzim kesimi sonucunda oluşturdukları 3 farklı profil grubu incelendiğinde; 11 ile 15 arasında bant sayısı verdikleri gözlemlendi. Bant büyüklüklerinin ise 8 kb ve 1110 kb arasında çeşitlilik gösterdiği saptandı. Çalışmamızda oluşan tüm S. Agona profil gruplarının aralarında 6 ortak banda sahip oldukları belirlendi ve ayrıca ikiyeşerli paylaşılan bantlar ile suşa özgü bantlar tespit edildi. AGO 2 profil grubuna ait DMC 60 suşunda bulunan 667 kb'lık bant; AGO 1 profil grubundaki DMC 59 ile AGO 3 profil grubundaki DMC 61, DMC 62, DMC 64 suşlarında bulunmadı. Diğer yandan, sırasıyla AGO 1 ile AGO 2 profil gruplarını oluşturan DMC 59 ve DMC 60 suşlarında bulunan ~1110 kb'lık bant AGO 3 profil grubundaki suşlarda tespit edilmedi. En göze çarpan fark, diğer profil gruplarında bulunup, AGO 2 grubunda bulunmayan ~543 kb, ~448 kb, ~414 kb ve ~362 kb'lık bant bölgeleri oldu. Bu yüzden AGO 2 profil grubu, S. Agona'ya ait gruplar içinde en farklı grup olarak belirlendi. Bu çalışmada elde edilen bant profillerinin, XbaI enzim kesimi sonucunda oluşan PFGE bant profillerini içeren literatür verileriyle uygun olduğu belirlendi (Lindqvist vd. 2002, Rabsch vd. 2005). AGO 1 grubu ile AGO 2 AGO 1 grubu, AGO 3 ile % 96,5 benzerlik oranına sahipken; AGO 1 ile AGO 2 arasındaki oran % 46; AGO 2 ile AGO 3 arasında % 40 olarak belirlendi. AGO 1 ve AGO 2, sırasıyla % 46,1 ve % 45,4 oranında S. Telaviv (TEL) ile; AGO 3 de % 42,8 oranında S. Nchanga (NCH) ile benzer bulundu (Çizelge 4.1, Şekil 4.1 ve Şekil 4.19).

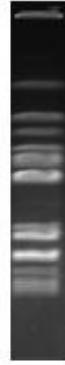
S. Anatum (DMC 90-91-92)



Şekil 4.2 *S. Anatum* serotipinin PFGE bant profilleri

S. Anatum suşları homojen bir profil sergilerken (ANA); elde edilen bant profilinin Xia vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada belirtilen bant profili ile yüksek oranda benzerlik taşıdığı tespit edildi. Profilde, büyüklükleri 15 kb ile 1100 kb arasında değişen 15 bant görüntülendi. Çalışmamızda, *S. Anatum* ile en yüksek profil benzerliğini % 37.5 ile *S. Typhimurium* (TYP) ve % 30 ile *S. Virchow* (VİR 2) suşları gösterdi (Çizelge 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.19) .

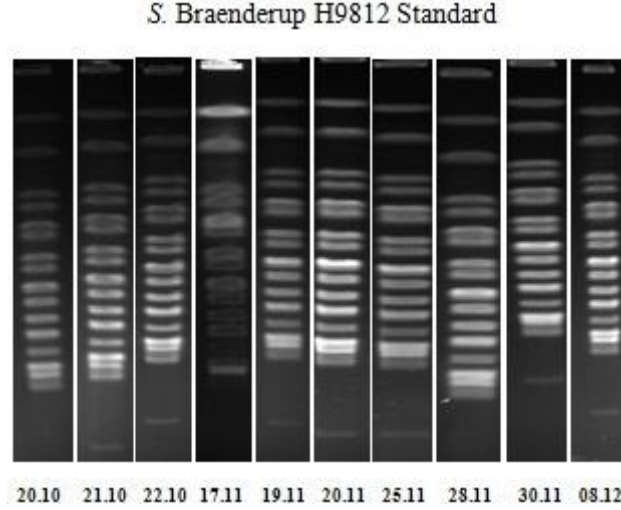
S. Bispebjerg (DMC 78)



Şekil 4.3 *S. Bispebjerg* serotipinin PFGE bant profili

Türkiye’de ilk defa Aksoyca (1970) tarafından kaplumbağanın dışkı kültüründen izole edilen *S. Bispebjerg* (BİSP) suşunun çalışmamızda diğer suşlar ile arasındaki filogenetik ilişki incelendi. UPGMA küme analizi ile elde edilen filogenetik ağaçta BİSP profilinin, A kolunda tek başına bir ana dal oluşturduğu gözlemlendi.

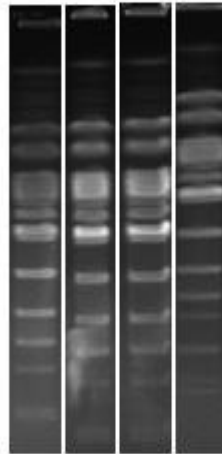
BİSP profilinde, büyüklükleri 25 ile 697 kb arasında 15 bant görüntülendi. Elde edilen bant profili, Avşaroğlu'nun (2007) çalışmasındaki profile büyük oranda benzer bulundu. BİSP profilinin, diğer suşlar arasında en çok benzerlik gösterdiği profil % 32,6 ile KEN 3 olarak tespit edildi (Çizelge 4.1, Şekil 4.3 ve Şekil 4.19).



Şekil 4.4 *S. Braenderup* serotipinin PFGE bant profilleri

Çalışmamızdaki tüm PFGE jellerinde, standart suş olarak kullanılan *S. Braenderup* H9812'nin standardize edilmiş bant büyüklükleri baz alınarak (Hunter vd. 2005); çalışılan örneklerin bant hesaplamaları yapıldı. *S. Braenderup* (BRA) suşu, UPGMA analizinde dış grup olarak yer aldı (Çizelge 4.1, Şekil 4.4 ve Şekil 4.19).

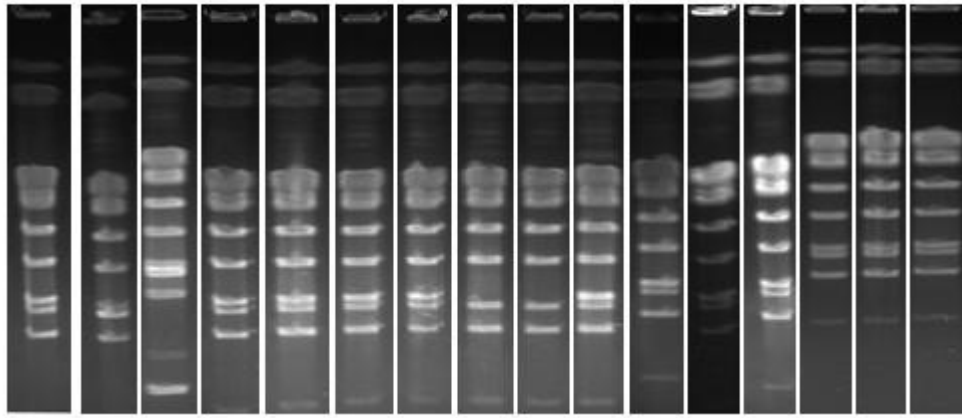
S. Corvallis (DMC 36-86-87-100)



Şekil 4.5 *S. Corvallis* serotipinin PFGE bant profilleri

S. Corvallis suşlarının COR 1 ve COR 2 profil gruplarında 15'er bant elde edildi. Bant büyüklükleri, < 3 kb ve 1090 kb arasında çeşitlilik gösterdi. Profil gruplarında 14 bant ortaklığı ile 1 bantta farklılık gözlemlendi. Çalışmamızın sonuçları literatür verileriyle desteklendi (Lai 2009). COR 1 ve COR 2 grupları arasında % 93,3 benzerlik oranı tespit edildi. Her iki grup da % 44,4 oranında *S. Enteritidis* (ENT 1) profili ile; % 38,4 oranında ENT 3 ve SUR 1 profilleriyle benzer bulundu (Çizelge 4.1, Şekil 4.5 ve Şekil 4.19).

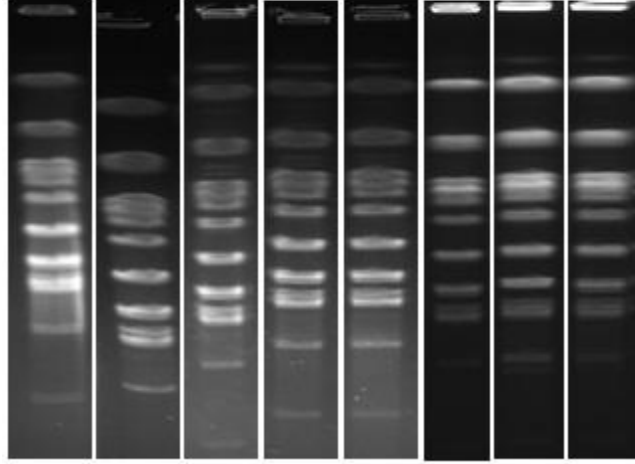
S. Enteritidis (DMC 3-8-14-22-24-25-26-28-29-30-31-43-53-94-96-98)



Şekil 4.6 *S. Enteritidis* serotipinin PFGE bant profilleri

S. Enteritidis'in ENT 1, ENT 2 ve ENT 3 şeklinde oluşan profil grupları, aralarında 11 ortak bant içerirken; 24 kb ile 1080 kb aralığında bant büyüklükleri gözlemlendi. Bant sayıları 12 ile 13 arasında değişiklik gösterdi. Profillerin literatürdeki çalışmalarla uyumlulukları karşılaştırıldı ve yüksek oranda tutarlı oldukları bulundu (Kalender ve Şen 2008, Zou vd. 2012). ENT 1 ve ENT 2 % 81,8 oranında; ENT 1 ve ENT 3 % 86, 9 oranında; ENT 2 ve ENT 3 % 95,2 oranında benzerlik gösterdi. Avşaroğlu (2007) tarafından yapılan çalışmada *S. Enteritidis* ve *S. subsp. I Roughform* serotipleri arasındaki PFGE profillerinin benzerliği dair elde edilen bulgular; çalışmamızdaki ENT 1 ile SUR 1 arasında % 43,4; ENT 2 ile SUR 1 arasında % 28,5; ENT 3 ile SUR 1 arasında %36,3 oranında benzerlik bulunarak doğrulandı. *S. Enteritidis*'in ENT 2 profilinde bulunmayan ~54kb'lık bant ile ENT 1 profilinde bulunmayan ~660kb bant farklılıkları, evrimsel süreçte meydana gelen kromozomal insersiyon ve delesyonlar ile plazmid profil farklılıkları olarak yorumlandı (Çizelge 4.1, Şekil 4.6 ve Şekil 4.19).

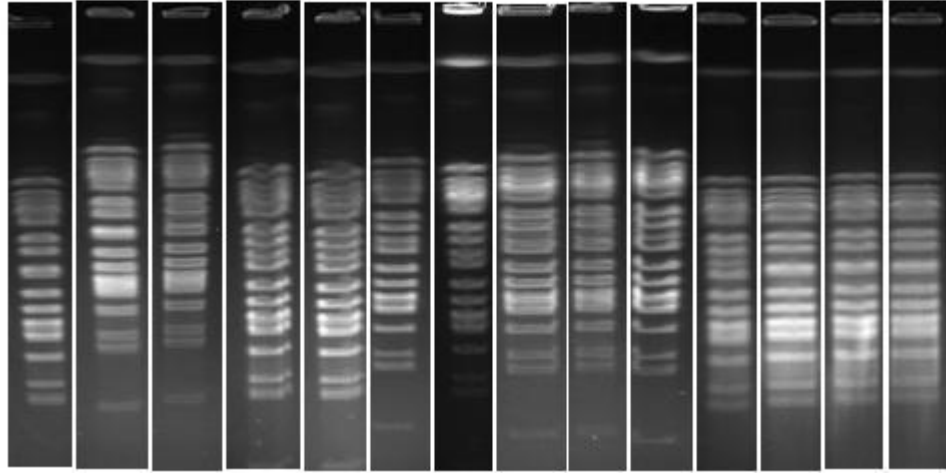
S. Group C1 (DMC 1-2-27-37-38-46-49-50)



Şekil 4.7 S. Group C1 serotipinin PFGE bant profilleri

S. Group C1 serotipinde oluşan 3 farklı profil grubunun kendi aralarındaki benzerlik oranları; GrC 1 ile GrC 2 arasında % 96; GrC 1 ile GrC 3 arasında % 92,3; GrC 2 ile GrC 3 arasında % 96,3 şeklinde belirlendi. S. Group C1 suşlarının bant büyüklüklerinin 15 kb ile 1100 kb aralığında; bant sayılarının 12 ile 14 arasında olduğu gözlemlendi. Suşların en yakın ilişkili bulunduğu suş olarak S. Thompson belirlendi. Çalışmamızda elde edilen bant profilleri ve Group C1'in S. Thompson ile benzerliğini gösteren sonuçlar; az sayıdaki literatür verileri ve Avrupa Hastalık Kontrol Merkezleri (ECDC) tarafından sunulan bulaşıcı hastalık raporları (Communicable disease threats report) ile tutarlılıklar gösterdi (Avşaroğlu 2007, Chiu vd. 2010, Anonymous 2012b). GrC 1 ve GrC 2 profillerine en yüksek oranda benzeyen S. Thompson profilleri sırasıyla % 75 ve % 72 olmak üzere THO 2; GrC 3 için ise % 74 ile THO 3 olarak belirlendi (Çizelge 4.1, Şekil 4.7 ve Şekil 4.19).

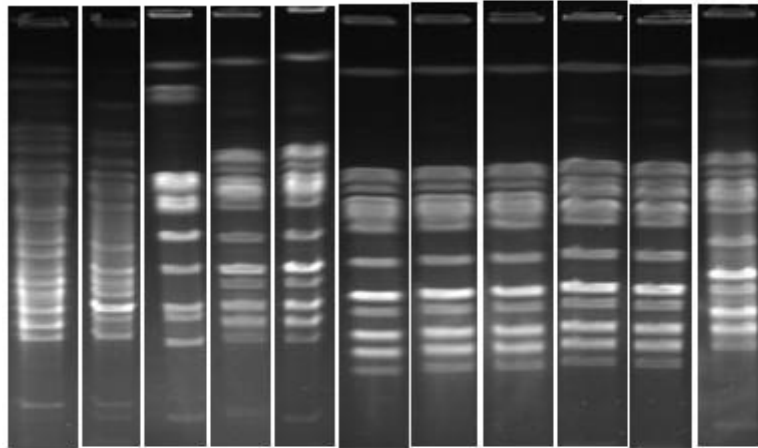
S. Infantis (DMC 7-12-20-21-23-40-41-57-58-70-71-75-76-77)



Şekil 4.8 *S. Infantis* serotipinin PFGE bant profilleri

S. Infantis, çalışmada *S. Enteritidis* ve *S. Virchow*'dan sonra en fazla suş sayısına sahip serotip olarak; 2 farklı profil grubu gösterdi. Profiller INF 1 ve INF 2, 17 adet bant ortaklığı gösterip; bant büyüklüklerinde 13 kb ile 1110 kb arasında değerler saptandı. Bu veriler, dünyada *S. Infantis*'in PFGE ile suş tanımlamasının yapıldığı çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu bulundu (Lindqvist ve Pelkonen 2007, Miller vd. 2010, Soyer vd. 2010, Abbasoğlu ve Akçelik 2011). INF 1 ile INF 2'nin % 97,1 oranında benzerlik gösterdiği; INF 1 ile en yakın ilişkili suşların ise % 38,7 oranında benzerlikle *S. Kentucky* (KEN 1) ve *S. Thompson* (THO 3) oldukları belirlendi (Çizelge 4.1, Şekil 4.8 ve Şekil 4.19).

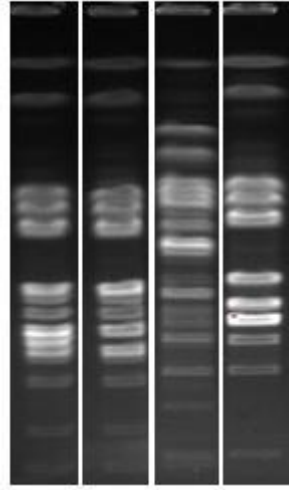
S. Kentucky (DMC 34-35-52-56-65-72-73-74-79-80-85)



Şekil 4.9 *S. Kentucky* serotipinin PFGE bant profilleri

S. Kentucky suşları, kendi içinde KEN 1, KEN 2 ve KEN 3 olmak üzere 3 ayrı profil grubuna ayrıldı. KEN 1 ve KEN 2 % 51,6; KEN 1 ve KEN 3 % 48,2; KEN 2 ve KEN 3 %52,9 oranında benzerlik gösterdi. 13 ile 18 arasında bant sayısı gösteren suşlarda 5 adet bant ortaklığı ile 23 kb ve 1110 kb arasında değişen bant büyüklükleri tespit edildi. Elde edilen profillere dair sonuçların literatür verileriyle uygunluğu tespit edildi (Le Hello vd. 2011). En yakın ilişkide oldukları tespit edilen suşlar sırasıyla; KEN 1 için % 44,4 ile S. Montevideo (MON 1) ve % 40 ile S. Thompson (THO 2); KEN 2 için % 43,7 ile MON 1, % 36,3 ile S. Salford (SAL); KEN 3 için % 50 ile THO 2, % 44,4 ile MON 3 şeklinde belirlendi (Çizelge 4.1, Şekil 4.9 ve Şekil 4.19).

S. Montevideo (DMC 81-82-88-89)

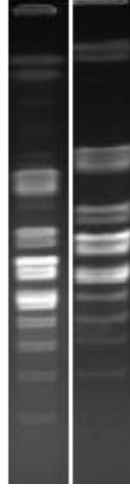


Şekil 4.10 S. Montevideo serotipinin PFGE bant profilleri

S. Montevideo, serotip bazında en yüksek (% 100) profil çeşitliliğine sahip suş olarak belirlendi ve 4 örnek için 4 farklı profil grubu tanımlandı. MON 1 ile MON 2 % 96,3; MON 1 ile MON 3 % 58,8; MON 1 ile MON 4 % 80; MON 2 ile MON 3 % 60,6; MON 2 ile MON 4 % 83,3; MON 3 ile MON 4 % 51,6 oranında benzerlik gösterdiler. Bu sonuçlara göre MON 3 profil grubuna dahil olan DMC 88 kodlu suş, diğerlerinden daha farklı bant profili sergiledi. Çalışmada elde edilen bant profili sonuçları, literatür verileriyle de desteklendi (Threlfall vd. 1999b, Liebana vd. 2001). Örnekler, 3 kb ile 1110 kb arasında değişen büyüklüklerde ve 11 ile 20 arasındaki sayılarda bantlar verdi. En yakın ilişkili suşlar; MON 1 için % 44,4 ile KEN 1; MON 2 için % 40 ile GrC 1 ve SUR 1; MON 3 için %44,4 ile KEN 3; MON 4 için % 36,3 ile SUR 1 olarak tespit

edildi. MON 1 (DMC 81) profilinde yer alıp, MON 4 profilinde bulunmayan ~110 kb ve ~50 kb'lık bant bölgeleri görüldü (Çizelge 4.1, Şekil 4.10 ve Şekil 4.19).

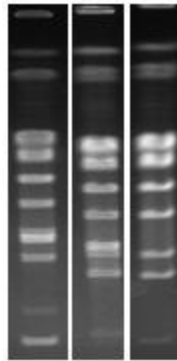
S. Nchanga (DMC 15-99)



Şekil 4.11 *S. Nchanga* serotipinin PFGE bant profilleri

S. Nchanga (NCH) serotipinin içerdiği iki suş da aynı bant profilini verdi. Suşlarda 5 kb'dan 1090 kb büyüklüğe kadar 14 adet bant tespit edildi. Dünya gıda sektöründe *S. Nchanga* son zamanlarda özellikle ton balığı konservelerinde ve suşi üzerinde tespit edilmiştir (Anonymous 2012a). Bu serotipe dair PFGE ile suş tanımlaması yapılmış az sayıdaki çalışmaya dayanarak; bu çalışmada elde edilen profilin tutarlılığı belirlendi (Avşaroğlu 2007). Çalışmamızda, NCH profiline en yakın ilişkili grup olarak % 41,3 ile *S. Agona* (AGO 1) grubu gösterildi (Çizelge 4.1, Şekil 4.11 ve Şekil 4.19).

S. subsp. I Rough Form (DMC 13-54-63)



Şekil 4.12 *S. subsp. I Roughform* serotipinin PFGE bant profilleri

S. subsp. I Roughform suşları DMC 13, DMC 54 ve DMC 63'e ek olarak, *S. Kentucky*'e ait olan DMC 52 suşu, *S. subsp. I Roughform* profiline sahip bulunduğu için (Avşaroğlu 2007), toplamda 4 adet suş olarak değerlendirmeye alındı. Üç farklı profil grubuna ayrılan *S. subsp. I Roughform* serotipinin, bant büyüklükleri 23 kb ile 1090 kb, bant sayıları 11 ile 12 arasında değişiklik gösterdi. SUR 3 grubunun diğer profil gruplarında bulunan ~52 kb'lık bölgeye sahip olmadığı görüldü. SUR 1 grubunda ise diğer profillerde görülen ~744 kb büyüklüğündeki bant bulunmadı. Literatürde az sayıda PFGE yöntemiyle tanımlama çalışması bulunan serotipin bant profillerinin ve *S. Kentucky* profili ile olan benzerliğini gösteren verilerin, Avşaroğlu (2007) tarafından elde edilen sonuçlarla uyumlu oldukları belirlendi. Oluşan profil gruplarının kendi aralarındaki benzerlikleri ele alındığında; SUR 1 ve SUR 2 % 95,6; SUR 1 ve SUR 3 % 90,9; SUR 2 ve SUR 3 % 95,6 oranında benzerlik gösterdi. *S. Enteritidis* profili (ENT 1), SUR 1 ve SUR 2 gruplarına en yakın ilişkili grup olarak sırasıyla, % 43,4 ile % 41,6 oranında benzerken; SUR 3 grubuna % 36,3 ile MON 4 grubu benzer bulundu (Çizelge 4.1, Şekil 4.12 ve Şekil 4.19).

S. Salford (DMC 93)

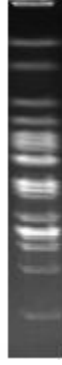


Şekil 4.13 *S. Salford* serotipinin PFGE bant profili

S. Salford (SAL) suşunun bant büyüklükleri 23 kb ile 548 kb aralığında bulunurken; bant sayısı 15 olarak belirlendi. Çalışmamızda kullandığımız DMC 93 kodlu *S. Salford* suşu daha önce Avşaroğlu (2007) tarafından çalışıldığı için; bu çalışmanın bulgularıyla profil karşılaştırması yapıldı. Tutarlılık gözlemlendi. Dünyada *S. Salford* serotipinin PFGE yöntemiyle tanımlanmasına dair çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. SAL, filogenetik ağaçta NCH suşu ile aynı kökenden dallandı; ancak benzerlik oranları % 36,3 ile

KEN 2; % 35,7 ile MON 2; % 34,5 ile NCH şeklinde belirlendi (Çizelge 4.1, Şekil 4.13 ve Şekil 4.19).

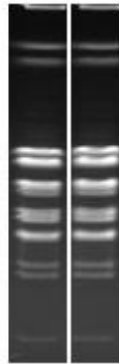
S. Senftenberg (DMC 55)



Şekil 4.14 *S. Senftenberg* serotipinin PFGE bant profili

S. Senftenberg (SNF), filogenetik ağaçta *S. Virchow* grupları ile aynı kökenden dallandı. Bant büyüklükleri, 24 kb ile 1100 kb arasında değişkenlik gösterdi. Bant sayısı 16 adet belirlendi. Dünyada *S. Senftenberg* serotipinin PFGE profillerinin elde edildiği çalışmalara bakıldığında, sonuçlarımızın yüksek oranda benzerlikler taşıdığı tespit edildi (Xia vd. 2009, Stepan vd. 2011). SNF profili, en yakın genotipik benzerliği % 37,5 oranında KEN 3 ile gösterirken; diğer benzerlikler % 35,3 ile VİR 2, VİR 3 ve KEN 2 olarak tanımlandı (Çizelge 4.1, Şekil 4.14 ve Şekil 4.19).

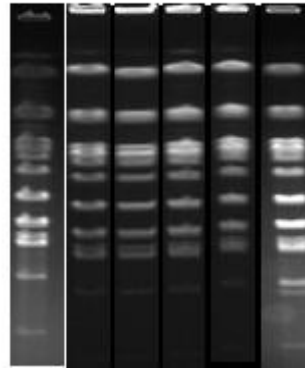
S. Telaviv (DMC 66-67)



Şekil 4.15 *S. Telaviv* serotipinin PFGE bant profilleri

S. Telaviv (TEL) suşları homojen bir profil sergileyip bant büyüklüğü aralıkları 24 kb ile 1110 kb arasında; bant sayıları ise 11 adet olarak belirlendi. Ayrıca, PFGE yöntemi ile *S. Telaviv* serotipinin suş tanımlamasına dair literatürde rapor edilmiş neredeyse hiçbir çalışmaya rastlanmadığından; elde ettiğimiz profil sonuçları daha önce Avşaroğlu (2007) tarafından yapılan çalışmada ortaya çıkan bant profilleriyle karşılaştırıldı. Tam olarak aynı bant profillerinin elde edildiği tespit edildi. Çalışmada, TEL grubunun, en fazla benzerlik gösterdiği gruplar % 46,1 ile AGO 1; % 45,4 ile AGO 2; % 40 ile AGO 3 ve % 35,7 ile INF 2 grupları olarak belirlendi (Çizelge 4.1, Şekil 4.15 ve Şekil 4.19).

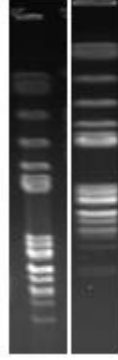
S. Thompson (DMC 39-44-45-47-48-51)



Şekil 4.16 *S. Thompson* serotipinin PFGE bant profilleri

S. Thompson suşlarının filogenetik ağaçta *S. Group C1* suşları ile aynı kökenden dallandığı gözlemlendi. THO 1 ve THO 2 grupları GrC 1 grubu ile sırasıyla % 72 ve % 75; THO 3 grubu da GrC 3 ile % 74 oranında benzer bulundu. THO gruplarının kendi içlerindeki benzerlik katsayıları THO 1 ve THO 2 arasında % 96; THO 1 ve THO 3 arasında % 92,3; THO 2 ve THO 3 arasında % 96 olacak şekilde belirlendi. THO gruplarının bant büyüklükleri 11 kb ile 1090 kb aralığında; bant sayıları 12 ile 13 arasında tespit edildi. Birbirlerine çok benzer bulunan *S. Thompson* gruplarında bant farklılıkları incelendi. THO 2 ile THO 3 profil gruplarını oluşturan suşların; THO 1 grubunda bulunan ~1090 kb'lık bant bölgesine sahip olmadıkları belirlendi. Ayrıca THO 3 profilindeki ~11 kb'lık bandın da diğer 2 grupta yer almadığı görüldü. Sonuçlar, literatür verileriyle uyumlu bulundu (Soyer vd. 2010) (Çizelge 4.1, Şekil 4.16 ve Şekil 4.19).

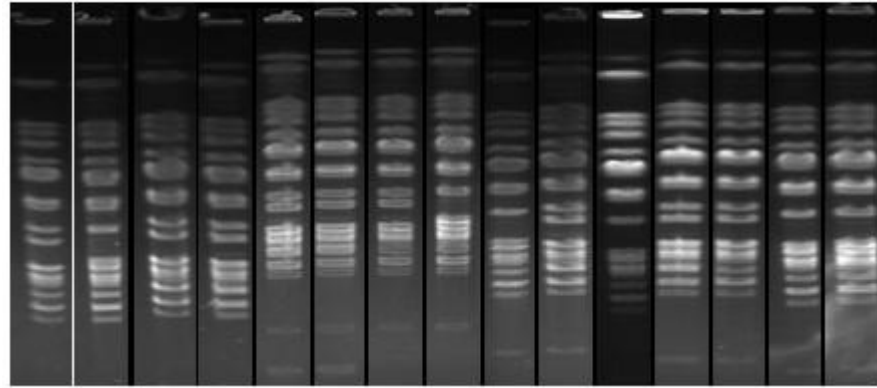
S. Typhimurium (DMC 4-95)



Şekil 4.17 *S. Typhimurium* serotipinin PFGE bant profilleri

Çalışmamızda kullanılan *S. Typhimurium* suşları tek profil grubu (TYP) oluşturdu. Bant aralığı 12 kb ile 872 kb arasında bulunurken; bant sayısı 18 adet belirlendi. Bu veriler, daha önce yapılmış benzer çalışmalarla tutarlılık sergiledi (Gaul vd. 2007, Abbassi-Ghozzi vd. 2012). Filogenetik ağaçta ANA grubu ile aynı kökenden dallanan TYP grubunun genotipik olarak en yakın ilişkili bulunduğu gruplar % 40 VİR 2; % 37,5 ANA; % 35,7 TEL olarak tespit edildi (Çizelge 4.1, Şekil 4.17 ve Şekil 4.19).

S. Virchow (DMC 5-6-9-10-16-17-18-19-32-33-42-68-69-83-84)



Şekil 4.18 *S. Virchow* serotipinin PFGE bant profilleri

Çalışmamızda *S. Enteritidis*'ten sonra en fazla çalışılan *S. Virchow* suşları için VİR 1, VİR 2 ve VİR 3 olmak üzere 3 ayrı profil grubu belirlendi. Bant sayıları 16 ile 18 arasında değişirken; bant büyüklüklerinin 25 kb ile 1100 kb aralığında oldukları tespit edildi. Daha önceki veriler ışığında, çalışmamızda elde edilen profil sonuçlarının benzer çalışmalarla tutarlı oldukları gözlemlendi (Weinberger vd. 2006). Çalışmamızda, tek

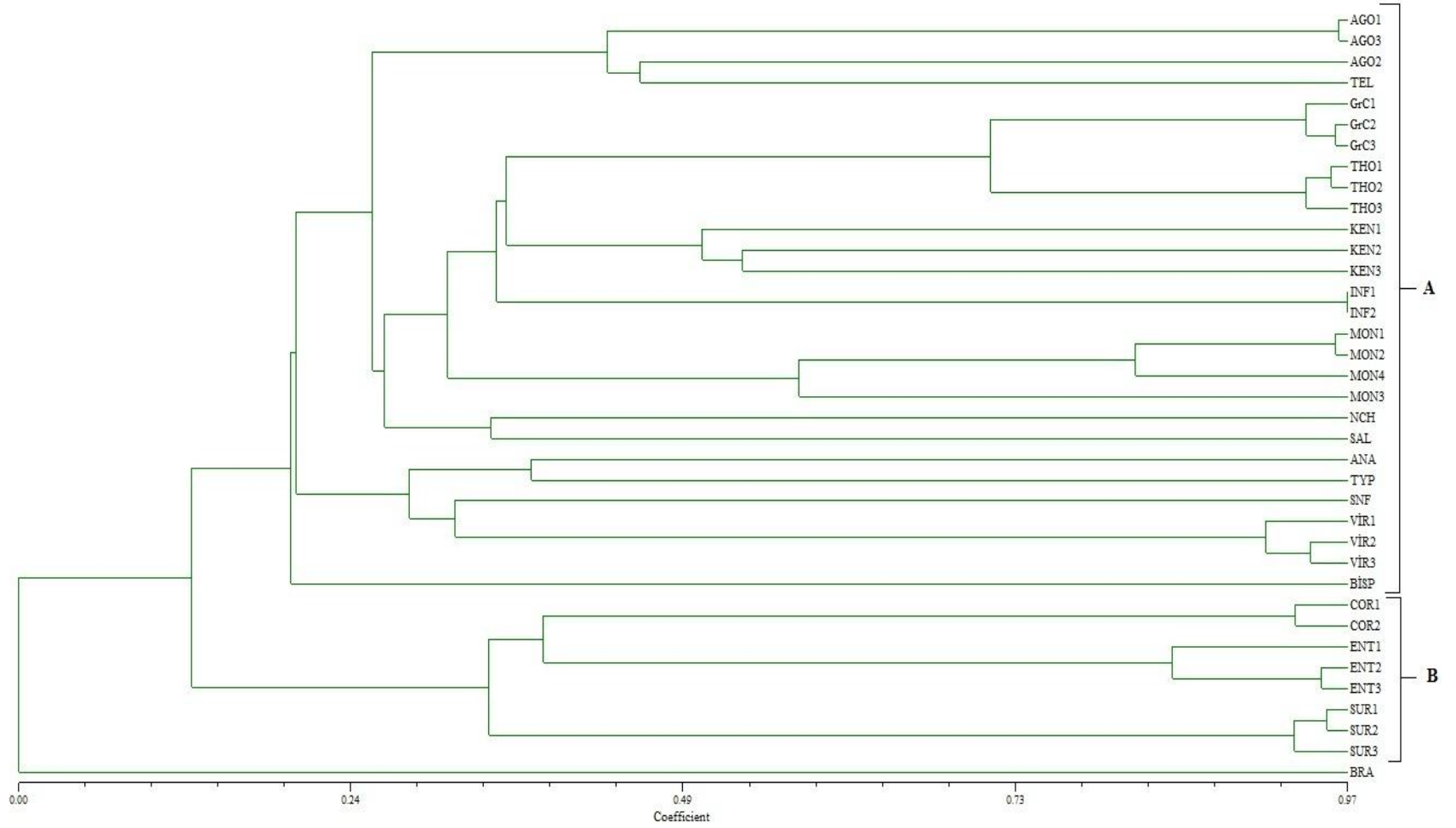
başına VİR 1 profil grubunu oluşturan DMC 5 kod numaralı suşun, diğer suşların bant profillerinden daha farklı olduğu görüldü. VİR 2 ve VİR 3 profil gruplarını oluşturan suşların neredeyse tüm bantlarının aynı olduğu; sadece 1 bant bakımından farklılık gösterdikleri tespit edildi. VİR 1 ile VİR 2 %88,2; VİR 1 ile VİR 3 % 94,1; VİR 2 ile VİR 3 % 94,4 oranında benzer bulundu. Genotipik benzerliği en yüksek bulunan gruplar arasında TYP grubu VİR 1 ile % 30,3; VİR 2 ile % 40; VİR 3 ile % 34,3 benzerlik oranına sahip bulundu. VİR 3 diğer iki gruptan farklı olarak en fazla benzerliği % 35,3 ile SNF grubuna gösterdi (Çizelge 4.1, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19).

Kümeleme analizi UPGMA yöntemiyle oluşturulan dendogramda tüm suşların PFGE profilleri arasında birbirleriyle en az %12,6 ile en fazla % 96,5 oranında benzerlik taşıdıkları belirlendi (Şekil 4.19).

PFGE profilleri gruplandırılırken, suşların birbirleriyle yakınlık derecelerinin belirlenmesi amacıyla sahip oldukları her bant değeri için “var” anlamındaki pozitif kod “1”, yok anlamındaki negatif kod “0” değerleri verilerek kantitatif verileri içeren bir veri dosyası oluşturuldu. Daha sonra bu veri dosyasındaki değişkenlerden yararlanılarak suşlar arasındaki ilişkiye göre benzerlik (similarity) matrisi oluşturuldu. Son aşamada ise benzerlik matrisi kullanılarak suşlar arasındaki uzaklıklara göre akrabalık ilişkilerini gösteren UPGMA dendogramı çizildi. Dendogramdan elde edilen veriler analiz edildiğinde çalışılan bütün suşların A ve B olarak 2 kola ayrıldığı; A kolunda S. Bispebjerg suşu (DMC78, BİSP) haricinde diğer bütün profil gruplarının bir dalda toplandığı; B kolunda ise 2 ayrı dal üzerinde S. Enteritidis, S. Corvallis ve S. subsp. I Roughform suşlarına ait profil gruplarının kümелendiği tespit edildi. Dendogramın A kolundaki suşlar arasında % 57; B kolundaki suşlar arasında ise % 76 oranında benzerlik görüldü. Tüm suşların % 75,5’i A kolunda toplanırken; %24,5’i B kolunda toplandı. Ayrıca çalışmamız için Simpson indeksinin hesaplanmasında, 3.2.8’de tanımlanan yöntem kullanıldı ve indeks değeri % 95,6 olarak bulundu.

Bu çalışmada; daha önce Avşaroğlu (2007) tarafından elde edilen bulguları destekleyen sonuçlar alındı. Bununla bağlantılı olarak S. subsp. I Roughform serotipinin SUR 1 profili; S. Enteritidis profil grubu ENT 1 ile benzer bulundu. Çalışmamızda GrC 1,

GrC 2 ve GrC 3 profilleri ile THO 2 ve THO 3 profilleri arasında benzerlikler saptandı. Ayrıca laboratuvarımıza ait DMC kodlu *Salmonella* suş koleksiyonumuzda serotipi belirlenmemiş bulunan DMC 21 kodlu suşun PFGE bant profiline bakılarak *S. Infantis* olduğu ve INF 2 profiline dahil olduğu tespit edildi. PFGE yöntemi ile Türkiye kökenli *Salmonella* serotiplerinin tanımlanması amacıyla yürütülen çalışmamız ayrıca; dünyada bu yöntemle tanımlanmasına dair çok az sayıda rapor edilmiş çalışma bulunan; *S. Nchanga*, *S. Salford*, *S. Telaviv*, *S. Thompson*, *S. Group C1* ve *S. subsp. I Roughform* serotipleri üzerine literatüre bir katkı olması amacıyla gerçekleştirildi.



Şekil 4.19 Türkiye kökenli *Salmonella* suşlarının XbaI makrorestriksiyon profillerinin PFGE analizi

5. SONUÇ

Filogenetik yöntemler moleküler epidemiyoloji çalışmalarında temel araçlardır. Moleküler epidemiyoloji ile bağlantılı hipotezlerin çoğu, doğada tarihsel köklere sahip bulunmaktadır ve filogenetik analizlerle bu köklere inip cevaplar bulmak olasıdır. Filogeni, bazı araştırmacılar tarafından salgın hastalıkların geleceklerinin araştırılmasında da kullanılmaktadır (Bush vd. 1999). Moleküler epidemiyolojideki en heyecan verici çalışmalar, populasyon biyolojisi ile evrimsel kuramı birleştiren, bulaşıcı hastalıkların takibi, iyileştirilmesi ve önlenmesi açısından yapılan müdahalelerin tasarlanması ile değerlendirilmesine dair fikirlerde ve yaklaşımlarda üretkenliği esas alan çalışmalardır (Levin vd. 1999). Dünyadaki gıda sektörünün gelişimine, giderek artan gıda üretim ihtiyacına ve üretilen gıdaların dağıtılmasında esas alınan hijyen koşullarına bakılarak; 21. yüzyılda da halk sağlığı açısından kritik bir önemde olacak *Salmonella*'nın kontrolünün ve salgın durumlarında moleküler epidemiyolojik yöntemlerle mümkün olduğunca hızlı tespitinin değeri daha iyi anlaşılacaktır. Günümüzde salgınların kontrolü ve önlenmesi, oldukça büyük ekonomik değer taşımaktadır. Çeşitli ülkelerdeki ulusal salgın kontrol merkezlerinde (örn. CDC) epidemiyolojik araştırmaların veriminin artırılması adına yüksek hızda ilerleyen teknolojiyi takip eden çalışmalar yürütülmektedir. Çeşitli moleküler ve DNA temelli yaklaşımlarla salgın hastalık takibinin yapılması için yöntemler geliştirilmekte ve bu yöntemlerin rutin laboratuvar testine dönüşebilecek altyapıya sahip olup olmadıkları araştırılmaktadır. Bu çalışma ile; *Salmonella*'nın serotip ve alt serotip düzeyinde tespitinin, ekonomik ve teknolojik açıdan ülkemiz koşullarında verimli şekilde yapılması ve dolayısıyla salgın hastalıkların kısa zamanda önüne geçilmesi için gerçekleştirilmesi gerekli olan standardizasyonun sağlanması amaçlanmıştır. FastDigest (Fermentas, Thermo Scientific) restriksiyon endonükleazlarının *Salmonella*'nın tespiti için gereken toplam sürenin düşürülmesinde sağladığı yarar bu çalışmada gösterilmiş; genel kanıya göre 2-3 gün süren PFGE yöntemindeki uygulamaların yaklaşık olarak 30 saat içerisine sığdırılması sağlanmıştır. Filogenetik analiz verileriyle de desteklenen çalışmamız sonucunda gıda kökenli non-tifoidal *Salmonella*'nın genomik düzeyde ilişkileri belirlenmiştir. Moleküler epidemiyolojik yöntemlerde sağlamlığı, tekrar

edilebilirlik güvencesi, tanımlama gücü ile PFGE'nin önümüzdeki yıllarda da altın standart olmaya devam edeceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Aarts, H.J., van Lith, L.A. and Keijer, J. 1998. High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1998 Feb; 6(2) : 131-5.
- Abbassi-Ghozzi, I., Hammami, S., Ben Aissa, R., Martinez-Urtaza, J., Boudabous, A. and Gtari, M. 2012. Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profile and antimicrobial resistance pattern of *Salmonella typhimurium* isolated from human and retail meats. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(22), pp. 4680-4686.
- Abbasoğlu, D. and Akçelik, M. 2011. Phenotypic and Genetic Characterization of Multidrug-Resistant *Salmonella* Infantis Strains From Broiler Chicken Meats in Turkey. *Biologia*, 66: 1- DOI: 10.2478/s11756-011-0051-0.
- Aksoycan, N. 1970. Memleketimizde ilk defa tesbit edilen *Salmonella* Bispebjerg bakterisi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, cilt: 4, sayı:3, 90-91.
- Amavisit, P., Markham, P.F., Lightfoot, D., Whithear, K.G. and Browning, G.F. 2001. Molecular epidemiology of *Salmonella* Heidelberg in an equine hospital. *Vet Microbiol*, 80, 85-98.
- Ammari, S., Laglaoui, A., En-nanei, L., Bertrand, S., Wildemaue, C. and Abid, M. 2009. Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from foods and patients in northern Morocco. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3(9).
- Anderson, E.S. and Williams, R.E.O. 1956. Bacteriophage typing of enteric pathogens and staphylococci and its use in epidemiology. *Journal of Clinical Pathology* 9, 127.
- Anderson, E.S., Ward, L.R., Saxe, M.J. and de Sa, J.D. 1977. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg.* 78:297–300.
- Andreoli, P., Thijssen, J., Anthony, R., Vos, P. and De Levita, W. 2004. Fast method for detecting micro-organisms in food samples. International patent WO 2004/106547 A2.
- Anonymous. 1934. The genus *Salmonella* Lignieres, 1900. *J. Hyg. (Lond.)* 34:333–350.
- Anonymous. 2007. Twelfth CRL-*Salmonella* interlaboratory comparison study on typing of *Salmonella* spp. 2007, National Institute for Public Health and the Environment; the Netherlands.
- Anonymous. 2009. Web sitesi: www.nuigalway.ie/research/salmonella_lab/. Erişim Tarihi: 22.12.2012.

- Anonymous. 2011. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC.
- Anonymous. 2012a. Multistate outbreak of *Salmonella* Bareilly and *Salmonella* Nchanga infections associated with a raw scraped ground tuna product. <http://cdc.gov/salmonella/bareilly-04-12/index.html>, Erişim tarihi: 26.12.2012
- Anonymous. 2012b. ECDC, Communicable Disease Threats Report. Week 40, 30 September-6 October 2012.
- Avşaroğlu, D.M. 2007. Isolation, molecular characterisation of food-borne drug resistant *Salmonella* spp. and detection of Class 1 integrons. Doctoral thesis, METU.
- Awang, S.N., Rusul, G. and Hassan, Z. 2003. Incidence of *Salmonella* spp. in raw vegetables in Selangor, Malaysia. *Food Control*; 14: 475–479.
- Baquar, N., Threlfall, E.J., Rowe, B. and Stanley, J. 1993. Molecular subtyping within a single *Salmonella* typhimurium phage type, DT204c, with a PCR-generated probe for IS200, *FEMS Microbiol Lett*, 112, 217-21.
- Baquar, N., Threlfall, E.J., Rowe, B. and Stanley, J. 1994. Phage type 193 of *Salmonella* typhimurium contains different chromosomal genotypes and multiple IS200 profiles, *FEMS Microbiol Lett*, 115, 291-5.
- Baggesen, D.L., Sorensen, G., Nielsen, E.M. and Wegener, H.C. 2010. Phage typing of *Salmonella* Typhimurium—is it still a useful tool for surveillance and outbreak investigation? *Euro Surveill*. 15:19471.
- Barrett, T.J., Gerner-Smidt P. and Swaminathan B. 2006. Interpretation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Patterns in Foodborne Disease Investigations and Surveillance. *Foodborne Pathogens and Disease*. Volume 3, Number 1.
- Basım, E. and Basım, H. 2000. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. *Turk J Biol*, 25, 405-418.
- Bell, C. and Kyriakides, A. 2002. *Salmonella*. In C. Blackburn, P. McClure (eds.), *Foodborne pathogens, hazards, risk analysis and control*, p. 307-331. CRC Press.
- Best, E.L., Hampton, M.D. and Ethelberg, S. 2009. Drug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT 120: use of PFGE and MLVA in a putative international outbreak investigation. *Microb. Drug Resist*. 15:133–138.
- Brenner, F., Villar, R., Angulo, F., Tauxe, R. and Swaminthan, B. 2000. *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:2465-2467.

- Burr, M.D., Josephson, K.L. and Pepper, I.L. 1998. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes, *Lett Appl Microbiol*, 27, 24-30.
- Bush, R.M., Bende, C.A., Subbarao, K., Cox, N.J. and Fitch, W.M. 1999. Predicting the evolution of human influenza A. *Science*, 286:1921-1925.
- Cai, H.Y., Lu, L., Muckle, C.A., Prescott, J.F. and Chen, S. 2005. Development of a novel protein microarray method for serotyping *Salmonella enterica* strains. *J. Clin. Microbiol.* 43:3427–3430.
- Carle, G.F. and Olson, M.V. 1984. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 12, 5647–5664.
- Carle, G.F., Frank, M. and Olson, M.V. 1986. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* 232, 65–68.
- Casin, I., Breuil, J., Brisabois, A., Moury, F., Grimont, F. and Collatz, E. 1999. Multidrug-resistant human and animal *Salmonella typhimurium* isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome- and integron-encoded beta-lactamase PSE-1. *J Infect Dis*, 179, 1173-82.
- CDB, DTU Food. 2012. Web sitesi: <http://www.antimicrobialresistance.dk>. Erişim Tarihi: 02.11.2012.
- Chiu, L.H., Chiu, C.H., Horn, Y.M., Chiou, C.S., Lee, C.Y., Yeh, C.M. and Chu, C. 2010. Characterization of 13 multi-drug resistant *Salmonella* serovars from different broiler chickens associated with those of human isolates. *BMC Microbiology*, 10(1), 86.
- Chu, G., Vollrath, D. and Davis, R.W. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234, 1582–1585.
- Chung, M., De Lencastre, H., Matthews, P., Tomasz, A., Adamsson, I., De Sousa, M.A., Camou, T., Cocuzza, C., Corso, A., Couto, I., Dominquez, A., Gniadkowski, M., Goering, R., Gomes, A., Kikuchi, K., Marchese, A., Mato, R.M.O., Oliveira, D., Palacio, R., Sa-Leao, R., Santos Sanches, I., Song, J.-H., Tassios, P.T. and Villari, P. 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb. Drug Resist.* 6, 189–198.
- Cookson, B.D., Aparicio, P., Deplano, A., Struelens, M., Goering, R. and Marples, R. 1996. Inter-centre comparison of pulsed-field gel electrophoresis for the typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 44, 179–184.

- Cookson, B.D., Robinson, D.A., Monk, A.B., Murchan, S., Deplano, A., De Ryck, R., Struelens, M.J., Scheel, C., Fussing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N.J., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Vindel, A., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-Liljequist, B., Ransjö, U., Müller-Premru, M., Hryniewicz, W., Rossney, A., O'Connell, B., Short, B.D., Thomas, J., O'Hanlon, S. and Enright, M.C. 2007. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1830–1837.
- Cooper, K.L., Luey, C.K., Bird, M., Terajima, J., Nair, G.B., Kam, K.M., Arakawa, E., Safa, A., Cheung, D.T., Law, C.P., Watanabe, H., Kubota, K., Swaminathan, B. and Ribot, E.M. 2006. Development and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio cholerae*. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 51–58.
- Daly, M., Buckley, J., Power, E., O'Hare, C., Cormican, M., Cryan, B., Wall, P.G. and Fanning, S. 2000. Molecular characterization of Irish *Salmonella enterica* serotype typhimurium: detection of class I integrons and assessment of genetic relationships by DNA amplification fingerprinting, *Appl Environ Microbiol*, 66, 614-9.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26, 297–302.
- Dionisi, A.M., Carattoli, A., Luzzi, I., Magistrali, C. and Pezzotti, G. 2006. Molecular genotyping of *Salmonella enterica* Abortusovis by pulsed field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 116:217–223.
- Durmaz, B. and Durmaz, R. 2001. Pulsed-field gel electrophoresis. Durmaz R. (editör). *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri, 2. Baskı, 161-168, İstanbul.
- Echeita, M.A., Herrera, S., Garaizar, J. and Usera, M. A. 2002. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. *Res. Microbiol.* 153:107–113.
- Erdem, B., Erciş, S. and Haşcelik, G. 2005. Antimicrobial resistance patterns and serotype distribution among *Salmonella enterica* strains in Turkey, 2000-2002. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24: 220-225
- Eurekalert. Web Sitesi: www.eurekalert.org/multimedia/pub/29416.php?from=178157
Erişim tarihi: 13.01.2013.

- Fonseca, E.L., Mykytczuk, O.L., Asensi, M.D., Reis, E.M., Ferraz, L.R., Paula F.L., Ng, L.K. and Rodrigues, D.P. 2006. Clonality and Antimicrobial Resistance Gene Profiles of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Infantis Isolates from Four Public Hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*; 44(8): 2767–2772.
- Galanis, E., Lo Fo Wong D.M., Patrick M.E., Binsztein N., Cieslik A., Chalermchikit T., Aidara-Kane A., Ellis A., Angulo F.J. and Wegener H.C. 2006. World Health Organization Global Salm-Surv. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerg Infect Dis.*, 12: 381-8.
- Garaizar, J., López-Molina, N., Laconcha, I., Baggesen, D.L., Rementeria, A., Vivanco, A., Audicana, A. and Perales, I. 2000. Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction- site PCR, and pulsed-field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5273–5281.
- Gardiner, K., Laas, W. and Patterson, D. 1986. Fractionation of large mammalian DNA restriction fragments using vertical pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Somat. Cell Mol. Genet.* 12, 185–195.
- Gaul, S.B., Wedel, S., Erdman, M.M., Harris, D.L., Harris, I.T., Ferris, K.E. and Hoffman, L. 2007. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Conserved XbaI Fragments for Identification of Swine *Salmonella* Serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 472-476.
- Gebreyes, W. A., Altier, C. and Thakur, S. 2006. Molecular epidemiology and diversity of *Salmonella* serovar Typhimurium in pigs using phenotypic and genotypic approaches. *Epidemiology and Infection*, 134(01), 187.
- Gerner-Smidt, P. and Scheutz, F. 2006. Standardized pulsed-field gel electrophoresis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne. Pathog. Dis.* 3, 74–80.
- Gianella, R.A. 1996. *Salmonella*: Epidemiology chapter 21 in Baron S et al. *Baron's Medical Microbiology*; University of Texas Medical Branch at Galveston, United States.
- Goering, R.V. 2004. Pulsed-field gel electrophoresis. In: Persing, D.H., Tenover, F.C., Versalovic, J., Tank, Y., Unger, B., Relman, D.A., White, T.J. (Eds.), *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. ASM Press, Washington, D.C., pp. 185–196.
- Goering, R.V. 2010. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution* 10 (2010) 866–875.

- Graves, L.M. and Swaminathan, B. 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 65, 55–62.
- Grimont, P.A.D. and Weill, F.X. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Institut Pasteur & WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Paris, France.
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P.I., Bockemühl, J., Grimont, P.A. and Weill, F.X. 2010. Supplement 2003-2007 (no. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* 161:26–29.
- Guthrie, R. 1991. Taxonomy and Grouping of the *Salmonella*, p.23-40. In *Salmonella*. CRC press.
- Haley, R.W., Cushion, N.B., Tenover, F.C., Bannerman, T.L., Dryer, D., Ross, J. Sanchez, P.J. and Siegel, J.D. 1995. Eradication of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections from a neonatal intensive care unit. *J. Infect. Dis.* 171:614–624.
- Hall, R.M. and Collis, C.M. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination, *Mol Microbiol*, 15, 593-600.
- Halpin, J.L., Garrett, N.M., Ribot, E.M., Graves, L.M. and Cooper, K.L., 2009. Re-evaluation, optimization, and multilaboratory validation of the PulseNet-standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.*
- Hasenson, L., Gericke B., Liesegang A., Claus H., Poplawskaja J., Tscherkess N. and Rabsch W. 1995. Epidemiological and microbiological studies on salmonellosis in Russia. *Zentralbl Hyg Umweltmed*; 198(2):97-116.
- Hendriksen, R.S., Mikoleit, M., Carlson, V.P., Karlsmose, S., Vieira, A.R., Jensen A. B., Seyfarth, A.M., Delong, S.M., Weill, F.X., Lo Fo Wong, D.M., Angulo, F.J., Wegener, H.C. and Aarestrup, F.M. 2009. WHO Global Salm-Surv External Quality Assurance System (EQAS) for serotyping of *Salmonella* isolates, 2000 - 2007. *J Clin Microbiol.* 2009 Sep; 47 (9): 2729-36.
- Hendriksen, R.S. 2010. Global epidemiology of non-typhoidal *Salmonella* infections in humans. PhD thesis. National Food Institute Technical University of Denmark.
- Hendriksen, R.S., Vieira, A.R., Karlsmose, S., Mikoleit, M., Lo Fo Wong, D.M.A., Jensen, A.B., Delong, S.M., Wegener, H.C., Angulo, F.J. and Aarestrup, F.M. 2011 Global monitoring of serovar distribution based on quality assured data from the WHO Global Salm-Surv Country Data Bank; 2001–2007. *Foodborne Pathogens and Disease* Vol: 8 (8). doi: 10.1089/fpd.2010.0787.

- Herrera-Leon, S., McQuiston, J.R., Usera, M.A., Fields, P.I., Garaizar, J. and Echeita, M.A. 2004. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 42:2581–2586.
- Herrera-Leon, S., Ramiro, R., Arroyo, M., Díez, R., Usera, M.A. and Echeita, M.A. 2007. Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. *Res. Microbiol.* 158:122–127.
- Herikstad, H., Motarjemi, Y. and Tauxe, R.V. 2002. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol Infect.*, 129: 1-8.
- Hickmann-Brenner, F.W., Stubbs, A.D. and Farmer III, J.J. 1991. Phage typing of *Salmonella* Enteritidis in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 29:2817–2823.
- Holmberg, S.D., Osterholm, M.T., Senger, K.A. and Cohen, M.L. 1984. Drug-resistant *Salmonella* from animals fed antimicrobials. *New Engl. J. Med.* 311:617–622.
- Holt, J.G. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Hunter, P.R. and Gaston M.A. 1988. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2465-2466.
- Hunter, S.B., Vauterin, P., Lambert-Fair, M.A., Van Duyne, M.S., Kubota, K., Graves, L. and Ribot, E. 2005. Establishment of a Universal Size Standard Strain for Use with the PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1045-1050.
- Hulton, C.S., Higgins, C.F. and Sharp, P.M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol.*;5(4):825-34.
- Husnik, F., Chrudimsky, T. and Hypsa, V. 2011. Multiple origins of endosymbiosis within the Enterobacteriaceae (γ-Proteobacteria): convergence of complex phylogenetic approaches. *BMC Biology*, 9:87.
- Jensen, M.A., Webster, J.A. and Straus, N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms, *Appl Environ Microbiol*, 59, 945-52.
- Jeoffreys, N.J., James, G.S., Chiew, R. and Gilbert, G.L. 2001. Practical evaluation of molecular subtyping and phage typing in outbreaks of infection due to *Salmonella enterica* serotype typhimurium, *Pathology*, 33, 66-72.

- Johnson, J.R., Clabots, C., Azar, M., Boxrud, D.J., Besser, J.M. and Thurn J.R. 2001. Molecular analysis of a hospital cafeteria-associated salmonellosis outbreak using modified repetitive element PCR fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 39:3452–3460.
- Kalender, H. ve Şen, S. 2008. Tavuk etleri ve tavuklardan izole edilen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis suşlarının faj tiplendirilmesi ve pulsed-field gel electrophoresis ile analizi. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.* 34 (2), 15-24.
- Kam, K.M., Luey, C.K., Parsons, M.B., Cooper, K.L., Nair, G.B., Alam, M., Islam, M.A., Cheung, D.T., Chu, Y.W., Ramamurthy, T., Pazhani, G.P., Bhattacharya, S.K., Watanabe, H., Terajima, J., Arakawa, E., Ratchtrachenchai, O.A., Huttayananont, S., Ribot, E.M., Gerner-Smidt, P. and Swaminathan, B. 2008. Evaluation and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: an international multicenter collaborative study. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2766–2773.
- Kérounont, A., Marault, M., Lailler, R., Weill, F.X., Feurer, C., Espié, E. and Brisabois, A. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis subtyping database for foodborne *Salmonella enterica* serotype discrimination. *Foodborne Pathog. Dis.* 4:293–303.
- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougana, G. and Achtman, M. 2002. *Salmonella* Typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect. Genet. Evol.* 2:39–45.
- Kotetishvili, M., Stine, O.C., Kreger, A., Morris, Jr. J.G. and Sulakvelidze A. 2002. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. *J. Clin. Microbiol.* 40:1626–1635.
- Koeuth, T., Versalovic, J. and Lupski, J.R. 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res.* 5, 408–418.
- Laconcha, I., Baggesen, D.L., Rementeria, A. and Garaizar, J. 2000. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6, and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. *Vet. Microbiol.*, 75, 155-165.
- Lagatolla, C., Dolzani, L., Tonin, E., Lavenia, A., Di Michele, M., Tommasini, T. and Monti-Bragadin, C. 1996. PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes, *J Clin Microbiol*, 34, 2440-3.
- Lai, K.S. 2009. Differentiation of selected *Salmonella* serovars in Malaysia by macrorestriction analysis, plasmid profiling and antimicrobial susceptibility testing. Master thesis, University of Malaya, Malaysia.

- Lam, S. and Roth, J.R. 1983. IS200: a *Salmonella*-specific insertion sequence, *Cell*, 34, 951-60.
- Landeras, E., Gonzalez-Hevia, M.A., Alzugaray, R., and Mendoza, M.C. 1996. Epidemiological differentiation of pathogenic strains of *Salmonella enteritidis* by ribotyping, *J. Clin Microbiol*, 34, 2294-6.
- Le Hello, S., Hendriksen, R.S., Doublet, B., Fisher, I., Nielsen, E.M., Whichard, J.M. and Weill, F.X. 2011. International Spread of an Epidemic Population of *Salmonella enterica* Serotype Kentucky ST198 Resistant to Ciprofloxacin. *Journal of Infectious Diseases*, 204(5), 675-684.
- Levesque, C., Piche, L., Larose, C. and Roy, P.H. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes, *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 185-91.
- Levin, B.R., Lipsitch, M. and Bonhoeffer, S. 1999. Population biology, evolution and infectious disease: convergence and synthesis. *Science*, 283:806-809.
- Li, J., Nelson, K., McWhorter, A.C., Whittam, T.S. and Selander R.K. 1994. Recombinational basis of serovar diversity in *Salmonella enterica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:2552–2556.
- Liebana, E., Guns, D., Garcia-Migura, L., Woodward, M.J., Clifton-Hadley, F.A. and Davies, R.H. 2001. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. *J. Clin. Microbiol.* 39:3609–3616.
- Liebisch, B., and Schwarz, S. 1996. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* isolates, *J Med Microbiol*, 44, 52-9.
- Lindqvist, N., Siitonen, A. and Pelkonen, S. 2002. Molecular Follow-Up of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Agona Infection in Cattle and Humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), 3648-3653.
- Lindqvist, N. and Pelkonen, S. 2007. Genetic surveillance of endemic bovine *Salmonella* *Infantis* infection. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1),15. doi:10.1186/1751-0147-49-15.
- Lindstedt, B.A., Heir, E., Vardund, T. and Kapperud, G. 2000. A variation of the amplified-fragment length polymorphism (AFLP) technique using three restriction endonucleases, and assessment of the enzyme combination BglII-MfeI for AFLP analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolates, *FEMS Microbiol Lett*, 189, 19-24.
- Lindstedt, B.A., Vardund, T., Aas, L. and Kapperud, G. 2004. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* 59:163–172.

- Lo Fo Wong, D.M.A., Andersen, J.K., Norrung, B. and Wegener, H.C. 2004. Food Contamination Monitoring and Food Borne Disease Surveillance at National Level. Second FAO/WHO Global Forum for Food Safety Regulators.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M. and Spratt, B.G. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 3140-3145.
- Maule, J. 1998. Pulsed-field gel electrophoresis. *Molecular Biotechnology*. Vol: 9, Issue 2, pp 107-126
- Malorny, B., Bunge, C., Guerra, B., Prietz, S. and Helmuth, R. 2007. Molecular characterisation of *Salmonella* strains by an oligonucleotide multiprobe microarray. *Mol. Cell. Probes* 21:56–65.
- Mammina, C., Noto, A.M. and Ricci, A. 2004. Phenogenotyping of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates identified in Sicily during a reemergence period. *Foodborne Pathog Dis.* 1:195–199.
- Martin, M.C., Gonzalez, H., Alvarez-Riesgo, J.A., and Mendoza, M.C. 2001. *Salmonella* serotype Virchow causing salmonellosis in a Spanish region. Characterization and survey of clones by DNA fingerprinting, phage typing and antimicrobial resistance, *Eur J Epidemiol*, 17, 31-40.
- Martin, P., Jacquet, C., Goulet, V., Vaillant, V. and De Valk, H. 2006. Pulsed-field gel electrophoresis of *Listeria monocytogenes* strains: the PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 303–308.
- McClelland, M., Jones, R., Patel, Y. and Nelson, M. 1987. Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 15, 5985–6005.
- McQuiston, J.R., Herrera-Leon, S., Wertheim, B.C., Doyle, J., Fields, P.I., Tauxe, R.V. and Logsdon, Jr. J.M. 2008. Molecular phylogeny of the salmonellae: relationships among *Salmonella* species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. *J. Bacteriol.* 190:7060–7067.
- Mendoza, M.C., and Landeras, E. 1999. Molecular epidemiological methods for differentiation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strains., in *Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals: epidemiology, pathogenesis, and control.*, Saeed, A. M., Gast, R.E., Potter, M.E. and Wall, P.G., Ed., Iowa University Press, Ames, IA, pp. 125-140.

- Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P. and Falkow, S. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, vol. 127 no. 31529-1537.
- Miller, T., Prager, R., Rabsch, W., Fehlhaber, K. and Voss, M. 2010. Epidemiological relationship between *Salmonella* Infantis isolates of human and broiler origin. *Lohmann Information*, Vol. 45 (2), 27.
- Millemann, Y., Lesage, M.C., Chaslus-Dancla, E. and Lafont, J.P. 1995. Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*, *J Clin Microbiol*, 33, 173-9.
- Millemann, Y., Lesage-Descauses, M.C., Lafont, J.P. and Chaslus-Dancla, E. 1996. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 14, 129-34.
- Millemann, Y., Gaubert, S., Remy, D., and Colmin, C. 2000. Evaluation of IS200-PCR and comparison with other molecular markers To trace *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium bovine isolates from farm to meat, *J Clin Microbiol*, 38, 2204-9.
- Molbak, K., Olsen, J. and Wegener, H. 2006. *Salmonella* Infections. In H. Reimann, D. Cliver (eds.), *Foodborne Infections and Intoxications*, p. 55-115. Academic Press.
- Murase, T., Nagato, M., Shirota, K., Katoh, H. and Otsuki, K. 2004. Pulsedfield gel electrophoresis-based subtyping of DNA degradation-sensitive *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Livingstone and serovar Cerro isolates obtained from a chicken layer farm. *Vet. Microbiol.* 99:139–143.
- Murchan, S., Kaufmann, M. E., Deplano, A., De Ryck, R., Struelens, M., Zinn, C. E., Fussing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., El Solh, N., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P. T., Legakis, N., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Vindel, A., Laconcha, I., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-Liljequist, B., Ransjo, U., Coombes, G. and Cookson, B. 2003. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1574– 1585.
- Nagappa, K., Tamuly S. and Singh, S.P. 2007. Isolation of *Salmonella typhimurium* from poultry eggs and meat of Tarai region of Uttaranchal. *Indian, J. Biotechnol.*, 6: 407-409.

- Navarro, F., Llovet, T., Echeita, M. A., Coll, P., Aladuenas, A., Usera, M. A. and Prats, G., 1996. Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar typhi, *J Clin Microbiol*, 34, 2831-4.
- Nde, C.W., Sherwood, J.S. and Doetkott, C. 2006. Prevalence and molecular profiles of *Salmonella* collected at a commercial turkey processing plant. *J Food Prot.* 69:1794–1801.
- NEB. 2013. Web sitesi. http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/specific_info_digestion.asp. Erişim tarihi: 20.01.2013
- Ng, L.K., Mulvey, M.R., Martin, I., Peters, G. A. and Johnson, W. 1999. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104, *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 3018-21.
- Olive, D.M. and Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms, *J Clin Microbiol*, 37, 1661-9.
- Olsen, J.E., Skov, M.N., Threlfall, E.J. and Brown, D.J. 1994. Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. *J. Med. Microbiol.* 40:15–22.
- Painter, J.A., Ayers, T., Woodruff, R., Blanton, E., Perez, N., Hoekstra, R.M., Griffin, P.M. and Braden, C. 2009. Recipes for foodborne outbreaks: a scheme for categorizing and grouping implicated foods. *Foodborne Pathog. Dis.* 6:1259 –1264.
- Pang, T., Bhutta, Z.A., Finlay, B.B. and Altwegg, M. 1995. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol.*; 2(7): 253 - 255.
- Pegues, D.A., Ohl, M.E. and Miller, S.I. 2005. *Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds, *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, 5th edn. Philadelphia, PA: Elsevier; 2636–2654.
- Pessoa-Silva, C.L., Dharan, S., Hugonnet, S., Touveneau, S., Posfay-Barbe, K. and Pfister, R. 2004. Dynamics of bacterial hand contamination during routine neonatal care. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 25(3):192-7.
- Petersen, A., Aarestrup, F.M., Angulo, F.J., Wong, S., Stohr, K. and Wegener, H.C. 2002. WHO global salm-surv external quality assurance system (EQAS): an important step toward improving the quality of *Salmonella* serotyping and antimicrobial susceptibility testing worldwide. *Microb Drug Resist.* 8: 345-53.

- Porter, J.R. 1976. Anthony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriological Rev.* 40 (2):260-9.
- Porwollik, S., Boyd, E.F., Choy, C., Cheng, P., Florea, L., Proctor, E. and McClelland, M. 2004. Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *J. Bacteriol.* 186:5883–5898.
- PulseNet, 2009. Web sitesi:
http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf. Erişim Tarihi: 20.06.2012.
- Rabsch, W., Tschape, H. and Baumler A.J. 2001. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes Infect*, 3: 237–247.
- Rabsch, W., Prager, R., Koch, J., Stark, K., Roggentin, P., Bockemühl, J., Beckmann, G., Stark, R., Siegl, W., Ammon, A. and Tschäpe, H. 2005. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Agona: characterization of a diffuse outbreak caused by aniseed-fennel-caraway infusion. *Epidemiol. Infect.*, 133, 837–844.
- Rabie, S.N., Khalifa, O.N., Radwan, E.I.M. and Afify, S.A.J. 2012. Epidemiological and Molecular Studies of *Salmonella* Isolates from Chicken, Chicken Meat and Human in Toukh, Egypt. *Global Veterinaria* 8 (2): 128-132.
- Recchia, G.D. and Hall, R.M. 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element, *Microbiology*, 141, 3015-3027.
- Reeves, P.R., Hobbs, M. and Valvano, M.A. 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* 4:495–503.
- Ribeiro, V.B., Andrigheto, C., Bersot, L.S., Barcellos, V., Reis, E.F. and Destro, M.T. 2007. Serological and genetic diversity amongst *Salmonella* strains isolated in a salami processing line. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), 178-182.
- Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B. and Barrett, T.J. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 59–67.
- Ribot, E.M., Gerner-Smidt, P. and Swaminathan, B. 2008. Evaluation and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: an international multicenter collaborative study. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2766–2773.
- Ridley, A. and Threlfall, E.J. 1998. Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104, *Microb Drug Resist*, 4, 113-8.

- Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J. and Macelis, D. 2010. REBASE—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 38, D234–D236.
- Rohlf, J.F. 1993. NTSYS-pc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Exeter Publishing, Setauket, N.Y.
- Sandvang, D., Aarestrup, F.M. and Jensen, L.B. 1998. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104, *FEMS Microbiol Lett*, 160, 37-41.
- Sandvang, D., Jensen, L.B. and Baggesen, D.L. 2000. Persistence of a *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clone in Danish pig production units and farmhouse environment studied by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). *FEMS Microbiol Lett.* 187:21–25.
- Sangwei, L., UC Berkeley. 2012. Web sitesi: www.eurekalert.org, Erişim tarihi: 13 Ekim 2012.
- Savelkoul, P.H., Aarts, H.J., de Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J.L., Schouls, L. and Lenstra, J.A. 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art, *J Clin Microbiol*, 37, 3083-91.
- Schneitman, C.A. and Klena, J.D. 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:655–682.
- Scwartz, D.C., Saffran, W., Welsh, J., Haas, R., Goldenberg, M. and Cantor, C.R. 1982. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 47:189-95.
- Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37, 67-75.
- Schwartz, D.C. and Koval, M. 1989. Conformational dynamics of individual DNA molecules during gel electrophoresis. *Nature* 338, 520–522.
- Science Encyclopedia. 2013. Web sitesi: <http://science.jrank.org/pages/711/Bacteria-Identifying-classifying-bacteria.html>. Erişim tarihi: 22.01.2013.
- Simpson, E.H. 1949. Measurement of diversity. *Nature (London)* 163:688.
- Sirichote, P., Hasman, H., Pulsrikarn, C., Schønheyder, H.C., Samulionienė, J., Pornruangmong, S., Bangtrakulnonth, A., Aarestrup, F.M. and Hendriksen, R.S. 2010. Molecular characterization of extended spectrum cephalosporinases (ESC) producing *Salmonella* Choleraesuis from patients in Thailand and Denmark. *J Clin Microbiol.*, 48 (3) : 883-8.

- Sivapalasingam, S., Barrett, E., Kimura, A., Van Duyn¹, S., De Witt, W., Ying, M., Frisch, A., Phan, Q., Gould, E., Shillam, P., Reddy, V., Cooper, T., Hoekstra, M., Higgins, C., Sanders, J.P., Tauxe, R.V. and Slutsker, L. 2003. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* Serotype Newport infection linked to mango consumption: impact of waterdip disinfection technology. *Clin. Infect. Dis.* 37:1585–1590.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. San Francisco: Freeman, 573p.
- Soll, D.R., Pujol, C. and Lockhart, S.R. 2007. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. In: Murray, P. R., Baron, Jorgensen, E. J., Landry, J. H., Levin, B. R., Lipsitch, M., Bonhoeffer, S. 1999. Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. *Science* 283:806–809.
- Soyer, Y., Alcaine S.D., Schoonmaker-Bopp, D.J., Root, T.P., Warnick, L.D., McDonough, P.L., Dumas, N.B., Gröhn, Y.T. and Wiedmann, M. 2010. Pulsed field gel electrophoresis diversity of human and bovine clinical *Salmonella* isolates. *Foodborne Pathogens and Disease*, Volume 7, Number 6, DOI: 10.1089=fpd.2009.0424.
- Stepan, R.M., Sherwood, J.S., Petermann, S.R. and Logue, C.M. 2011. Molecular and comparative analysis of *Salmonella enterica* Senftenberg from humans and animals using PFGE, MLST and NARMS. *BMC Microbiology*, 11(1), 153.
- Stephenson, F.H. 2004. *Calculations in Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics*. Academic Press, Burlington, MA.
- Struelens, M.J., De Ryck, R. and Deplano, A. 2001. Analysis of microbial genomic macrorestriction patterns by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing. In: Dijkshoorn, L., Towner, K.J., Struelens, M. (Eds.), *New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data*. Elsevier, Amsterdam, pp. 159–176.
- Sukhnanand, S., Alcaine, S., Warnick, D.L., Su W.L., Hof, J., Craver, J.P.M., McDonough, P., Boor, J.K. and Wiedmann, M. 2005. DNA sequence-based subtyping and evolutionary analysis of selected *Salmonella enterica* serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 43:3688–3698.
- Sürücüoğlu, S., Tünger, Ö., Özbakkaloğlu, Ö., Gazi, H., Değerli, K. ve Aydemir, Ş. 2001. *Salmonella* suşlarında antimikrobiyal direncin ve geniş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin araştırılması. *ANKEM Derg* 2001; 15(1): 40-5.
- Swaminathan, B., Barrett, T.J., Hunter, S.B. and Tauxe, R.V. 2001. PulseNet: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg. Infect Dis.* 7, 382–389.

- Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P., Ng, L.K., Lukinmaa, S., Kam, K.M., Rolando, S., Gutierrez, E.P. and Binsztein, N. 2006. Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 36–50.
- Tassios, P.T., Chadjichristodoulou, C. and Lambiri, M. 2000. Molecular typing of multidrug-resistant *Salmonella* Blockley outbreak isolates from Greece. *Emerg Infect Dis.* 6:60–64.
- Tauxe, R.V. 1999. *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*: successful subtypes in the modern world. In: Scheld WM, Craig WA, Hughes JM, eds, *Emerging infections 3*. Washington, DC: ASM Press, 37–52.
- Te, W.R., Van Belkum, A., Mackay, W.G., Wallace, P.S. and Van Leeuwen, W.B. 2010. External quality assessment of the molecular diagnostics and genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29:295–300.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.A., Persing, D.H. and Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:2233-2239.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D. and Goering, R.V. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 18, 426–439.
- Thong, K.L., Ngeow, Y.F., Altwegg, M., Navaratnam, P. and Pang, T. 1995. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping, *J Clin Microbiol*, 33, 1070-4.
- Threlfall, E.J., Frost, J.A., Ward, L.R. and Rowe, B. 1990. Plasmid profile typing can be used to subdivide phage-type 49 of *Salmonella typhimurium* in outbreak investigations. *Epidemiol Infect.*, 104(2):243-51.
- Threlfall, E.J., Torre, E., Ward, L.R., Davalos-Perez, A., Rowe, B. and Gibert, I. 1994. Insertion sequence IS200 fingerprinting of *Salmonella typhi*: an assessment of epidemiological applicability, *Epidemiol Infect*, 112, 253-61.
- Threlfall, E.J., Hampton, M.D. and Ward, L.R. 1999a. Pulsed field gel electrophoresis identifies an outbreak of *Salmonella enterica* serotype Montevideo infection associated with a supermarket hot food outlet. *Commun. Dis. Public Health* 2:207–209.

- Threlfall, E.J., Hampton, M.D., Ward, L.R., Richardson, I.R., Lanser, S. and Greener, T. 1999b. Pulsed field gel electrophoresis identifies an outbreak of *Salmonella enterica* serotype Montevideo infection associated with a supermarket hot food outlet. *Communicable Disease and Public Health*, Vol.2 (3), 207-209.
- Torpdahl, M. and Ahrens, P. 2004. Population structure of *Salmonella* investigated by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3):566-73.
- Torpdahl, M., Sorensen, G., Lindstedt, B. A. and Nielsen, E. M. 2007. Tandem repeat analysis for surveillance of human *Salmonella* Typhimurium infections. *Emerg. Infect. Dis.* 13:388–395.
- Townsend, K.M. and Dawkins, J.S.H. 1993. Field alternation gel electrophoresis-status quo. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. Vol:618, Issues 1-2, p. 223-249.
- Van Belkum, A., Van Leeuwen, W., Kaufmann, M.E., Cookson, B., Forey, F., Etienne, J., Goering, R., Tenover, F., Steward, C., O'Brien, F., Grubb, W., Tassios, P., Legakis, N., Morvan, A., El Solh, N., De Ryck, R., Struelens, M., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., Kooistra, M., Talens, A., Witte, W. and Verbrugh, H. 1998. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I macrorestriction fragments: a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1653–1659.
- Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S. and Struelens, M. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 13 (Suppl. 3), 1–46.
- Van Lith, L.A. and Aarts, H.J. 1994. Polymerase chain reaction identification of *Salmonella* serotypes. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 273–276
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19, 6823–6831.
- Ward, L.R., de Sa, J.D. and Rowe, B. 1987. A phage-typing scheme for *Salmonella* Enteritidis. *Epidemiol. Infect.* 99:291–294.
- Wattiau, P., Van Hessche, M., Schlicker, C., Vander Veken, H. and Imberechts, H. 2008. Comparison of classical serotyping and PremiTest assay for routine identification of common *Salmonella enterica* serovars. *J. Clin. Microbiol.* 46:4037–4040.

- Wattiau, P., Boland, C. and Bertrand, S. 2011. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 77, No. 22, p. 7877–7885.
- Weide-Botjes, M., Kobe, B., Lange, C. and Schwarz S. 1998. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Hadar: evaluation and application of different typing methods. *Vet Microbiol*, 61(3):215-27
- Weinberger, M., Solnik-Isaac, H., Shachar, D., Reisfeld, A., Valinsky, L., Andorn, N., Agmon, V., Yishai, R., Bassal, R., Fraser, A., Yaron, S. and Cohen, D. 2006. *Salmonella enterica* serotype Virchow: epidemiology, resistance patterns and molecular characterisation of an invasive *Salmonella* serotype in Israel. *Clin Microbiol Infect.*; 12: 999–1005.
- Werber, D., Dreesman J., Feil F., Van Treeck, U., Fell, G., Ethelberg, S., Hauri, M. A., Roggentin, P., Prager, R., Fisher, S.T.I., Behnke, C. S., Bartelt, E., Weise, E., Ellis, A., Siitonen, A., Andersson, Y., Tschäpe, H., Kramer, H. M. and Ammon, A. 2005. International outbreak of *S. Oranienburg* due to German chocolate. *BMC Infect Dis*; 5: 7.
- Winokur, P.L. 2003. Molecular epidemiological techniques for *Salmonella* strain discrimination. *Frontiers in Bioscience* 8, c14-24.
- Woo, Y.K. and Lee, S.H. 2006. Genetic diversity of multiresistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from animals and humans. *J Microbiol.* 44: 106–112.
- Xia, X., Zhao, S., Smith, A., McEvoy, J., Meng, J. and Bhagwat, A. 2009. Characterization of *Salmonella* isolates from retail foods based on serotyping, pulse field gel electrophoresis, antibiotic resistance and other phenotypic properties. *International Journal of Food Microbiology*, 129(1), 93-98.
- Yazıcıoğlu, N., Kaya, K., Ayaz, Y., Sen, S., Özkök, S., Aksoy, M., Yavuz, M.K., Kaplan, Y.Z., Tunca, S.T., Vural, S., Evgin, N., Karakoç, S.R., Miroğlu, M. ve Turut, N. 2005. Kanatlı kesimhanelerinin parçalama ünitelerinden alınan boyun ve kanat örneklerinden *Salmonella* izolasyonu, serotiplendirilmesi ve antibiyotik dirençliliğin araştırılması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 16:23-36.
- Yue, M., Rankin S.C., Blanchet R.T., Nulton J.D. and Edwards R.A. 2012. Diversification of the *Salmonella* Fimbriae: A Model of Macro- and Microevolution. *PloS ONE* 7(6): e38596. doi:10.1371/journal.pone.0038596.
- Zou, M., Keelara, S. and Thakur, S. 2012. Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Isolates from Humans by Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(3), 232-238.

Zou, W., Lin, W.J., Foley, S.L., Chen, C.H., Nayak, R., James J. and Chen J.J.
2010.Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiles for
Identification of *Salmonella* Serotypes. Journal of Clinical Microbiology, p.
3122–3126.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ahmet Caner SÖNMEZ

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 11/08/1985

Medenî Hali : Bekâr

Yabancı Dil : İngilizce, Almanca

Eğitim Durumu

Lise : Muğla 75. Yıl Fen Lisesi (2004)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2009)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji
Anabilim Dalı (Şubat 2010 - Temmuz 2013)