

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE'DEKİ TAVUK ORJİNLI SALMONELLA
ENTERİTİDİS SUŞLARININ MLVA VE PFGE
İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ VE ANTİMİKROBİYAL
DİRENCİN SAPTANMASI**

Seyyide SARIÇAM İNCE

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK**

**Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Müdürlüğü'nün 21L0239004 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2022**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Türkiye’deki Tavuk Orijinli *Salmonella* Enteritidis Suşlarının MLVA ve PFGE ile Genotiplendirilmesi ve Antimikrobiyal Direncin Saptanması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Seyyide SARIÇAM İNCE

Tarih: 25.03.22

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Anabilim Dalında
Seyyide SARIÇAM İNCE tarafından hazırlanan
“Türkiye’deki Tavuk Orijinli *Salmonella* Enteritidis Suşlarının MLVA ve PFGE ile
Genotiplendirilmesi ve Antimikrobiyal Direncin Saptanması”
adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25.03.22

Prof. Dr. Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Murat YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi
Raportör Üye

Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK
Ankara Üniversitesi
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Nüket BİLGİN
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Salmonella</i> Etimoloji ve Nomenklatürü	1
1.2. <i>Salmonella</i> Etiyoloji ve Taksonomisi	2
1.3. <i>Salmonella</i> Epidemiyolojisi	3
1.4. <i>Salmonella</i> İzolasyon ve İdentifikasyonu	4
1.5. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)	6
1.6. Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA)	8
1.7. Antimikrobiyal Direnç (AMR)	9
2. GEREÇ ve YÖNTEM	11
2.1. GEREÇ	11
2.1.1. <i>Salmonella</i> Enteritidis Suşları	11
2.1.2. Kullanılan Besiyeri, Kimyasal ve Solüsyonlar	12
2.1.3. Laboratuvar Cihaz ve Ekipmanları	13
2.1.4. Dizi Analiz Programları ve Veri Tabanları	14
2.2. YÖNTEM	15
2.2.1. <i>Salmonella</i> Enteritidis Aktivasyonu ve Konvansiyonel Serotiplendirme	15
2.2.2. Antimikrobiyal Direnç Testi	15
2.2.3. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)	16
2.2.4. Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA)	18

3. BULGULAR	21
3.1. Antimikrobiyal Direnç Testi	21
3.2. Pulsed-Field Gel Electrophoresis	26
3.3. Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis	30
3.4. Antibiyotik Direnç Testi ve Genotiplendirme Bulgularının Karşılaştırılması	33
4. TARTIŞMA	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
ÖZET	49
SUMMARY	50
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	56

ÖNSÖZ

Salmonellozis Dünya genelinde yaygın, gıda kaynaklı zoonoz enfeksiyonların başında gelmektedir. İnsanlarda en sık gözlenen *Salmonella* serovarı, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*)’dir. *S. Enteritidis* için major bulaşma yolunun kontamine yumurta ve kanatlı eti tüketimi ile gıda zincirine geçiş olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, tavuk orijinli *S. Enteritidis* suşlarının antibiyotik direnç (AMR) profillerinin, çeşitlilik ve epidemiyolojilerinin belirlenmesi, salmonellozisin izlenmesi ve kontrolü için oldukça önemlidir. Salmonellozis epidemiyolojisinin belirlenmesinde, ayırım gücü yüksek Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA) ve Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) genotiplendirme yöntemleri güvenilir bir araç olarak sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, Türkiye’de ilk kez tavuk orijinli *S. Enteritidis* suşları MLVA ile genotiplendirildi. *S. Enteritidis* suşları izolasyon orijinleri, AMR profilleri, MLVA ve PFGE genotipleri bazında değerlendirilerek epidemiyolojik analiz gerçekleştirildi. Genotiplendirme analizleri sonucunda belirlenen avantaj, dezavantaj ve genotip bulgularının, *S. Enteritidis* moleküler epidemiyolojisini konu alan yeni bilimsel çalışmalara ışık tutabilmesi amaçlandı.

Doktora ve tez çalışmam süresince ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Hakan YARDIMCI’ya, Prof. Dr. Mehmet AKAN’a ve Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU’na ve Prof. Dr. K. Serdar DİKER’e motivasyon ve yardımları için teşekkür ederim. Her zaman yanımda ve kalbimde olan canımın içi babam Mehmet SARIÇAM’a, daima bana güç veren sevgili annem Ferdane SARIÇAM’a, en büyük destekçilerim sevgili ablalarım ve sevgili eşim Emre İNCE’ye teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
bp	Baz Çifti
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
CFU	Koloni Oluşturan Birim
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
cm	Santimetre
CRISPR	Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrar
dH ₂ O	Distile Su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
F	İleri
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
g	Gram
ISO	Uluslararası Standardizasyon Örgütü
KCN	Potasyum Siyanür
LPS	Lipopolisakkarit

MDR	Çoklu-İlaç Dirençli
MEGA	Moleküler Evrimsel Genetik Analizi
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MHA	Mueller-Hinton Agar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromol
MLVA	Çoklu Lokus Değişken Sayıdaki Ardışık Tekrarların Analizi
MLST	Çoklu Lokus Dizi Analizi
MT	MLVA Genotip
NA	Nutrient Agar
-	Negatif
No	Numara
OD	Optik Dansite
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	Darbeli Alan Jel Elektroforezi
pH	Potansiyel Hidrojen
+	Pozitif
PT	PFGE Genotip
R	Geri

RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
s	Saat
sn	Saniye
°C	Santigrat
spp.	Tür
ST	Sekans Tip
subsp.	Alt Tür
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris Borate EDTA
TE	Tris EDTA
U	Unit
UPGMA	Aritmetik Ortalama ile Ağırlıksız Çift Grup Metodu
USRL	Ulusal Salmonella Referans Laboratuvarı
V	Volt
VNTR	Değişken Sayıda Ardışık Tekrar
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
%	Yüzde

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. <i>S. Enteritidis</i> izolatlarında dirençli, orta dirençli ve duyarlı izolatların antimikrobiyallere göre yüzde dağılımı	22
Şekil 3.2. <i>S. Enteritidis</i> dirençli, orta dirençli ve duyarlı izolatların kümes yetiştirme tipi ve antimikrobiyallere göre yüzde dağılımı	23
Şekil 3.3. <i>S. Enteritidis</i> izolatlarında yaygın MDR profillerinin yüzde dağılımı	24
Şekil 3.4. <i>S. Enteritidis</i> izolatlarında dirençli izolatların antimikrobiyallere ve yıllara göre yüzde dağılımı	26
Şekil 3.5. <i>S. Enteritidis</i> suşlarının <i>XbaI</i> -PFGE analizi sonucu elde edilen dendrogramı	27
Şekil 3.6. <i>S. Enteritidis</i> izolatlarında PFGE genotiplerinin yıllara göre dağılımı	30
Şekil 3.7. <i>S. Enteritidis</i> izolatlarında yaygın MLVA genotiplerinin yüzde dağılımı	32
Şekil 3.8. <i>S. Enteritidis</i> izolatlarında MLVA genotiplerinin yıllara göre dağılımı	32
Şekil 3.9. <i>S. Enteritidis</i> suşları izolat verileri ve genotiplendirme bulguları karşılaştırma şeması	34

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. <i>Salmonella</i> serovarları, konakları ve oluşturdıkları enfeksiyonlar	3
Çizelge 1.2. <i>Salmonella</i> etkenlerinin cins düzeyinde kültürel ve biyokimyasal özellikleri	5
Çizelge 1.3. <i>Salmonella</i> etkenlerinin tür ve alt tür düzeyinde kültürel ve biyokimyasal özellikleri	5
Çizelge 2.1. <i>S. Enteritidis</i> suşlarının kümes yetiştirme tipi ve coğrafik lokasyona göre dağılımı	11
Çizelge 2.2. Kullanılan antimikrobiyallerin sınıf, alt sınıf ve konsantrasyonları	16
Çizelge 2.3. <i>S. Enteritidis</i> MLVA PZR primerleri	18
Çizelge 2.4. Multipleks-1 PZR bileşenleri, hacimleri ve konsantrasyonları	19
Çizelge 2.5. Multipleks-2 PZR bileşenleri, hacimleri ve konsantrasyonları	19
Çizelge 2.6. Multipleks PZR koşulları; sıcaklık, süre ve döngü sayısı	20
Çizelge 2.7. Fragment analizi mastermix bileşenleri	20
Çizelge 3.1. Antimikrobiyaller için dirençli, orta dirençli ve duyarlı suş sayısı ve yüzde oranları	21
Çizelge 3.2. MDR <i>S. Enteritidis</i> izolatlarının coğrafik lokasyona göre dağılımı	24
Çizelge 3.3. <i>S. Enteritidis</i> PFGE genotipleri için elde edilen oranlar	29

Çizelge 3.4. *S. Enteritidis* MLVA genotipleri için allelik profiller ve oranlar 31

Çizelge 3.5. *S. Enteritidis* VNTR lokusları genetik çeşitliliği 33



1. GİRİŞ

1.1. *Salmonella* Etimoloji ve Nomenklatürü

Salmonella, ilk kez 1880 yılında bakteriyolog Dr. Karl Joseph Ebert tarafından tifolu hastalardan izole edilmiş tifoidal basil olarak tanımlanmıştır. Veteriner patolog Dr. Daniel Elmer Salmon, 1885 yılında etkeni domuzlardan izole ederek domuz kolera basili olarak adlandırmıştır. Bakteriyolog Joseph Lignieres, 1900 yılında Dr. Salmon’a ithafen bakteri cins adını “*Salmonella*” olarak belirlemiştir. Hemen ardından 1901 yılında kültürel ve serolojik tespiti Schottmüller tarafından gerçekleştirilmiştir (Monte ve Sellera, 2020). *Salmonella* serovarları “The World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* (WHOCC-Salm)” kuruluşu tarafından hazırlanan şemada antijenik formülasyonlar şeklinde tanımlanmaktadır. White tarafından ilk referans şema, 1926 yılında geliştirilmiştir. F. Kauffmann’ın *Salmonella* komitesine katılımıyla 1934 yılında şema, “Kauffmann-White şeması” adını almış ve 44 serovarı içeren ilk baskısı yayınlanmıştır. L. Le Minor’ün komiteye katılımıyla şema 1965 yılında “White-Kauffmann-Le Minor” şeması olarak adlandırılmıştır. P. A. D. Grimont ve F.X. Weill, 2003-2007 yılları arasında şemayı 2555 serovar olarak güncellemiştir. Günümüzde “Antigenic Formulae of The *Salmonella* Serovars” olarak da bilinen şema, yeni serovarların eklenmesiyle yıllık olarak güncellenmektedir (Patrick ve Weill, 2007).

1.2. *Salmonella* Etiyoloji ve Taksonomisi

Salmonella etkenleri, Gram negatif, çomak şeklinde (0,7-1,5 x 2-5 µm), kapsülsüz ve sporsuz bakterilerdir. Fakültatif anaerobik, katalaz pozitif, oksidaz negatif olan bu etkenler, mezofilik koşullarda pH 6,5-7,5 aralığında optimal üreme göstermektedir. *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (*S. Gallinarum*) ve *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum (*S. Pullorum*) hariç diğer tüm *Salmonella* serovarları, peritrik flagella ile aktif olarak hareket etme yeteneğine sahiptir (Markey ve ark., 2013).

Salmonella cinsi *Proteobacteria* şubesi, *Gammaproteobacteria* sınıfı *Enterobacterales* takımı, *Enterobacteriaceae* ailesi içerisinde yer almaktadır. *Salmonella* cinsi, *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere 2 türden oluşmaktadır. *Salmonella enterica*, *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *indica* (IV) ve *S. enterica* subsp. *houtenae* (VI) olmak üzere 6 alt türe ayrılmaktadır. Bu alt türlerden yalnızca *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, sıcakkanlı canlılarda enfeksiyon oluşturmaktadır. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* içerisinde 2600’ü aşkın serovar bulunmaktadır (Eng ve ark., 2015).

Salmonella serovarları, konak spesifik ve konak spesifik olmayan serovarlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Konak spesifik serovarlar *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) (insan), *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* (kümes hayvanları), *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin (sığır), *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis (domuz)’dir. Konak spesifik olmayan serovarlar ise hem insan hem de hayvanları içeren geniş bir konak aralığında enfeksiyon oluşturmaktadır. Bu serovarlara, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*), *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis (*S. Infantis*), *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) vb. serovarlar örnek verilebilir (Çizelge 1.1) (Markey

ve ark., 2013). *Salmonella* etkenleri için bir diğer sınıflandırma, tifoidal ve tifoidal olmayan *Salmonella* serovarları şeklindedir. Tifoidal serovarlar, *S. Typhi*, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi A, B, C, *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum*'dur. Tifoidal olmayan serovarlara ise *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium* vb. serovarlar örnek verilebilir (Eng ve ark., 2015).

Çizelge 1.1. *Salmonella* serovarları, konakları ve oluşturdıkları enfeksiyonlar.

Konak		Serovar adı	Enfeksiyon
Konak spesifik serovarlar	Koyun	<i>S. Abortusovis</i>	Abort ve diare
	At	<i>S. Abortusequi</i>	Abort ve diare
	Domuz	<i>S. Choleraesuis</i>	Enteritis ve sepsisemi
	Sığır	<i>S. Dublin</i>	Enteritis ve sepsisemi
	Kümes hayvanları	<i>S. Gallinarum</i>	Kanatlı tifosu
	İnsan	<i>S. Paratyphi</i>	Paratifoidal ateş
	Kümes hayvanları	<i>S. Pullorum</i>	Pullorum hastalığı
	İnsan	<i>S. Typhi</i>	Tifoidal ateş
Konak spesifik olmayan serovarlar	At, domuz, koyun, kümes hayvanları, sığır ve insan	<i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Infantis</i> , <i>S. Kentucky</i> , <i>S. Typhimurium</i> ve diğer pek çok serovar	Enteritis, sepsisemi ve gıda zehirlenmesi

1.3. *Salmonella* Epidemiyolojisi

Salmonella etkenleri, memeliler, kuşlar ve sürüngenler olmak üzere geniş bir konak yelpazesinde salmonellozise neden olmaktadır. Salmonellozis, dünya çapında en sık görülen ikinci zoonotik enfeksiyondur. İnsanlarda, yıllık ortalama 94 milyon gastroenterit vakası ile 155,000 ölüm meydana gelmektedir (Almeida ve ark., 2013 ve Tang ve ark., 2019). İnsanlarda salmonellozisde enterik ateş, bakteriyemi, ishal, mide krampları ve mide bulantısı gibi komplikasyonlar gözlenmektedir. Kanatlı hayvanlarda ise artrit, halsizlik, iştahsızlık, sepsisemik ishal, topallık ve ölüme varan

farklı klinik tablolar oluşturmaktadır. Tifoidal *Salmonella* orijinli salmonellozis vakalarında morbidite ve mortalite yüksektir (Eng ve ark., 2015).

Salmonella etkenlerinin doğal habitatı insan ve hayvanların bağırsaklarıdır. Bu durum, etkenin dışkı ile saçılmasına neden olmaktadır. Hem horizontal hem de vertikal bulaşmanın olması salmonellozis prevalansını artırmaktadır. *Salmonella* etkenleri, enfekte canlılar ile direkt olarak bulaşabildiği gibi kontamine bitkisel ürünler, hayvansal ürünler ya da çevresel faktörler ile indirekt olarak da bulaşmaktadır. Kontamine gıda ve içme suyu ile gıda zincirine bulaşmanın olması halk sağlığında ciddi riskler oluşturmaktadır (Mezal ve ark., 2014 ve Tang ve ark., 2019).

İnsan ve hayvanlardaki salmonellozis vakalarının %99'u *S. enterica* subsp. *enterica* orijinlidir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority, EFSA) 2019 yılı zoonotik etkenler raporuna göre, insanlarda en yaygın görülen salmonellozis major etkeni %50,3'lük oran ile *S. Enteritidis*'dir (EFSA, 2021). Global olarak, *S. Enteritidis* insanlarda salmonellozis nedeni olarak sıklıkla bildirilmektedir (Wei ve ark., 2019). *S. Enteritidis* için major bulaşma yolunun kontamine yumurta ve kanatlı eti tüketimi olduğu bilinmektedir (Campioni ve ark., 2013 ve Liu ve ark., 2011). Bu nedenle, tavuk orijinli suşların çeşitlilik ve epidemiyolojilerinin belirlenmesi, salmonellozis enfeksiyonunun izlenmesi ve kontrol altına alınmasında oldukça önemlidir (Hashemi ve ark., 2017).

1.4. *Salmonella* İzolasyon ve İdentifikasyonu

Salmonella etkenleri, "British Standarts Instution" tarafından yayınlanan uluslararası altın standart "International Organization for Standardization 6579:2017" izolasyon yöntemi ile izole edilmektedir (The British Standards Institution, 2017).

İzolasyon prosedürü ile *Salmonella* spp. olarak adlandırılan etkenler kültürel, biyokimyasal, antijenik ve genetik özelliklerine göre tiplendirilmektedir (Çizelge 1.2 ve 1.3). Biyokimyasal testler, suş ya da serovar düzeyinde ayırım yapmada yetersiz kalmaktadır (Markey ve ark., 2013). Suş ya da serovar düzeyinde teşhis için konvansiyonel serotiplendirme ya da genotiplendirme yapılmaktadır.

Çizelge 1.2. *Salmonella* etkenlerinin cins düzeyinde kültürel ve biyokimyasal özellikleri.

O/F	Fakültatif anaerobik	Glikoz	+
Katalaz	+	Sükroz	-
Oksidaz	-	Laktoz	-
Hareket	d	Ksiloz	+
Gaz	+	Lizin	+
Hidrojen sülfür	+	Lizin dekarboksilaz	+
İndol	-	β-galaktozidaz	-
Sitrat	+	Fenilalanin deaminaz	-
Üre	-	Ornitin dekarboksilaz	+
Metil red	+	Voges-Proskauer	-

+, suşların %90-100'ı pozitif; d, suşların %26-27'si pozitif; -, suşların %0-10'u pozitif.

Çizelge 1.3. *Salmonella* etkenlerinin tür ve alt tür düzeyinde kültürel ve biyokimyasal özellikleri.

Özellik	<i>S. bongori</i>	<i>S. enterica</i>					
	(V)	<i>enterica</i> (I)	<i>salamae</i> (II)	<i>arizonae</i> (IIIa)	<i>diarizonae</i> (IIIb)	<i>indica</i> (IV)	<i>houtenae</i> (VI)
β-galaktozidaz	+	-	-	+	+	d	-
Laktoz	-	-	-	(-)	(+)	(-)	-
Dulcitol	+	+	+	-	-	d	-
Malonat kullanımı	-	-	+	+	+		-
Jelatin hidrolizi	-	-	+	+	+	+	+
KCN kültürü	+		-	-	-	-	-

+, suşların %90-100'ı pozitif; (+), suşların %76-89'u pozitif; d, suşların %26-75'i pozitif; (-) suşların %0-10'u pozitif.

Konvansiyonel serotiplendirme, 80 yılı aşkın bir süredir *Salmonella* enfeksiyonlarının izlenmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntem ile *Salmonella* suşları, yüzey (Vi), somatik (O) ve flagellin (H) antijenleri ile Kauffmann-White-Le Minor şemasına göre serovar düzeyinde tiplendirilmektedir. *Salmonella* etkenleri ilk olarak,

lipopolisakkarit yapıdaki O antijeni ile A'dan Z'ye kadar harflerle temsil edilen farklı "serogrup" düzeyinde sınıflandırılır. Ardından protein yapıdaki H antijenleri ile "Faz 1" ve "Faz 2" düzeyinde sınıflandırma yapılır. Hareketsiz serovarlar olan *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* serovarlarında iki faz da bulunmamaktadır. Monofazik serovarlarda ise tek bir faz bulunmaktadır (Patrick ve Weill, 2007 ve Tang ve ark., 2019). Ancak konvansiyonel mikrobiyolojik ve serolojik temellere dayalı bu yöntem iş yükü fazla, pahalı ve zaman alan bir yöntemdir; plazmasından elde edilmiş maliyeti yüksek antijen-spesifik mono ve poli antiserumlar gerektirmektedir. Analiz için minimum 3 gün gerekirken yanlış negatif reaksiyonlar ile bu süre uzayabilmektedir. Değerlendirmesi güç olan aglütinasyon reaksiyonları için iyi eğitilmiş personeller gerekmektedir. Bu nedenle suş, klan ya da serovar düzeyinde hızlı ve doğru teşhise olanak sağlayan genotiplendirme yöntemleri günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Genotiplendirme yöntemleri, epidemiyolojik çalışmalarda objektif ve güvenilir bir araç olarak salgın kaynağının ve bulaşma yollarının saptanmasına olanak sağlamaktadır (Dewaele ve ark., 2012 ve Tang ve ark., 2019). *Salmonella* için kullanılan başlıca genotiplendirme yöntemleri şunlardır: AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), MLST (Multilocus Sequence Typing), MLVA (Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis), PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), Ribotyping, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), vb. (Ferrari ve ark., 2017 ve Torpdahl ve ark., 2005).

1.5. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

PFGE, ilk kez 1984 yılında tanımlanmış uluslararası bir genotiplendirme yöntemidir. Spesifik bir bakteriyel patojenin farklı suşları arasındaki genetik benzerliği saptamakta kullanılmaktadır. *Salmonella* genotiplendirilmesinde altın standart kabul edilen PFGE, salmonellozis salgın araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Tang ve ark., 2019).

PFGE, genomik DNA'nın spesifik restriksiyon enzimi ile 10-800 kb büyüklüğünde 10-30 adet fragmente kesilmesine ve fragmentlerin elektroforez ile ayrıştırılmasına dayanmaktadır. Elde edilen "fingerprint paternleri" sayesinde bakteri izolatları ayrıştırılır (Ferrari ve ark., 2017). *Salmonella* gibi Gram negatif bakteriler için *Xba*I, *Sfi*II, *Not*I ve *Spe*I gibi farklı restriksiyon enzimleri kullanılmaktadır. *Xba*I, *Salmonella* PFGE analizi için yaygın olarak tercih edilen restriksiyon enzimidir (Dewaele ve ark., 2012 ve Tang ve ark., 2019).

PFGE, ayırım gücü yüksek bir testtir. Ancak değerlendirmesi zor, laboratuvar iş yükü fazla ve zaman alan (4-6 gün) bir yöntemdir (Tang ve ark., 2019). Eğitimli personel ve standardize edilmiş protokollere ihtiyaç duyulmaktadır (Liu ve ark., 2016). Bu dezavantajlar, PFGE'nin geniş bir örnek grubu için kullanılabilirliğini azaltmaktadır. Ayrıca tek restriksiyon enzimi kullanılması nedeniyle analizin ayırım gücü, bakteri genomunun içerdiği plazmitler, transpozonlar ve integronlara göre değişkenlik göstermektedir (Dewaele ve ark., 2012 ve Wei ve ark., 2019). *S. Enteritidis* gibi genetik olarak homojen etkenlerin epidemiyolojisini saptamada, PFGE ayırım gücünün sınırlı olduğu bilinmektedir (Liu ve ark., 2011; Mezal ve ark., 2014; Muvhali ve ark., 2017 ve Wei ve ark., 2019). Bu nedenle bazı çalışmalarda PFGE'e tamamlayıcı ya da alternatif olarak ek bir genotiplendirme yönteminin kullanılması önerilmektedir (Ferrari ve ark., 2017 ve Liu ve ark., 2016). Bu genotiplendirme yöntemlerinin başında, MLVA gelmektedir. PFGE analizine tamamlayıcı olarak MLVA önerilen çalışmalarda, iki analiz yönteminin kombinasyonu ile *Salmonella* suşlarında ayırım gücünün arttığı bildirilmiştir. Böylelikle daha detaylı veriler sağlanarak verimli bir epidemiyolojik analiz gerçekleştirildiği öne sürülmüştür (Mezal ve ark., 2014 ve Wei ve ark., 2019). Pek çok çalışmada ise PFGE ile yüksek oranda klonal bulunan *S. Enteritidis* suşların tiplendirilmesinde MLVA'nın daha güçlü ayırım sağladığı ve MLVA'nın alternatif genotiplendirme analizi olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (Dewaele ve ark., 2012 ve Tang ve ark., 2019).

1.6. Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA)

MLVA, ilk kez 2000 yılında tanımlanan ve *S. Enteritidis* salgınlarında başarıyla kullanılan bir genotiplendirme yöntemidir (Tang ve ark., 2019). Bakteri genomunda bulunan ve “Değişken Sayıda Ardışık Tekrar” (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR) olarak adlandırılan değişken sayıda ardışık tekrarlı dizilerin tespitine dayalı bir DNA “fingerprint” analizidir. VNTR dizileri, biyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmeyen, kodlama yapan ya da yapmayan dizilerdir. VNTR dizileri büyüklükleri, aynı türe ait suşlar arasında değişken olan polimorfik bölgelerdir. Bu analizde temel olarak, VNTR dizileri polimorfizminin saptanması hedeflenmektedir. VNTR dizileri, Polimeraz Zincir Reaksiyon (Polymerase Chain Reaction, PCR) ile çoğaltılır. Çoğaltılan lokusların fragment analizi, kapiller elektroforez sistemleri ile gerçekleştirilir. Elde edilen diziler üzerinden her bir VNTR lokusunun allel tipi belirlenir. VNTR lokusları, allelik formülasyonlar şeklinde birleştirilerek MLVA genotipleri oluşturulur (Ferrari ve ark., 2017 ve Wei ve ark., 2019).

MLVA iş yükü az, ucuz ve standardizasyona açık bir genotiplendirme yöntemidir. Analiz, kısa bir sürede (1-2 gün) tamamlanmaktadır. Tekrarlanabilir, karşılaştırılabilir ve yorumlanabilir sonuçlara sahip olması yönünden kolay ve objektif bir analiz yöntemi olarak kabul edilmektedir. Geniş örnek gruplarını çalışmak için elverişlidir (Dewaele ve ark., 2012; Ferrari ve ark., 2017 ve Tang ve ark., 2019). Aktif bir salgında hızla evrimleşen bakteri suşlarının tiplendirilmesine ve orijinlerinin tespitine olanak sağlamaktadır. Bulaşma rotalarının saptanmasında, antimikrobiyal direncin tespitinde ve gıda güvenliğinde sıklıkla kullanılmaktadır. *Bacillus anthracis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Clostridium perfringens*, *Coxiella burnetii*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Leptospira interrogans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* ve *Yersinia pestis* gibi pek çok bakteri türü için MLVA test prosedürü bulunmaktadır (Hashemi ve ark., 2017). Özellikle gıda kaynaklı patojenlerinin izlenmesinde güçlü bir araç olarak

sıklıkla önerilmektedir (Martin ve ark., 2018 ve Mezal ve ark., 2014). *S. Enteritidis* gibi yüksek oranda genetik homojenite gösteren bakteriyel etkenlerin tiplendirilmesi için de kullanılabilmektedir (Tang ve ark., 2019). Pek çok güncel literatürde insan ve insan dışı kaynaklardan izole edilen *S. Enteritidis* suşları ayırımında MLVA'nın, altın standart kabul edilen PFGE'den daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğu vurgulanmıştır. PFGE ile ayırt edilemeyen *Salmonella* suşlarının MLVA ile ayırt edilebildiği bildirilmiştir. (Dewaele ve ark., 2012; Ferrari ve ark., 2017 ve Lindstedt ve ark., 2004).

S. Enteritidis suşlarının MLVA ile tiplendirilmesi üzerine farklı test protokolleri bulunmaktadır. Bu protokollerde kullanılan VNTR lokusları, primer dizileri, marker standartları, floresan boyalar ve dizi analizi platformları değişkenlik göstermektedir. *S. Enteritidis* için standardize edilmiş MLVA protokollerinden biri, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention, CDC)'nin önerdiği MLVA standart operasyon prosedürüdür. Bu prosedürde, *S. Enteritidis* SE1, SE2, SE3, SE5, SE6, SE8 ve SE9 olmak üzere toplam 7 adet VNTR lokusu için fragment analizi gerçekleştirilmektedir. Elde edilen diziler, *S. Enteritidis* VNTR allel listesine göre tiplendirilerek MLVA genotipleri saptanmaktadır (CDC, 2013 ve Tang ve ark., 2019).

1.7. Antimikrobiyal Direnç (AMR)

Antimikrobiyallerin terapötik amaçlar dışında kullanımı gibi yanlış uygulamalar nedeniyle tedavide başarısızlık, maliyet artışı, mortalite artışı, vb. olumsuz sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Jiang ve ark., 2021). En önemli olumsuz sonuçlardan biri, dirençli bakteri suşlarının gelişmesidir. Yanlış uygulamalar nedeniyle antibiyotik direnci insidens ve çeşitliliğinde büyük oranda artış olmuştur. Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA)'ne göre, artan antimikrobiyal direnç dünya çapında

önemli bir tehdit olarak kabul edilmektedir (Shang ve ark., 2021 ve Wang ve ark., 2020). *Salmonella*, direnç artışı gözlenen bakteri cinslerinden biridir. İlk kez 1960'lı yıllarda yalnızca kloramfenikole karşı direnç tespit edilmişken günümüzde pek çok çalışmada çeşitli antimikrobiyallere dirençli *Salmonella* suşları raporlanmıştır (Eng ve ark., 2015). Özellikle çoklu-ilaç dirençli (multi-drug resistant, MDR) *Salmonella* suşlarının ortaya çıkmasıyla *Salmonella* enfeksiyonunun insan ve hayvan sağlığı için oluşturduğu riskler artmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) tarafından yayınlanan antimikrobiyal direncin sürveyansına ilişkin küresel rapora göre, tifoidal olmayan MDR *Salmonella* birçok ülkede ciddi bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir (Dominguez ve ark., 2021). Bu nedenle *Salmonella*, WHO'nun öncelikli patojen listesine alınarak takip edilmeye başlanmıştır (Tacconelli ve ark., 2018). Dirençli *Salmonella* etkenleri, gıda kontaminasyonu ile insanlara bulaşmakta ve tedavisi güç zoonoz enfeksiyonlar oluşturmaktadır. Bu nedenle tavuk orijinli *Salmonella* etkenlerinin antimikrobiyal direnç takibi, halk ve hayvan sağlığı açısından oldukça önemlidir (Dominguez ve ark., 2021 ve Shang ve ark., 2021).

Bu tez çalışmasında, Türkiye'de ilk kez tavuk orijinli *S. Enteritidis* suşlarının MLVA ile genotiplendirilmesi ve MLVA genotiplendirme bulgularının, PFGE genotiplendirme bulguları ile karşılaştırılarak yöntemlerin avantaj ve dezavantajlarının belirlenmesi amaçlandı. Bununla birlikte, *S. Enteritidis* suşlarına ait AMR, PFGE ve MLVA analiz bulguları, kümes yetiştirme tipi, izolasyon yılı ve coğrafik lokasyon parametreleri ile birlikte değerlendirilerek epidemiyolojik analiz yapılması hedeflendi.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. *Salmonella* Enteritidis Suşları

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan tavuk orijinli 200 adet *S. Enteritidis* suşu kullanıldı. 2018-2020 yılları arasında kanatlı endüstrisinin yoğun olduğu iller başta olmak üzere 16 farklı ildeki broyler, broyler damızlık, yumurtacı ve yumurtacı damızlık tavuk kümeslerinden izole edilmiş suşlar seçildi (Çizelge 2.1). Tüm analizlerde pozitif kontrol suşu olarak “Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC)” 13076 *S. Enteritidis* suşu kullanıldı.

Çizelge 2.1. *S. Enteritidis* suşlarının kümes yetiştirme tipi ve coğrafik lokasyona göre dağılımı.

Lokasyon	Broyler	Broyler damızlık	Yumurtacı	Yumurtacı damızlık
Afyon			5	
Ankara	1	7		
Aydın			1	
Balıkesir	53	1	1	1
Bilecik	6			
Bolu	12	1	1	
Bursa	26	2		
Çanakkale	25		1	
Düzce	2		1	
İzmir	18	1	1	
Konya			2	
Kütahya			2	

Manisa	11		1	
Sakarya	13	1		
Samsun			2	
Uşak		1		
Toplam	167	14	18	1

2.1.2. Kullanılan Besiyeri, Kimyasal ve Solüsyonlar

Tez çalışmasında kullanılmak üzere temin edilen besiyeri, kimyasal ve solüsyonlar aşağıda listelenmiştir.

Agaroz: Agaroz (Biomax, İspanya), SeaKem Gold agaroz (Lonza, İsviçre), PFGE agaroz (Biorad, Amerika).

Agaroz boyama solüsyonu: Etidyum bromür (Merck, Amerika).

Antibiyotik disk: Ampisilin (AMP), Gentamisin (CN), Kloramfenikol (C), Meropenem (MEM), Nalidiksik asit (NA), Sefotaksim (CTX), Sefoksitin (FOX), Seftazidim (CAZ), Seftriakson (CRO), Siprofloksasin (CIP), Sülfanomidler (S), Tetrasiklin (TE), Trimetoprim (W), Trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) (Oxoid, Birleşik Krallık).

Antiserum: *Salmonella* Polyvalent A-S+Vi, *Salmonella* Polyvalent OMA, *Salmonella* monovalent O:9, *Salmonella* monovalent O:12, *Salmonella* Polyvalent H, *Salmonella* monovalent H:g, *Salmonella* monovalent H:m ve *Salmonella* monovalent H:qstpu (SSI, Danimarka).

Mueller-Hinton agar: Mueller-Hinton agar (Oxoid, Birleşik Krallık).

Nutrient agar: Nutrient agar (Oxoid, Birleşik Krallık).

Proteinaz-K: Proteinaz-K (Thermo Scientific, Amerika).

Restriksiyon enzimi: *Xba*I restriksiyon enzimi (Thermo Scientific, Amerika).

Ultra saf su: Ultra saf su (SNP Biotechnology, Türkiye).

10x TBE: 10x TBE (SNP Biotechnology, Türkiye).

10x TE: 10x TE (SNP Biotechnology, Türkiye).

2.1.3. Laboratuvar Cihaz ve Ekipmanları

Tez çalışmasında kullanılan laboratuvar cihaz ve ekipmanları aşağıda listelenmiştir.

Biyolojik güvenlik kabini: Safe 2020 Laminar flow (Thermo Scientific, Amerika).

Çalkamalı inkübatör: İnkübatör (Mettler, Almanya).

Densitometre: Den1 Mc Farland densitometre (Biosan, Ukrayna).

Derin dondurucu: -20°C derin dondurucu (Bosch, Almanya) ve -80°C derin dondurucu (Thermo Scientific, Amerika).

Dizi analiz cihazı: Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, Amerika)

Etüv: HeraTherm 37°C (Thermo Scientific, Amerika).

Görüntüleme ünitesi: G:Box, UV (SynGene, Hindistan).

Güç kaynağı: Elite 300 Plus elektroforez güç kaynağı (Wealtec, Birleşik Krallık)

Hassas terazi: SBC41 hassas terazi (Scaltec, Amerika).

İnkübatör: DryBlock Heating Thermostat Bio TDB-200 inkübatör (Biosan, Ukrayna).

Jel elektroforez ünitesi: Owl A2 large Gel System 20 x 25 cm (Thermo Scientific, Amerika).

Jel elektroforez ünitesi tarakları: A2-24D (1,5 mm kalınlık, 6,5 mm genişlik, 7 µl hacim, 24 adet kuyucuk) (Thermo Scientific, Amerika).

Otoklav: StreamArt otoklav (Nüve, Türkiye).

Otomatik pipetler: Finn timer 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl'lik pipetler (Thermo Scientific, Amerika).

PFGE jel elektroforez ünitesi: CHEF-DRIII PFGE jel elektroforez ünitesi (Biorad, Amerika).

Santrifüj: MicroCL21 santrifüj (Thermo Scientific, Amerika).

Soğutucu: +4°C soğutucu (Bosch, Almanya).

Spektrofotometre: NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Amerika).

Termal cycler: Arktik cycler (Thermo Scientific, Amerika).

Vortex: Vortex (Fine, Kore)

2.1.4. Dizi Analiz Programları ve Veri Tabanları

Tez çalışmasında kullanılan fragment analiz programları ve veri tabanları aşağıda listelenmiştir.

CDC PulseNet veri tabanı: S. Enteritidis PulseNet standart protokollerine göre PFGE ve MLVA analizleri gerçekleştirildi.

Dizi analiz programı: Applied Biosystems marka “GeneMapper versiyon 5” programı MLVA analizi için kullanıldı.

Fingerprint analiz programı: Applied Maths marka BioNumerics GelCompar II versiyon 6.6.11 programı fingerprint analizi için kullanıldı.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. *Salmonella* Enteritidis Aktivasyonu ve Konvansiyonel Serotiplendirme

S. Enteritidis suşları, saf ve taze bakteri kültürleri elde etmek amacıyla Nutrient agar plaklarına pasajlandı. 37°C'lik aerobik koşullarda 24 s inkübe edildi. Bakteri suşları, konvansiyonel serotiplendirme analizi ile konfirme edildi. Bu amaçla *Salmonella* polyvalent ve monovalent O, H antiserumları ve Kauffmann-White-Le Minor referans şeması kullanıldı (Patrick ve Weill, 2007). Konvansiyonel serotiplendirme analizinde, ATCC 13076 *S. Enteritidis* suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

2.2.2. Antimikrobiyal Direnç Testi

Antimikrobiyal direnç testi, WHO *Salmonella* antimikrobiyal direnç testi protokolüne göre (<http://antimicrobialresistance.dk/>) gerçekleştirildi (WHO, 2018). Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile *Salmonella* için önerilen 14 farklı antibiyotik test edildi (Çizelge 2.2). Bakteri suşları, Nutrient agarda 37°C'lik aerobik koşullarda 24 s inkübasyon ile saf ve taze olarak üretildi. Standart çözelti olarak, 0,5 McFarland çözeltisi esas alındı ve 4 ml FTS (fizyolojik tuzlu su) çözeltisinde bakteri inokulumları hazırlandı. Hazırlanan inokulumlardan, Mueller-Hinton agar plaklarına steril bir svap ile 60°'lik açılarda yayma ekim yapıldı. Antibiyotik diskleri yerleştirilerek, agar plakları 37°C'lik aerobik koşullarda 16-18 s inkübe edildi. İnhibisyon zon çapları, mm olarak ölçüldü. Bakteri suşları dirençli, orta dirençli ve duyarlı şeklinde gruplandırıldı. Referans değerler için “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M100,

28'inci baskı)' kriterleri esas alındı (CLSI, 2018). Üç veya daha fazla antibiyotiğe dirençli izolatlar, MDR S. Enteritidis olarak tanımlandı (Dominguez ve ark., 2021).

Çizelge 2.2. Kullanılan antimikrobiyallerin sınıf, alt sınıf ve konsantrasyonları.

Antimikrobiyal sınıfı/alt sınıfı	Antimikrobiyal	Konsantrasyon
Aminoglikozitler	Gentamisin	10 µg
Beta Laktamlar/2.Nesil Sefalosporinler	Sefoksitin	30 µg
Beta Laktamlar/3.Nesil Sefalosporinler	Seftazidim	30 µg
	Sefotaksim	30 µg
	Seftriakson	30 µg
Beta Laktamlar/Karbapenemler	Meropenem	10 µg
Beta Laktamlar/Penisilinler	Ampisilin	10 µg
Fenikoller	Kloramfenikol	30 µg
Fluorokinolonlar/1.Nesil Kinolonlar	Nalidiksik asit	30 µg
Fluorokinolonlar/2.Nesil Kinolonlar	Siprofloksasin	5 µg
Sülfonamidler	Sülfonamidler	300 µg
	Trimetoprim	5 µg
	Trimetoprim-sülfametoksazol	25 µg
Tetrasiklinler	Tetrasiklin	30 µg

2.2.3. Darbeli Alan Jel Elektroforezi (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)

PFGE analizi, CDC *Salmonella* serovarları PulseNet PFGE standart protokolüne göre (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>) gerçekleştirildi (CDC, 2017). Bakteri suşları, Nutrient agarda 37°C'lik aerobik koşullarda 24 s inkübasyon ile saf ve taze olarak üretildi. Suşlar, hücre süspansiyon tamponunda (100 mM Tris: 100 mM EDTA, pH 8.0) OD610:1 olacak şekilde süspanse edildi. Hücre süspansiyonları, 1:1 oranında 400 µl %1'lik SeaKem Gold agaroz plaklara gömülerek agaroz plakları hazırlandı. Agaroz plakları, 25µl proteinaz-K (20 mg/ml) ve 5 ml hücre lizis tamponu (50 mM Tris: 50 mM EDTA, pH 8,0, %1 sarkosil) içerisine alındı.

Çalkalamalı su banyosunda 55°C'lik 175-200 rpm'de 1,5-2 s boyunca lizis gerçekleştirildi. Agaroz plakları, 2 kez 55°C sıcaklığında 10-15 ml ultra saf su ile 15'er dk yıkandı. Ardından 3 kez 55°C sıcaklığında 15 ml TE (10 mM Tris: mM EDTA, pH 8,0) ile 15'er dk yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkanan plaklar, 50U/μl *XbaI* restriksiyon enzimi (Thermo Fisher Scientific, USA) ile 37°C 1,5-2 s inkübe edilerek bakteriyel kromozom kesimi gerçekleştirildi. Plaklar, horizontal olarak %1'lik PFGE agaroz jel içerisine yerleştirildi. CHEF-DRIII (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field) kullanılarak elektroforez gerçekleştirildi. Elektroforez koşulları, 14°C sıcaklık, 19 s, 6V/cm (200V) akım ve 2,2-63,8 sn "lineer pulse" olarak ayarlandı. Yürütme tamponu olarak, 0,5 TBE çözeltisi kullanıldı. Agaroz jel, etidyum bromür (10mg/ml) solüsyonu ile 30 dk boyandı. Ultra saf su (500 ml) ile 2-3 kez 20 dk yıkama işlemi gerçekleştirildi. PFGE bant paternleri, G:BOX floresan görüntüleme ünitesi (Syngene, India) ile görüntülendi. BioNumerics GelCompar II 6.6.11 programı (Applied Maths, Belgium) ile *XbaI* filogenetik analizi gerçekleştirildi. Benzerlik dendrogramı, UPGMA (unweighted-pair group method using average) filogenetik ağaçlandırma metodu, Dice benzerlik katsayısı (%1 optimizasyon) ve %1,5 sapma değeri kullanılarak oluşturuldu. Bant paternleri karşılaştırılarak farklı PFGE genotipleri (PT) tespit edildi. Karşılaştırılan iki suş arasında en fazla 3 adet farklı bant mevcut ise suşlar genetik olarak yakın ilişkili kabul edildi. Farklı bant sayısı 3'ten fazla olan suşlar, 2 ya da daha fazla bağımsız mutasyon ile farklılaşmış ve genetik olarak uzak suşlar olarak kabul edildi (Tenover ve ark., 1995).

2.2.4. Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA)

MLVA, CDC S. Enteritidis PulseNet MLVA standart protokolüne göre (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/mlva.html>) gerçekleştirildi (CDC, 2013). Nutrient agarda saf ve taze olarak üretilmiş bakteri kolonilerinden kaynatma yöntemi ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi. DNA örnekleri, PZR analizinde kullanılabilecek -20°C’de saklandı. 7 farklı VNTR lokusu (SE1, SE2, SE3, SE5, SE6, SE8 ve SE9), spesifik primer çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldı (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. S. Enteritidis MLVA PZR primerleri.

Lokus	Floresan boya	İleri Primer (5'-3')	Geri Primer (5'-3')
SE-1	FAM	TGTGGGACTGCTTCAACCTTTG GGC	CCAGCCATCCATACCAAGACC AACACTCTATGA
SE-2	CallRed590	GTGCTTCCTCAGGTTGCTTTTAG CCTTGTTTCG	GGGGAATGGACGGAGGCGAT AGACG
SE-3	CallRed590	CGGGATAAGTGCCACATAACAC AGTCGCTAAGC	CGCCAGTGTTAAAGGAATGA ATGAACCTGCTGATG
SE-5	HEX	GGCTGGCGGGAAACCACCATC	GCCGAACAGCAGGATCTGTCC ATTAGTCACTG
SE-6	FAM	CTGGTCGCAGGTGTGGC	GGTGACGCCGTTGCTGAAGGT AATAACAGAGTC
SE-8	HEX	GGTAGCTTGCCGCATAGCAGCA GAAGT	GGCGGCAAGCGAGCGAATCC
SE-9	FAM	CCACCTCTTTACGGATACTGTCC ACCAGC	GGCGTTACTGGCGGCGTTTCG

Her bir suş için toplam hacim 10 µl olacak şekilde 2 adet multipleks PZR kuruldu. Multipleks-1 PZR ile SE1, SE2, SE6 ve SE8 VNTR lokusları çoğaltıldı. Multipleks-1 PZR için Çizelge 2.4’de belirtilen konsantrasyon ve hacimlerde PZR bileşenleri kullanıldı. Multipleks-2 PZR ile SE3, SE5 ve SE9 VNTR lokusları çoğaltıldı. Multipleks-2 PZR için Çizelge 2.5’te belirtilen konsantrasyon ve hacimlerde PZR bileşenleri kullanıldı. Multipleks PZR analizlerinde Çizelge 2.6’da belirtilen reaksiyon koşulları uygulandı.

Çizelge 2.4. Multipleks-1 PZR bileşenleri, hacimleri ve konsantrasyonları.

Bileşen	Hacim (µl)	Konsantrasyon
Deiyonize su	4,91	-
10xPZR tamponu	1,00	1x
50mM MgCl ₂	0,40	2,00 mM
10mM dNTP	0,20	0,20 mM
2,5 µM SE1-F	0,20	0,05 µM
2,5 µM SE1-R	0,20	0,05 µM
12,5 µM SE2-F	0,32	0,40 µM
12,5 µM SE2-R	0,32	0,40 µM
12,5 µM SE6-F	0,34	0,43 µM
12,5 µM SE6-R	0,34	0,43 µM
2,5 µM SE8-F	0,28	0,07 µM
2,5 µM SE8-R	0,28	0,07 µM
5U/µl Taq polimeraz	0,20	1,00 U
DNA	1,00	-
Toplam hacim	10,00	-

Çizelge 2.5. Multipleks-2 PZR bileşenleri, hacimleri ve konsantrasyonları.

Bileşen	Hacim (µl)	Konsantrasyon
Deiyonize su	5,52	-
10x PZR tamponu	1,00	1x
50 mM MgCl ₂	0,40	2,00 mM
10 mM dNTP	0,20	0,20 mM
12,5 µM SE3-F	0,40	0,50 µM
12,5 µM SE3-R	0,40	0,50 µM
2,5 µM SE5-F	0,20	0,05 µM
2,5 µM SE5-R	0,20	0,05 µM
2,5 µM SE9-F	0,08	0,02 µM
2,5 µM SE9-R	0,08	0,02 µM
5U/µl Taq polimeraz	0,20	1,00 U
DNA	1,00	-
Toplam hacim	10,00	-

Çizelge 2.6. Multipleks PZR koşulları; sıcaklık, süre ve döngü sayısı.

PZR basamağı	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95°C	5 dk	-
Denatürasyon	94°C	20 sn	34
Bağlanma	65°C	20 sn	
Uzama	72°C	20 sn	
Son uzama	72°C	5 dk	-

Her bir multipleks PZR örneği, Çizelge 2.7’de belirtilen toplam 9 µl hacmindeki fragment mastermix ile birleştirildi. Denatürasyon, 95°C’de 3 dk inkübasyon ile gerçekleştirildi. Denatüre edilen örnekler, Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, USA) kapiller elektroforez sistemine yüklendi. “GeneMapper versiyon 5” programı (Applied Biosystem, USA) ile fragment analizi gerçekleştirildi. Her bir suş için VNTR lokusları büyüklükleri ve allel tipleri belirlendi. VNTR lokusları allelleri, allelik formülasyonlar şeklinde birleştirilerek MLVA genotipi (MT) tespit edildi.

Çizelge 2.7. Fragment analizi mastermix bileşenleri.

Bileşen	Hacim (µl)
Hi-Di formamid	8
GeneFlo 625 bp size standart	1

3. BULGULAR

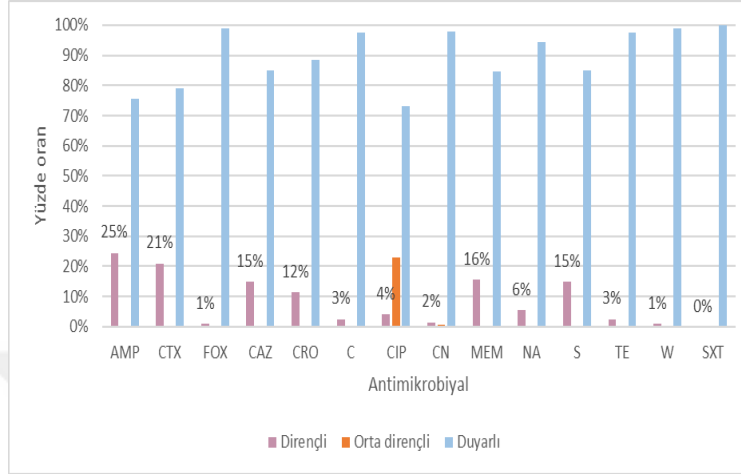
3.1. Antimikrobiyal Direnç Testi

Salmonella için önerilen 14 farklı antimikrobiyal ile gerçekleştirilen Kirby-Bauer disk difüzyon AMR testi sonucunda, *S. Enteritidis* suşlarının %57'si (113/200) tüm antimikrobiyallere karşı duyarlı bulundu. Tüm suşların %39'u (77/200) en az bir antimikrobiyale karşı dirençli bulundu. En yüksek direnç, AMP ve CTX için sırasıyla %25 (49/200) ve %21 (42/200) olarak tespit edildi. En yüksek orta dirençlilik CIP için %23 (46/200); en yüksek duyarlılık SXT için %100 (200/200) olarak tespit edildi (Çizelge 3.1). FOX ve W için %99 (198/200); C, CN ve TE için %98 (195/200); nalidiksik asit için %95 (189/200) olmak üzere 6 farklı antimikrobiyale karşı %90'ın üzerinde duyarlılık tespit edildi (Şekil 3.1).

Çizelge 3.1. Antimikrobiyaller için dirençli, orta dirençli ve duyarlı suş sayısı ve yüzde oranları.

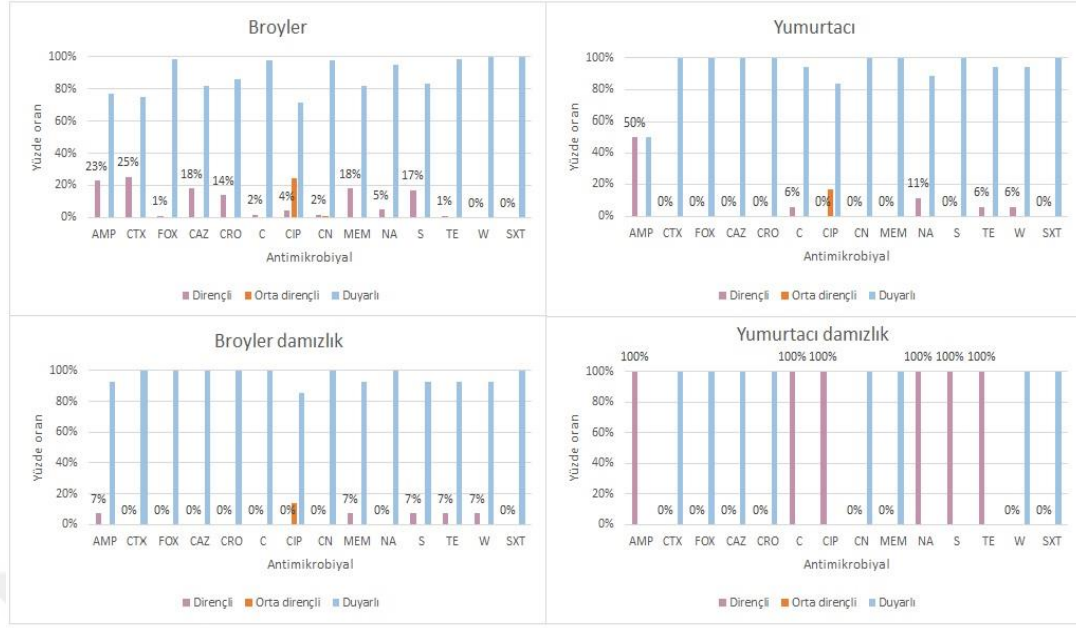
Antimikrobiyal	Dirençli	Orta dirençli	Duyarlı
AMP	49 (%25)	0	151 (%76)
CTX	42 (%21)	0	158 (%79)
FOX	2 (%1)	0	198 (%99)
CAZ	30 (%15)	0	170 (%85)
CRO	23 (%12)	0	177 (%89)
C	5 (%3)	0	195 (%98)
CIP	8 (%4)	46 (%23)	146 (%73)
CN	3 (%2)	1	196 (%98)
MEM	31 (%16)	0	169 (%85)
NA	11 (%6)	0	189 (%95)
S	30 (%15)	0	170 (%85)
TE	5 (%3)	0	195 (%98)

W	2 (%1)	0	198 (%99)
SXT	0	0	200 (%100)



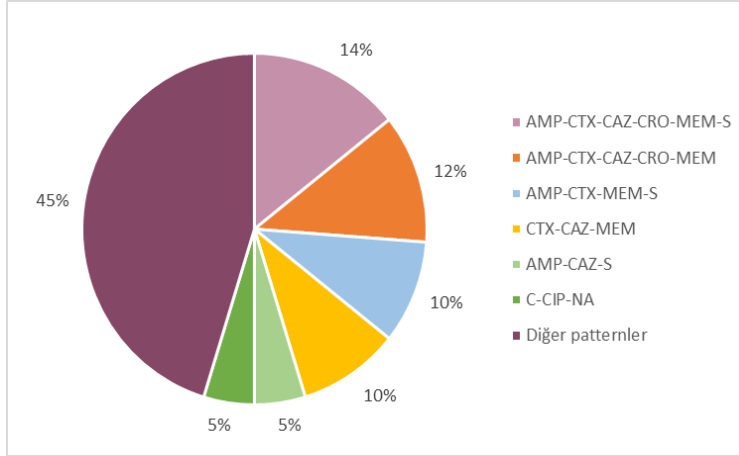
Şekil 3.1. S. Enteritidis izolatlarında dirençli, orta dirençli ve duyarlı izolatların antimikrobiyallere göre yüzde dağılımı. Grafik üzerindeki % değerler, dirençli izolatların oranını ifade etmektedir.

Broyler izolatları için en yüksek direnç, CTX ve AMP için sırasıyla %25 (42/167) ve %23 (38/167) olarak tespit edildi. Broyler damızlık izolatlarında en yüksek direnç, AMP, MEM, S, TE ve W için %7 (1/14) olarak tespit edildi. Yumurtacı izolatlarında en yüksek direnç, AMP ve NA için sırasıyla %50 (9/18) ve %11 (2/18) olarak tespit edildi. Test edilen 1 adet yumurtacı damızlık izolatı ise AMP, C, NA, S ve TE için dirençli bulundu (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *S. Enteritidis* dirençli, orta dirençli ve duyarlı izolatların kümes yetiştirme tipi ve antimikrobiyallere göre yüzde dağılımı. Grafik üzerindeki % değerler, dirençli izolatların oranını ifade etmektedir.

Tüm *S. Enteritidis* izolatlarının %21'nin (42/200) MDR *S. Enteritidis* olduğu saptandı. 25 farklı MDR profili identifiye edildi. Bu profiller arasında AMP-CTX-CAZ-CRO-MEM-S heksa-resistant profilinin %14 (6/42) oran ile baskın MDR profili olduğu saptandı. Baskın MDR profilinden sonra en yüksek orana sahip MDR profilleri, %12 (5/42) oran ile AMP-CTX-CAZ-CRO-MEM ve %10 (4/42) oran ile AMP-CTX-MEM-S, CTX-CAZ-MEM olarak tanımlandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. S. Enteritidis izolatlarında yaygın MDR profillerinin yüzde dağılımı.

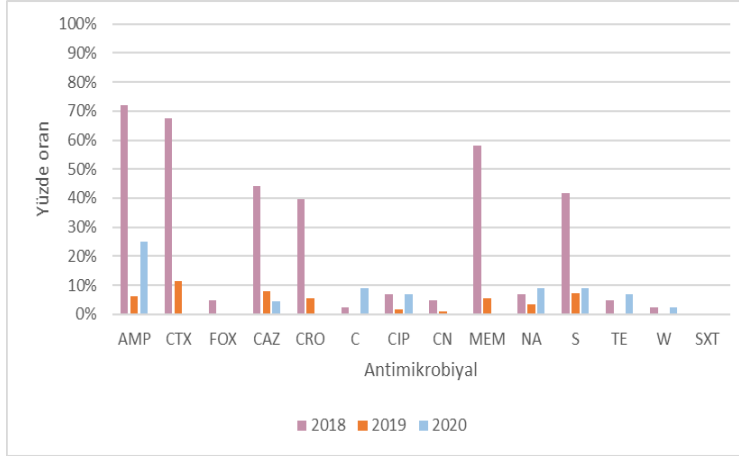
MDR S. Enteritidis izolatlarının coğrafik lokasyon olarak Ankara, Balıkesir, Bilecik, Bolu, Bursa, Düzce, İzmir, Konya, Manisa ve Sakarya illerine dağıldığı saptandı. Çizelge 3.2’de MDR S. Enteritidis izolatlarının coğrafik lokasyonlara göre MDR profilleri ve oranları yer almaktadır. MDR profilleri antimikrobiyaller bazında incelendiğinde, bir bakteri izolatında en fazla 9 farklı antimikrobiyale karşı direnç tespit edildi.

Çizelge 3.2. MDR S. Enteritidis izolatlarının coğrafik lokasyona göre dağılımı.

Lokasyon	MDR profili	Sayı (%)
Ankara	CAZ-CRO-CIP-MEM-S	1 (%2)
Balıkesir	AMP-C-CIP-S-TE	1 (%2)
	AMP-CAZ-S	2 (%5)
Bilecik	AMP-CTX-CAZ-CRO-MEM	1 (%2)
	AMP-CTX-CAZ-CRO-MEM-S	1 (%2)
	AMP-CTX-CRO-FOX-MEM-NA	1 (%2)
	AMP-CTX-MEM-S	3 (%7)
Bolu	C-S-TE	1 (%2)
	CTX-CAZ-CRO-CIP-MEM-NA-S	1 (%2)
	CTX-CAZ-CRO-MEM-NA-S	1 (%2)
	CTX-CAZ-CRO-S	1 (%2)
	CTX-CAZ-MEM	1 (%2)
	CTX-CAZ-MEM-S	1 (%2)
	CTX-CRO-CIP-MEM-NA	1 (%2)
Bursa	AMP-CTX-CAZ-CRO-CIP-MEM-NA-TE	1 (%2)
	AMP-CTX-CAZ-CRO-CN-MEM	1 (%2)

	AMP-CTX-CAZ-CRO-FOX-CIP-MEM-NA-S	1 (%2)
	AMP-CTX-CAZ-CRO-MEM	1 (%2)
	AMP-CTX-CAZ-CRO-MEM-S	5 (%12)
	AMP-TE-W	1 (%2)
	AMP-CTX-TE	1 (%2)
	AMP-CTX-S	1 (%2)
Düzce	CTX-CAZ-CRO-CN-MEM-S	1 (%2)
	CTX-CAZ-CRO	1 (%2)
İzmir	CTX-CAZ-MEM	3 (%7)
Konya	AMP-C-TE-W	1 (%2)
Manisa	C-CIP-NA	1 (%2)
Sakarya	C-CIP-NA	1 (%2)
	AMP-CTX-MEM-S	1 (%2)
	AMP-CTX-MEM	1 (%2)
	AMP-CTX-CAZ-CRO-MEM	3 (%7)

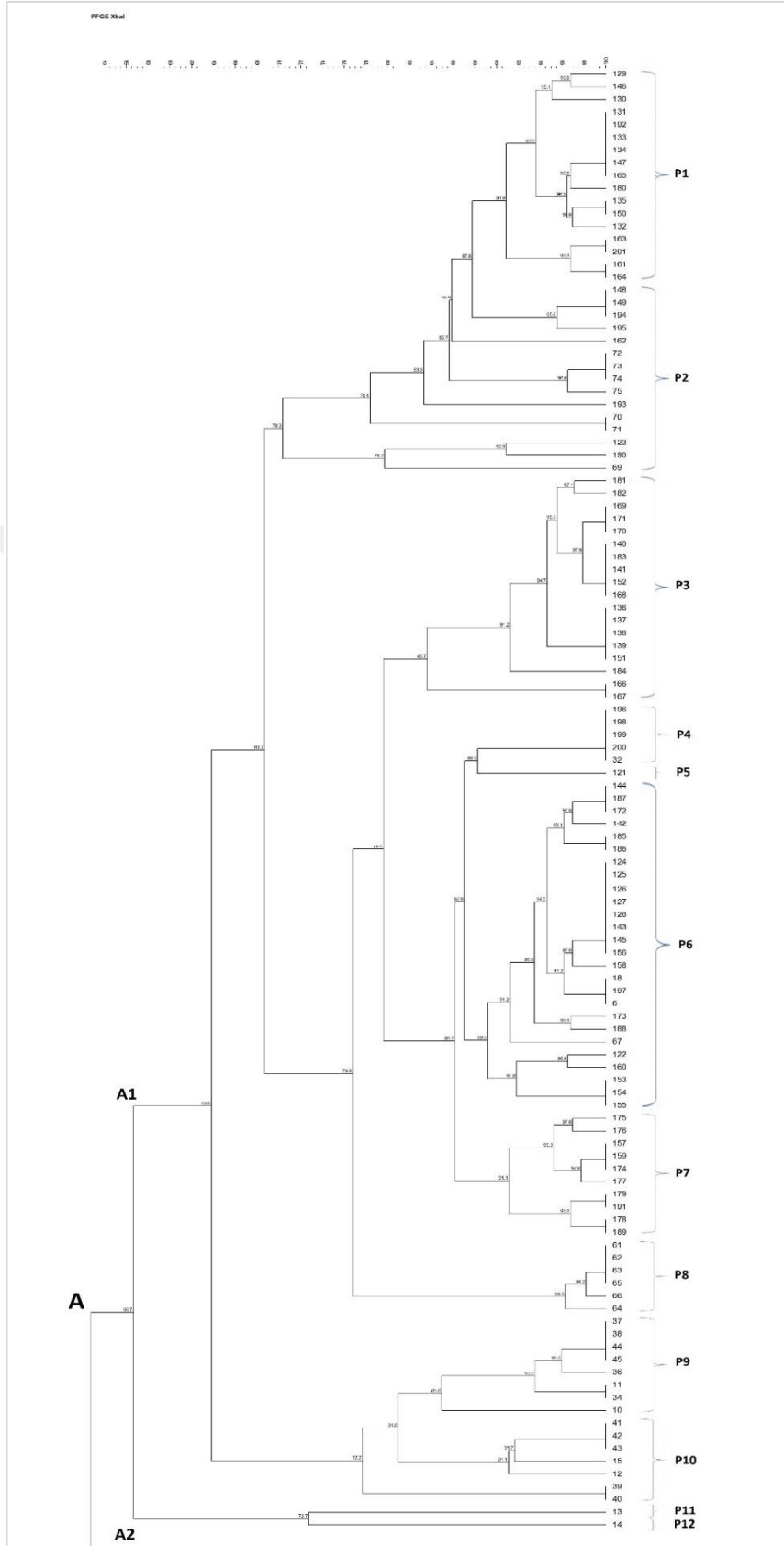
AMR testi ile elde edilen bulgular, izolasyon yılına göre değerlendirildi. 2018 yılında izole edilmiş 43 adet *S. Enteritidis* izolatu için, en yüksek direnç AMP, CTX ve MEM için sırasıyla %72 (31/43), %67 (29/43) ve %58 (25/43) olarak tespit edildi. En yüksek orta dirençlilik %65 (28/43) ile CIP'e karşı saptanırken; tüm 2018 izolatlarının SXT'e karşı %100 (43/43) duyarlı olduğu görüldü. 2019 yılında izole edilmiş 113 adet *S. Enteritidis* izolatu için, en yüksek direnç sırasıyla, CTX ve S için %12 (13/113) ve %58 (8/113) olarak tespit edildi. En yüksek orta dirençlilik %10 (11/113) ile CIP'e karşı saptanırken; tüm 2019 izolatlarının FOX, C, TE, W ve SXT'e karşı %100 (113/113) duyarlı olduğu görüldü. 2020 yılında izole edilmiş 44 adet *S. Enteritidis* izolatu için, en yüksek direnç AMP için %25 (11/44) olarak tespit edilirken; en yüksek orta dirençlilik %16 (7/44) ile CIP'e karşı tespit edildi. Tüm 2020 izolatlarının CTX, FOX, CRO, CN, M ve SXT'e karşı %100 (44/44) duyarlı olduğu görüldü (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. *S. Enteritidis* izolatlarında dirençli izolatların antimikrobiyallere ve yıllara göre yüzde dağılımı.

3.2. Pulsed-Field Gel Electrophoresis

*Xba*I-PFGE analizi ile elde edilen bant paternleri, UPGMA filogenetik ağaçlandırma yöntemi ile gruplandırıldı. Oluşturulan filogenetik ağaçta tüm *S. Enteritidis* izolatları, benzerlik indeksleri %52,8 ile %100 arasında değişen *Xba*I-PFGE paternlerinde gruplandırıldı (Şekil 3.5). Tüm izolatlar, A ve B taksonu olmak üzere 2 ana taksona ayrıldı. İzolatların %57,5'ini (115/200) içeren A taksonu, baskın takson olarak tanımlanırken, A taksonunun A1 (n=113) ve A2 (n=2) olmak üzere 2 alt taksona ayrıldığı görüldü. A1 alt taksonu, A taksonunun % 98,2'sini oluşturan alt takson olarak tanımlandı. B taksonu ise izolatların %42,5'ini (85/200) içerdiği, B1 ve B2 olmak üzere 2 alt taksona ayrıldığı görüldü. B1 alt taksonunun, B taksonunda yer alan izolatların %89,4'nü kapsadığı saptandı.



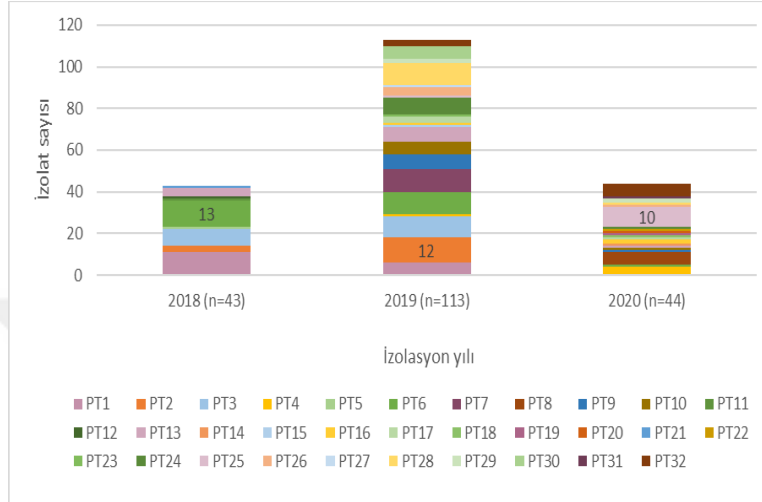
Şekil 3.5. *S. Enteritidis* suşlarının *Xba*I-PFGE analizi sonucu elde edilen dendrogramı.

gözlenen suşlar, aynı suşundan köken almış ve genetik olarak yakın suşlar olarak kabul edildi. PFGE paternleri arasında farklı bant sayısı 3'ten fazla olan suşlar, 2 ya da daha fazla bağımsız mutasyon ile farklılaşmış ve genetik olarak uzak suşlar olarak tanımlandı. *XbaI*-PFGE paternleri bu esaslara göre incelendiğinde, 32 farklı PFGE genotipi (PT1-PT32) belirlendi. Bunlardan PT6 genotipi, tüm izolatların %12,5'ini (26/200) oluşturan baskın PT olarak tanımlandı. PT6 genotipini sırasıyla %9, %8,5 ve %7,5 oran ile PT3, PT1 ve PT2 genotipleri takip etmektedir. A taksonunda 12, B taksonunda 20 PT bulunmaktadır. Baskın takson olan A taksonunun B taksonuna kıyasla, %40 daha az değişken olduğu saptandı. Bir diğer deyişle, A taksonunun B taksonuna kıyasla %60 daha korunmuş olduğu görüldü (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. *S. Enteritidis* PFGE genotipleri için elde edilen oranlar.

PT	Oran		PT	Oran	
PT1	0,085	(17/200)	PT17	0,020	(4/200)
PT2	0,075	(15/200)	PT18	0,005	(1/200)
PT3	0,090	(18/200)	PT19	0,005	(1/200)
PT4	0,025	(5/200)	PT20	0,005	(1/200)
PT5	0,005	(1/200)	PT21	0,005	(1/200)
PT6	0,125	(25/200)	PT22	0,005	(1/200)
PT7	0,055	(11/200)	PT23	0,005	(1/200)
PT8	0,030	(6/200)	PT24	0,045	(9/200)
PT9	0,040	(8/200)	PT25	0,055	(11/200)
PT10	0,035	(7/200)	PT26	0,025	(5/200)
PT11	0,005	(1/200)	PT27	0,005	(1/200)
PT12	0,005	(1/200)	PT28	0,060	(12/200)
PT13	0,060	(12/200)	PT29	0,020	(4/200)
PT14	0,005	(1/200)	PT30	0,030	(6/200)
PT15	0,005	(1/200)	PT31	0,005	(1/200)
PT16	0,015	(3/200)	PT32	0,045	(9/200)

PFGE genotipleri, izolasyon yılı bazında incelendiğinde Şekil 3.6'daki gibi bir dağılım saptandı. Baskın PFGE genotipinin 2018 yılı izolatlarında PT6 (n=13), 2019 yılı izolatlarında PT2 (n=12) ve 2020 yılı izolatlarında PT25 (n=10) olduğu tespit edildi.



Şekil 3.6. S. Enteritidis izolatlarında PFGE genotiplerinin yıllara göre dağılımı. Sütunlar üzerinde görülen değerler, belirtilen yıldaki baskın genotipe ait toplam izolat sayısını ifade etmektedir.

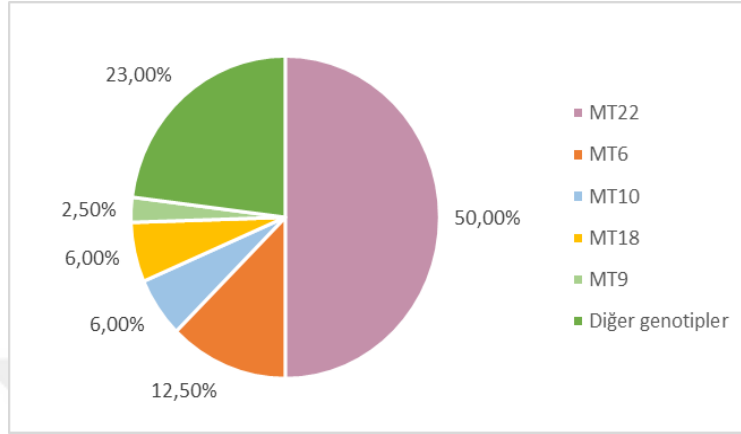
3.3. Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis

S. Enteritidis suşları, 7 VNTR lokusu allelik formlarının tespitine dayalı MLVA ile genotiplendirildi. Analiz sonucunda, 34 farklı MLVA genotipi (MT1-MT34) tespit edildi. Bunlardan 20 farklı MT, yalnızca bir izolatla tespit edilmiştir. MLVA genotipleri için allelik profiller, izolat sayısı ve oranı Çizelge 3.4'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.4. S. Enteritidis MLVA genotipleri için allelik profiller ve oranlar.

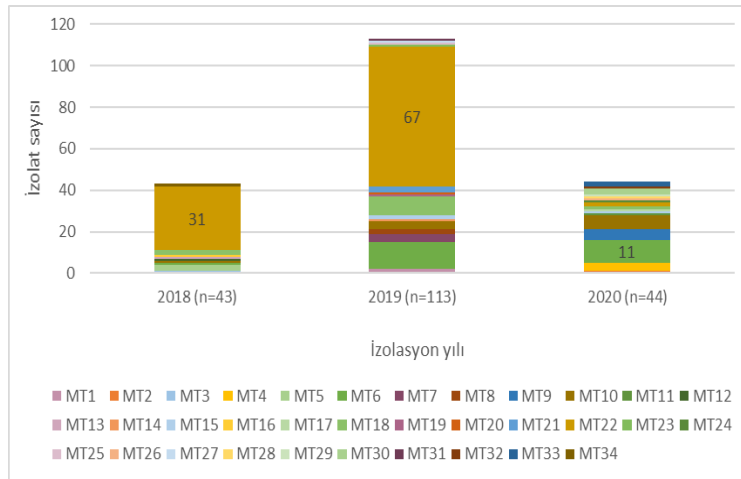
MT	SE1	SE2	SE 3	SE 5	SE 6	SE 8	SE 9	Oran	
MT1	1	3	7	10	10	1	3	0,010	(2/200)
MT2	1	5	7	10	10	1	3	0,005	(1/200)
MT3	4	4	7	10	10	1	3	0,005	(1/200)
MT4	4	6	3	10	10	1	2	0,020	(4/200)
MT5	4	7	3	9	10	1	2	0,015	(3/200)
MT6	4	7	3	10	10	1	2	0,125	(25/200)
MT7	4	7	3	11	10	1	2	0,020	(4/200)
MT8	4	7	5	11	10	1	2	0,010	(2/200)
MT9	4	7	7	9	10	1	3	0,025	(5/200)
MT10	4	7	7	10	10	1	3	0,060	(12/200)
MT11	4	7	7	12	10	1	3	0,005	(1/200)
MT12	4	7	10	7	10	1	2	0,005	(1/200)
MT13	4	7	10	13	10	1	2	0,005	(1/200)
MT14	5	3	7	6	10	1	4	0,005	(1/200)
MT15	5	3	7	10	10	1	3	0,015	(3/200)
MT16	5	3	7	10	10	1	4	0,005	(1/200)
MT17	5	3	7	12	10	1	3	0,005	(1/200)
MT18	5	4	7	10	10	1	3	0,060	(12/200)
MT19	5	4	7	10	10	1	4	0,005	(1/200)
MT20	5	5	7	6	10	1	4	0,005	(1/200)
MT21	5	5	7	9	10	1	3	0,015	(3/200)
MT22	5	5	7	10	10	1	3	0,500	(100/200)
MT23	5	5	7	10	10	1	4	0,005	(1/200)
MT24	5	5	7	11	10	1	3	0,005	(1/200)
MT25	5	5	7	12	10	1	3	0,005	(1/200)
MT26	5	5	7	13	10	1	2	0,005	(1/200)
MT27	5	7	3	8	10	1	2	0,005	(1/200)
MT28	5	8	3	9	10	2	2	0,005	(1/200)
MT29	5	8	3	10	10	1	2	0,005	(1/200)
MT30	7	8	7	9	10	1	2	0,015	(3/200)
MT31	7	11	7	11	10	1	2	0,005	(1/200)
MT32	7	29	7	17	10	1	2	0,005	(1/200)
MT33	21	5	7	10	10	1	3	0,010	(2/200)
MT34	21	7	10	13	10	1	2	0,005	(1/200)

Toplam izolat sayısının %50'sini (100/200) oluşturan MT22, baskın MLVA genotipi olarak tanımlandı. MT22 genotipini, %12,5 (25/200) oran ile MT6 genotipi takip etmektedir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. S. Enteritidis izolatlarında yaygın MLVA genotiplerinin yüzde dağılımı.

MLVA genotipleri, izolasyon yılı bazında incelendiğinde Şekil 3.8'deki gibi bir dağılım saptandı. Baskın MLVA genotipinin 2018 ve 2019 yılı izolatlarında MT22 (sırasıyla n=31 ve n=67), 2020 yılı izolatlarında MT6 (n=11) olduğu tespit edildi.



Şekil 3.8. S. Enteritidis izolatlarında MLVA genotiplerinin yıllara göre dağılımı. Sütunlar üzerinde görülen değerler, belirtilen yıldaki baskın genotipe ait toplam izolat sayısını ifade etmektedir.

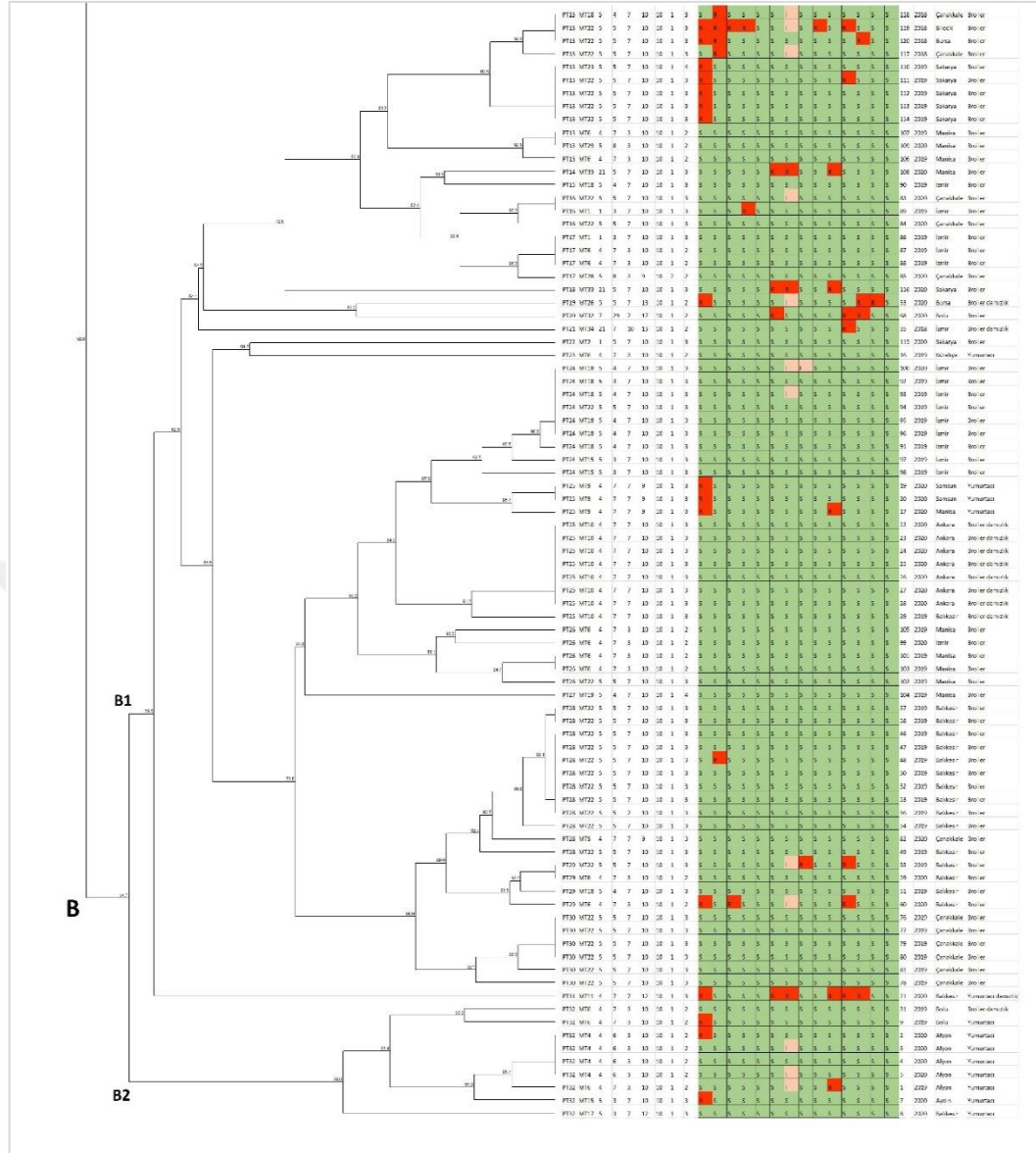
S. Enteritidis VNTR lokusları bireysel polimorfizmleri incelendiğinde en fazla varyanta sahip lokusların SE5 (n=9) ve SE2 (n=8) lokusları olduğu anlaşıldı. SE5 ve SE2 lokusları, en polimorfik lokuslar kabul edildi. Buna karşılık SE1 (n=5), SE3 (n=4), SE8 (n=2) ve SE9 (n=3) lokuslarının daha az polimorfizm gösterdiği saptandı. SE6 lokusunda ise tek varyant tespit edilerek herhangi bir polimorfizm görülmedi (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. S. Enteritidis VNTR lokusları genetik çeşitliliği.

VNTR lokus	Tekrar dizisi (bp)	Varyant sayısı
SE1	7	5
SE2	7	8
SE3	12	4
SE5	6	9
SE6	33	1
SE8	86	2
SE9	9	3

3.4. Antibiyotik Direnç Testi ve Genotiplendirme Bulgularının Karşılaştırılması

S. Enteritidis izolatları için antimikrobiyal direnç testi ve genotiplendirme bulguları karşılaştırıldı. Bu amaç doğrultusunda, AMR, PFGE ve MLVA analiz bulguları ile kümes yetiştirme tipi, izolasyon yılı ve coğrafik lokasyon gibi izolat parametreleri birlikte değerlendirildi. Analiz bulguları ve izolat parametrelerinin *Xba*I-PFGE dendrogramı ile kombine edildiği Şekil 3.9 karşılaştırma şeması üzerinden epidemiyolojik analiz gerçekleştirildi.



Şekil 3.9. Devam. *S. Enteritidis* suşları izolat verileri ve genotiplendirme bulguları karşılaştırma şeması. AMR testinde dirençli suşlar kırmızı, orta dirençli suşlar turuncu ve duyarlı suşlar yeşil kutular ile ifade edilmektedir.

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışması ile Türkiye’de ilk kez tavuk orijinli *S. Enteritidis* suşları MLVA ile genotiplendirildi. Tüm *S. Enteritidis* suşları için AMR profilleri ve PFGE genotipleri belirlendi. Elde edilen antimikrobiyal direnç ve genotiplendirme bulguları, yetiştirme tipi, izolasyon yılı ve coğrafik lokasyon gibi parametreler bazında incelendi. Suşlar arası klonal ilişki, filogenetik analiz ile ortaya konularak epidemiyolojik analiz gerçekleştirildi. MLVA genotiplendirme bulguları ile PFGE genotiplendirme bulguları karşılaştırılarak genotiplendirme yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları ortaya konuldu.

Son yıllarda, enfeksiyöz etkenlerin antimikrobiyal direncinde hızlı bir artış söz konusudur. Dirençli bakteriler çapraz kontaminasyon ile hayvan ve insanlara bulaşmakta, bulaşıcı hastalıkların antimikrobiyallerle tedavisi zorlaşmaktadır. Bu nedenle, antimikrobiyal direncin artışı küresel bir sorun kabul olarak edilmektedir. MDR *Salmonella* izolatlarının insan ve hayvanlarda hızla arttığı pek çok bilimsel çalışma ile bildirilmektedir. MDR *Salmonella* kaynaklı salmonellozisin klinik tablosu daha şiddetli ve uzun seyretmektedir. Tedavisi oldukça zordur. Daha enfeksiyonun başlangıcında, sepsis ve iç organlarda anormallikler görülmektedir (Dominguez ve ark., 2021 ve Eng ve ark., 2015). Bu nedenle, zoonoz *Salmonella* etkenlerinde antimikrobiyal direncin takip edilmesi, halk ve hayvan sağlığı için önem teşkil etmektedir.

Bu tez çalışmasında, tavuk orijinli 200 adet *S. Enteritidis* izolatının AMR profili belirlendi. *S. Enteritidis* izolatlarının %57’si tüm antimikrobiyallere duyarlı; %39’u en az bir antimikrobiyale karşı dirençli bulundu. Utrarachkij ve ark. (2016), Tayland’da gerçekleştirdikleri çalışmalarında *S. Enteritidis* izolatlarının %86,6’sının en az bir antimikrobiyale dirençli olduğunu bildirmiştir. Fardsanei ve ark. (2018), İran’da

gerçekleştirdikleri çalışmalarında *S. Enteritidis* izolatlarının %97,7'sini en az bir antimikrobiyale karşı dirençli bulmuştur. Benzer şekilde, Wei ve ark. (2019) Çin'de gerçekleştirdikleri çalışmalarında *S. Enteritidis* izolatlarının tamamının (%100) en az bir antimikrobiyale dirençli olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda tespit edilen %39'luk oranın, bu çalışmalarda belirtilen oranların oldukça altında olduğu görüldü. Bu durumun, ülkemizdeki düşük *S. Enteritidis* prevalansı ile ilişkili olduğu düşünüldü. Ülkemizde 2018 yılında raporlanmış Ulusal Salmonella Kontrol Programı (USKP)'nda, *S. Enteritidis*'in broylerlerde %1,5, yumurtacılarda %0,4 prevalansta bildirilmesi bu kanıyı destekler nitelikte bulundu. Düşük *S. Enteritidis* prevalansının, *S. Enteritidis* izolatlarının direnç kazanma riskini direkt olarak azalttığı düşünüldü.

Bu tez çalışmasında, en yüksek antimikrobiyal direnç ampisiline (%25) karşı gözlemlendi. Bu bulgu, Shang ve ark. (2021)'nin 'yüksek direncin profilaksi ve büyümenin desteklenmesi amacıyla yetiştiriciler tarafından kanatlı üretiminde ampisilinin yaygın kullanımından kaynaklandığı' kanısını desteklemektedir. Çalışmamız ile benzer olarak, Mezal ve ark. (2014), *S. Enteritidis* suşlarında en yüksek direnci (%35) ampisiline karşı tespit etmiştir. Tavuk orijinli *Salmonella* izolatlarında ampisilin direncini karşılaştırmak için ülkemizdeki çalışmalar da incelendi. Kahraman ve ark. (2018) *Salmonella* izolatlarında %12,5 oranda ampisilin direnci saptamıştır. USKP kapsamında ise tüm *S. Enteritidis* suşlarında ortalama ampisilin direnci %12,3 oranda bulunmuştur. Aynı raporda broyler *S. Enteritidis* izolatlarında %10, yumurtacı *S. Enteritidis* izolatlarında %33,3 ampisilin direnci bildirilmiştir (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2018). Çalışmamızda broyler *S. Enteritidis* izolatlarında %23, yumurtacı *S. Enteritidis* izolatlarında %50 ampisilin direnci bulundu. Tüm bulgular karşılaştırıldığında, 2018-2020 sürecinde hem ortalama ampisilin direncinin hem de yetiştirme tipine göre ampisilin dirençlerinin arttığı görülmektedir. Ayrıca yumurtacı izolatlarda, broyler izolatlarla kıyasla daha yüksek ampisilin direnci saptanması açısından USKP ve çalışmamız bulguları paralel bulundu. *S. Enteritidis* izolatlarında zamana bağlı olarak artan ampisilin direnci, bu antimikrobiyalin tedavideki başarısı açısından endişe verici bulundu.

AMR testi ile sefalosporin grubu sefotaksim (%21), seftazidim (%15) ve seftriakson (%12) antimikrobiallerine karşı direnç ortalama direncin (%8,9) üzerinde bulundu. 2018 yılı USKP kapsamında sefotaksim gibi sefalosporinlere karşı dirençli *S. Enteritidis* izolatu tespit edilmedi (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2018). Benzer şekilde, Güran ve ark. (2020) tavuk orijinli *Salmonella* izolatlarında seftazidim ve seftriakson gibi sefalosporinlere karşı direnç olmadığını bildirdi. Bu bulgular doğrultusunda, çalışmamızda %12 ile %21 oranında değişen sefalosporin direnci saptanması, sefalosporin direncinde artış olduğunu gösterdi. Böylelikle Wei ve ark. (2019) tarafından bildirilmiş ‘sefalosporinlere karşı artan direnç’ kanısı desteklenmiş oldu. Sonuç olarak, sefalosporin direncindeki artışın izlenmesinin gerektiği düşünüldü.

Florokinolon grubu antimikrobiallerden siprofloksasin, WHO tarafından salmonellozis tedavisinde birinci basamak antimikrobiyal olarak önerilmektedir. Bu çalışmada, izolatların yalnızca %4’ü siprofloksasine dirençli bulundu. Utrarachkij ve ark. (2016), Fardsanei ve ark. (2018) ve Güran ve ark. (2020) tarafından sırasıyla %51,1, %90,9 ve %100 olmak üzere yüksek siprofloksasin direnci bildirilmiştir. Çalışmamızda ise düşük siprofloksasin direnci (%4) saptandı. Bu bulgu, Wang ve ark. (2019) *Salmonella* izolatlarında düşük siprofloksasin direnci saptadığı çalışmaları ile uyumlu bulundu. Bu çalışmada, geniş spektrumu sayesinde siprofloksasinin salmonellozis tedavisinde kullanışlı bir antimikrobiyal olduğunu vurgulanmıştır. Çalışmamızda düşük direnç saptanmasına rağmen, en yüksek orta dirençliliğin (%23) siprofloksasine karşı tespit edilmesi siprofloksasinin direncinin izlenmesi gerektiğini gösterdi. İnsan salmonellozis vakalarında, siprofloksasin sıklıkla ilk sırada kullanılmaktadır. Bu nedenle, dirençli bakterilerin kontamine gıdalar ile alınması insanlarda tedaviyi olumsuz etkileyecek önemli bir risk olarak kabul edilmektedir (Jiang ve ark., 2021).

Bu çalışmada, florokinolon grubu bir diğer antimikrobiyal olan nalidiksik asite karşı %6 oranında direnç saptandı. Çalışmamızın aksine, Utrarachkij ve ark. (2016) ve Fardsanei ve ark. (2018) tarafından yüksek nalidiksik asit direnci (%83,2 ve %77,3)

bildirilmiştir. Benzer şekilde, Shang ve ark. (2021), *Salmonella* izolatlarında %97 oranında nalidiksik asit direnci raporlamıştır. Nalidiksik asit, *Salmonella* ilişkili enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Dolayısıyla artan nalidiksik asit direncinin tedaviyi sekteye uğratacağı düşünülmektedir.

Tüm *S. Enteritidis* izolatlarında %21 oranında MDR *S. Enteritidis* saptandı. Bu bulgu, Yang ve ark. (2002) ve Utrarachkij ve ark. (2016) çalışmalarında raporlanan MDR *S. Enteritidis* bulguları ile uyumlu bulundu. Yang ve ark. (2002) %21 oranda MDR *S. Enteritidis*; Utrarachkij ve ark. (2016) %25,5 oranda MDR *S. Enteritidis* tespit etmiştir. Fardsanei ve ark. (2018) İran'da %68,2, Wei ve ark. (2019) Çin'de %81, Shang ve ark. (2021) Güney Kore'de %52,8 olmak üzere yüksek MDR *S. Enteritidis* oranı bildirmiştir. Yüksek MDR oranı bildirilen bu çalışmalara kıyasla, ülkemizde MDR *S. Enteritidis* oranının daha düşük olduğu görüldü. Bu durumun *S. Enteritidis*'in izlenmesine yönelik ülkesel kontrol stratejileri farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünüldü. Ülkemizde USKP'nın kapsamlı şekilde uygulanması sayesinde düşük *S. Enteritidis* prevalansı ve buna bağlı olarak da düşük MDR *S. Enteritidis* oranı tespit edildiği sonucuna varıldı.

S. Enteritidis izolatları arasında 25 farklı MDR profili gözlemlendi. Bir bakteri izolatında en fazla 9 farklı antimikrobiyale karşı direnç tespit edildi. MDR profilleri arasında AMP-CTX-CAZ-CRO-MEM-S hekza-resistant profilinin %14 oran ile baskın MDR profili olduğu saptandı. Baskın MDR profilinden sonra en yüksek orana sahip MDR profilleri, AMP-CTX-CAZ-CRO-MEM (%12) ve AMP-CTX-MEM-S ve CTX-CAZ-MEM (%10) olarak tanımlandı. Utrarachkij ve ark. (2016) ise MDR *Salmonella* izolatlarında ampisilin ve nalidiksik asite karşı direncin ortak olduğunu bildirmiştir. Bu tez çalışmasında tanımlanmış baskın MDR profillerinde, Utrarachkij ve ark. (2016) bulguları ile benzer olarak ampisilin yer almaktadır. Pek çok çalışmada nalidiksik asit direncinin yüksek bulunduğu ve MDR *Salmonella* profillerinde ortak olarak gözlemlendiği bildirilmiştir. Örneğin, Fardsanei ve ark. (2018) çalışmalarında baskın MDR profillerinde ortak olarak siprofloksasin ve nalidiksik asit tespit etmiştir.

Siprofloksasin ve nalidiksik asit, bu tez çalışmasında bulunan MDR profillerinden yalnızca birinde (C-CIP-NA) bulunmaktadır.

S. Enteritidis, dünya çapında insanlarda en yaygın gözlenen salmonellozis etkenidir. Afrika, Amerika, Asya ve Avrupa ülkelerinde insan salmonellozis salgın ve sporadik vakalarında baskın *Salmonella* serovarıdır (Fardsanei ve ark., 2018). Major bulaşma yolunun kontamine kanatlı ürünleri tüketimi ile gıda zincirine geçiş olduğu bilinmektedir (EFSA, 2017 ve Liu ve ark., 2011). Kontamine yumurta ve kanatlı eti tüketiminden kaynaklanan *S. Enteritidis* salgınları üzerine pek çok bilimsel çalışma bulunmaktadır (Mezal ve ark., 2014). Bulaşma kaynağı düşünüldüğünde, kanatlı *S. Enteritidis* suşlarının epidemiyolojisinin belirlenmesi büyük önem teşkil etmektedir (Hashemi ve ark., 2017). Salgın kaynağı ve bulaşma rotalarının saptanmasına yönelik epidemiyolojik çalışmalar kontaminasyonun önlenmesine ve kontrol programlarının geliştirilmesine yardımcı olmaktadır (Fardsanei ve ark., 2018). *S. Enteritidis* salgınlarında enfeksiyonun etkin kontrolü ve verimli bir epidemiyolojik analiz için moleküler tiplendirme yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Liu ve ark., 2016).

S. Enteritidis genotiplendirme yöntemlerinden ilki, altın standart PFGE'dir. PFGE, ayırım gücü yüksek bir genotiplendirme yöntemidir (Tang ve ark., 2019). Ancak laboratuvar iş yükü fazla ve zaman alan bir analiz olup geniş örnek grupları için elverişli değildir (Dewaele ve ark., 2012). Yüksek oranda klonal ve genetik homojenite gösteren *S. Enteritidis* salgın suşlarının tiplendirilmesinde ayırım gücü sınırlı kabul edilmektedir (Liu ve ark., 2011 ve Muvhali ve ark., 2017). Alegbeleye ve Sant'Ana (2020), çalışmalarında PFGE'nin *S. Enteritidis* salgın takibinde sınırlı ayırım sağladığı kanısını desteklemiştir. Araştırmacılar, PFGE'in sınırlı ayırım sorununu çözmeye MLVA yönteminin güçlü potansiyele sahip olduğunu belirtmiştir. Bu nedenle, *S. Enteritidis* epidemiyolojisini saptamada PFGE'e alternatif ya da ek olarak MLVA önerilmektedir. MLVA, PFGE'e kıyasla belirli avantajlara sahiptir. Başlıca avantajları iş yükü az, ucuz, kolay ve kısa sürede tamamlanabilen bir genotiplendirme yöntemi olmasıdır. Aynı zamanda tekrarlanabilir ve karşılaştırılabilir sonuçlara sahip olması

yönünden verimli bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Campioni ve ark., 2013 ve Tang ve ark., 2019). Laboratuvarlar arası çalışmalarda standardizasyonu kolaydır (Liu ve ark., 2016). Geniş örnek grupları için elverişlidir. Pek çok bilimsel çalışmada *S. Enteritidis* genotiplendirmesinde ayırım gücü bakımından PFGE'den daha güçlü olduğu sonucuna varılmıştır (Dewaele ve ark., 2012 ve Ferrari ve ark., 2017).

Amerika, Asya, Avrupa, Brezilya, Güney Afrika ülkelerinde olmak üzere Dünya çapında, *S. Enteritidis* için MLVA ile genotiplendirme yapılmış çeşitli çalışmalarda MLVA'nın epidemiyolojisini saptamada kullanışlı olduğu vurgulanmıştır (Campioni ve ark., 2013 ve Muvhali ve ark., 2017). MLVA, özellikle kanatlı ve insan orijinli *S. Enteritidis* suşlarının genetik yakınlığını saptamak için kullanılmaktadır. Örneğin Marcantonio ve ark. (2020), 2018 yılında İtalya'da gerçekleşmiş bir *S. Enteritidis* salgını epidemiyolojik açıdan incelenmiştir. Araştırmacılar, MLVA ile insan ve kanatlı orijinli suşların genetik olarak benzer olduğunu saptamıştır. Ayrıca tiramisu orijinli *S. Enteritidis* izolatı MLVA genotipinin, Polonya yumurtaları ile yakından ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Saptadıkları MLVA genotipinin, kanatlı ürünleri ve insanlarda ortak MLVA genotipi olarak çoklu-ülke salgınlarına neden olduğu raporlanmıştır. Bu araştırma, insanlardaki *S. Enteritidis* salmonellozis salgınlarının kontamine kanatlı ürünleri tüketiminden kaynaklanmasına iyi bir delil niteliğindedir.

S. Enteritidis MLVA ile genotiplendirilmesi üzerine farklı pek çok test protokolü bulunmaktadır. CDC PulseNet MLVA standart operasyon prosedürüne göre gerçekleştirilmiş çalışmalara Mezal ve ark. (2014), Bartholomew ve ark. (2014), Liu ve ark. (2016) ve Wei ve ark. (2019) çalışmaları örnek verilebilir. Mezal ve ark. (2014) kanatlı ve klinik orijinli *S. Enteritidis* suşları için PFGE ve MLVA ile genotiplendirme hedeflediği çalışmada, 60 adet suş için 6 farklı PFGE paterni ve 18 farklı MLVA genotipi belirlenmiştir. En yaygın PFGE genotipinde tiplendirilmiş 41 izolatın, 14 farklı MLVA genotipine dağıldığı belirtilmiştir. Araştırmacılar, kanatlı ve klinik orijinli *S. Enteritidis* suşları ayırımında PFGE analizi ayırım gücünün sınırlı olduğunu ve MLVA analizinin yüksek ayırım gücü ile epidemiyolojik analizde kullanışlı bir

yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Bartholomew ve ark. (2014), çalışmalarında MLVA genotipinin izolat orijini düzeyinde ayırma olarak sağladığını göstermiştir. Liu ve ark. (2016), insan salgın suşları moleküler epidemiyolojisini saptamaya yönelik çalışmalarında, MLVA yönteminin tatmin edici ve etkili bir ayırım sağladığını belirtmiştir. MLVA'nın, *S. Enteritidis* salmonellosis salgınlarında rutin tiplendirmede kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Genotiplendirme sonucunda, 29 farklı PFGE genotipi ve 33 farklı MLVA genotipi tespit edilmiştir. MLVA ile 2 farklı salgının aynı orijini paylaştığı ve epidemiyolojik olarak yakından ilişkili olduğu anlaşılmıştır.

CDC PulseNet MLVA yöntemi ile etkin bir genotiplendirme çalışması, Wei ve ark. (2019) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, klinik orijinli 79 adet *S. Enteritidis* izolatı MLVA ve PFGE ile genotiplendirilmiştir. 26 farklı MLVA genotipi ve 33 farklı PFGE genotipi tespit edilmiştir. Çalışmada, iki yöntemin kombinasyonu ile 60 farklı genotip elde edilmiştir. MLVA ve PFGE kombinasyonu ile yapılan *S. Enteritidis* genotiplendirilmesinin PFGE ya da MLVA'nın tek başına kullanımından daha güçlü bir ayırım sağladığı belirtilmiştir. Wei ve ark. (2019) benzer olarak, Kim ve ark. (2014) ve Mezal ve ark. (2010) çalışmalarında *S. Enteritidis* salgın suşlarının güçlü ayırımı için MLVA ile PFGE kombinasyonunu önermektedir.

Bu tez çalışmasında, VNTR lokus polimorfizmleri karşılaştırıldığında en polimorfik lokusun SE5, en stabil lokusun SE6 olduğu tespit edildi. Bu bulgular, Liu ve ark. (2016), Mezal ve ark. (2014), Wei ve ark. (2019) bildirdikleri polimorfizm bulguları ile uyumlu bulundu. Mezal ve ark. (2014) da en stabil lokusu SE6, en polimorfik lokusu SE5 olarak saptamıştır. Liu ve ark. (2016), benzer olarak SE3, SE6 ve SE8 lokuslarının daha az polimorfik olduğunu, polimorfizmi en yüksek olan lokusun SE5 lokusu olduğunu bildirmiştir. Wei ve ark. (2019) da en polimorfik lokusun SE5 olduğunu bildirmiştir. Tüm bulgular göz önüne alındığında 2014 yılından günümüze dek polimorfik lokusun aynı olduğu tespit edildi. Bu durum, MLVA genotiplendirme çalışmalarında yakın ilişkili suşların ayırımı için SE5 lokusunun ilk sırada kullanılabileceğini düşündürdü.

Bu tez çalışmasında *S. Enteritidis* izolatları, antimikrobiyal direnç ve genotiplendirme bulguları karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma, *Xba*I-PFGE analizi dendrogramı üzerinden gerçekleştirildi. İlk olarak A ve B taksonları, izolatların kümes yetiştirme tipi yönünden incelendi. A taksonunda yer alan suşların %92'si (106/115) broyler izolatları oluşturmaktadır. B taksonunda ise broyler izolatların %37'si (61/167), broyler damızlık izolatlarının %79'u (11/14), yumurtacı izolatlarının %67'si (12/18) ve 1 adet yumurtacı damızlık izolatı yer almaktadır. Sonuç olarak, baskın A taksonunun B taksonuna kıyasla kümes yetiştirme tipi yönünden daha az çeşitliliğe sahip olduğu görüldü.

PFGE ve MLVA genotipleri, izolatların kümes yetiştirme tipi ve coğrafik lokasyonu yönünden karşılaştırıldı. Afyon ili orijinli yumurtacı izolatların tamamının B2 alt taksonunda yer aldığı ve PT32 genotipinde olduğu saptandı. Bu izolatların MLVA genotipi incelendiğinde 2019 yılı izolatının MT6, 2020 yılı izolatlarının ise MT4 genotipinde olduğu görüldü. Bu noktada MLVA'nın yetiştirme tipi, coğrafik lokasyon ve PFGE genotipi aynı izolatların izolasyon yılına göre ayırımına olanak sağladığı anlaşıldı. Aynı zamanda, MT4 ve MT6 genotipleri arasındaki SE2 lokusundaki tek tekrarlık farklılık izolatların genetik açıdan yakın olduğunu görmeye de olanak sağladı. Böylelikle MLVA ile aynı kümes yetiştirme tipine, coğrafik lokasyona ve PFGE genotipine sahip izolatların genetik yakınlığı görülürken aynı zamanda izolasyon yılına göre ayırımı da yapıldı. Sonuç olarak bu izolatlar için MLVA ve PFGE genotipleri ile izolatların kümes yetiştirme tipi, coğrafik lokasyonu ve izolasyon yılı arasında bir korelasyon tespit edildi. Aydın ili orijinli tek yumurtacı izolatı, PT32 ve MT15 genotipinde bulundu. Dolayısıyla bu izolatın Afyon ili yumurtacı izolatları ile yakınlığı PFGE ile, coğrafik lokasyona göre ayırımı ise MLVA ile ortaya kondu. Ankara ili orijinli broyler damızlık izolatlarının tamamı, B1 alt taksonunda yer almaktadır. 2020 yılında izole edilmiş bu izolatların PT25 ve MT10 genotipinde olduğu belirlendi. Kümes yetiştirme tipi, izolasyon tarihi ve coğrafik lokasyonu ortak olan izolatların aynı genotipte olduğu anlaşıldı. A1 alt taksonunda yer alan Ankara ili orijinli tek broyler izolatın ise PT6 ve MT22 genotipinde olduğu

saptandı. Yetiştirme tipi değiştiğinde genotiplerin de değişmesi, PFGE ve MLVA ile yetiştirme tipine göre ayırım sağlandığını gösterdi.

Campioni ve ark. (2013) yapmış olduğu çalışmada, Brezilya ve Kuzey Amerika'da insan, gıda ve kanatlı orijinli 188 adet *S. Enteritidis* suşu MLVA ile genotiplendirilmiştir. Genotiplendirme sonucunda, MLVA'nın genetik açıdan yüksek homojeniteye sahip pandemik suşların bölgesel ayırımında başarı sağladığı görülmüştür. Böylelikle MLVA ile coğrafik lokasyona göre ayırımın sağlanması açısından bu tez çalışması ve Campioni ve ark. (2013) çalışması paralel bulundu. MLVA ile izolasyon yılı ve coğrafik lokasyona göre ayırım sağlandığı, Muvhali ve ark. (2017) tarafından da bildirilmiştir. Çalışmalarında 7 farklı gıda salgınından izole edilmiş 39 adet *S. Enteritidis* suşu MLVA ile tiplendirilmiştir. Genotiplendirme sonucunda, 3 farklı MLVA genotipi elde edilmiş ve bunların salgınların gerçekleştiği yıllara ve coğrafik lokasyonlara paralel olarak değişkenlik gösterdiği anlaşılmıştır. Araştırmacılar, MLVA'nın epidemiyolojisini saptamak için verimli bir araç olduğunu bildirmiştir. Kobayashi ve ark. (2014) kanatlı, domuz ve keçi orijinli 79 adet *S. Enteritidis* suşunu MLVA ile tiplendirdiği çalışmada, 14 farklı MLVA genotipi tespit edilmiştir. Genotiplendirme sonucunda, MLVA genotiplerinin 1975-2009 yılları arasındaki baskın salgın suşunun yıllara göre değişimi ile epidemiyolojisinin tespitini sağladığı belirtilmiştir. Farklı olarak, Wei ve ark. (2019), PFGE ve MLVA genotipleri ile coğrafik lokasyon arasında herhangi bir ilişki olmadığını belirtmişlerdir. Bu nedenle, izolatların sporadik vaka olduğunu düşünmüşlerdir.

AMR testi bulguları, PFGE ve MLVA genotipleri yönünden incelendi. Siprofloksasine karşı orta dirençlilik gösteren izolatların büyük çoğunluğunun (%76) baskın A taksonunda yer aldığı ve tamamının broyler orijinli olduğu belirlendi. Bu bulgu, broyler tavuk orijinli *Salmonella* izolatlarında yüksek siprofloksasin direnci bildiren çalışmalar ile uyumlu bulundu (Xiong ve ark., 2020).

MDR *S. Enteritidis* izolatlarının %26'sının baskın PT6 genotipinde olduğu ve %55'nin baskın MT22 genotipinde olduğu belirlendi. Bu durum, baskın genotiplerde antimikrobiyal direncin daha yaygın olduğunu düşündürdü. Ayrıca MDR *S. Enteritidis* izolatlarının büyük çoğunluğunun (%81) *Xba*I-PFGE dendrogramı A taksonunda yer aldığı saptandı. Bu nedenle, yaygın genotipteki izolatlarda çoklu ilaç dirençliliğinin yüksek olduğu anlaşıldı. Fardsanei ve ark. (2018) ile Wei ve ark. (2019) çalışmalarında *S. Enteritidis* izolatları AMR profilleri ile PFGE genotipleri arasında herhangi bir ilişki gözlenmediği belirtilmiştir. Ayrıca baskın MDR profili AMP-CTX-CAZ-CRO-S-MEM-S olan hekza-resistant izolatların tamamı MT22 genotipinde bulundu. Bu noktada, baskın MLVA genotipi MT22 ile baskın MDR profili arasında bir korelasyon belirlendi. Bu duruma, Utrarachkij ve ark. (2016) çalışması örnek verilebilir. Çalışmada MT 5-5-11-7-3 ile nalidiksik asit ve ampisilin direnci arasında; MT 5-5-9-73 ile trimetoprim-sülfametoksazol ve tetrasiklin direnci arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirtilmiştir.

MDR *S. Enteritidis* izolatları, kümes yetiştirme tipi, izolasyon yılı ve coğrafik lokasyonu bazında karşılaştırıldı. Çoklu-ilâç direncine sahip izolatlarının %93'ü (39/42) olmak üzere büyük çoğunluğunun broyler yetiştirme tipinde olduğu tespit edildi. Bu bulgu, broyler tavuk orijinli *S. Enteritidis* izolatlarında antimikrobiyal direncin oldukça yüksek olduğunu ortaya çıkardı.

Bu tez çalışması ile *S. Enteritidis* izolatlarının moleküler epidemiyolojisinin araştırılmasında MLVA ve PFGE yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları belirlendi. MLVA yönteminin PFGE'e kıyasla kolay uygulanabilir, iş yükü az ve kısa sürede tamamlanabilen bir yöntem olduğu belirlendi. Dolayısıyla, MLVA'nın rutin genotiplendirme uygulamaları için verimli bir yöntem olduğu düşünüldü. PFGE, kullanılan kimyasalların hazırlanması da dahil beceri gerektiren pek çok manuel işlem içermesi açısından uygulanması zor bir yöntem olduğu düşünüldü. PFGE ile herhangi bir konfirmasyon şansı olmaksızın genotiplendirme tamamlanırken, MLVA'da elektroforez ya da fragment analizi ile genotiplendirme tamamlanmadan

konfirmasyonunun mümkün olduğu belirlendi. Böylelikle MLVA ile geniş örnek grupları için kısa sürede genotiplendirme yapabilmenin mümkün olduğu saptandı. Ancak PFGE'nin geniş örnek grupları için süre, maliyet ve uygulamanın zorluğu açısından elverişli bir yöntem olmadığı anlaşıldı. Uygulamalardaki farklılıkların yanı sıra MLVA ve PFGE, genotiplendirme bulguları yönünden de karşılaştırıldı. Ayırım gücü açısından iki yöntem arasında belirgin bir farklılık görülmedi. Hem MLVA hem de PFGE ile belirli izolat gruplarında izolatların orijinlerine göre ayırım gerçekleştirildi. Ancak MLVA'nın kümes yetiştirme tipi, coğrafik lokasyonu ve PFGE genotipi aynı izolatların arasında izolasyon yılına göre ayırımını sağladığı tespit edildi.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

S. Enteritidis, Dünya çapında insan salmonellozis vakalarında en yaygın gözlenen *Salmonella* serovarıdır. Major bulaşma yolunun kontamine kanatlı ürünleri tüketimi ile gıda zinciri olduğu bilinmektedir. S. Enteritidis salgınlarında enfeksiyonun etkin kontrolü için salgın kaynağının ve bulaşma rotalarının saptanmasına yönelik epidemiyolojik analiz oldukça önemlidir. Bu amaçla, genotiplendirme yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tez çalışması ile Türkiye’de ilk kez tavuk orijinli S. Enteritidis suşları MLVA ile genotiplendirildi. Tüm S. Enteritidis suşları için AMR profilleri ve PFGE genotipleri belirlendi.

Antimikrobiyal direnç testi ile tüm izolatların %57’si kullanılan tüm antimikrobiyallere karşı duyarlı bulundu. En yüksek antimikrobiyal direnç (%25) ampisiline karşı bulunurken, tüm suşların trimetoprim-sülfametoksazole karşı duyarlı olduğu saptandı. Ülkemizde gerçekleştirilmiş çalışmalar incelendiğinde, ampisilin direncinin zaman içerisinde arttığı belirlendi. Tüm S. Enteritidis izolatlarında %21 oranında MDR S. Enteritidis saptandı. MDR S. Enteritidis izolatlarının %93’nün broyler orijinli izolatlar olduğu belirlendi. Yüksek MDR oranı bildirilen Dünya çapındaki pek çok çalışmaya kıyasla, ülkemizdeki MDR S. Enteritidis oranının daha düşük olduğu görüldü. Bu durumun, S. Enteritidis’in izlenmesine yönelik ülkesel kontrol stratejileri başarısından kaynaklandığı düşünüldü.

PFGE ve MLVA yöntemleri ile genotiplendirme sonucunda 32 farklı PFGE genotipi ve 34 farklı MLVA genotipi saptadı. Ayırım gücü açısından iki yöntem arasında belirgin bir farklılık saptanmadı. Belirli örnek gruplarında, MLVA ve PFGE genotipleri ile izolatların kümes yetiştirme tipi, coğrafik lokasyonu ve izolasyon yılı arasında bir korelasyon tespit edildi. MLVA ile aynı kümes yetiştirme tipine, coğrafik lokasyona ve PFGE genotipine sahip izolatların genetik yakınlığı görülürken aynı zamanda izolasyon yılına göre ayırım yapıldı. Ayrıca baskın MDR profiline sahip

izolatların tamamının, baskın MLVA genotipinde olduğu belirlendi. MLVA genotiplendirme bulguları ile PFGE genotiplendirme bulguları karşılaştırılarak genotiplendirme yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları ortaya konuldu. MLVA yönteminin PFGE'e kıyasla kolay, iş yükü az ve kısa sürede tamamlanabilen bir yöntem olduğu saptandı. MLVA'nın geniş örnek grupları ve rutin genotiplendirme uygulamaları için daha elverişli bir yöntem olduğu sonucuna varıldı.



ÖZET

Türkiye’deki Tavuk Orijinli *Salmonella* Enteritidis Suşlarının MLVA ve PFGE ile Genotiplendirilmesi ve Antimikrobiyal Direncin Saptanması

Salmonellozis enfeksiyonu, tifoidal olmayan *Salmonella* serovarlarının neden olduğu zoonoz bir enfeksiyondur. Dünya çapında yaygın, gıda kaynaklı zoonoz enfeksiyonların başında gelmektedir. Kontamine gıda ve içme suyu ile gıda zincirine bulaşmanın olması, halk sağlığında ciddi riskler oluşturmaktadır. İnsanlarda yıllık ortalama 94 milyon gastroenterit vakası ile 155,000 ölüm meydana gelmektedir. EFSA 2019 yılı zoonotik etkenler raporuna göre, insanlarda en yaygın gözlenen *Salmonella* serovarı, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis’dir (%50,3). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) için major bulaşma yolunun kontamine yumurta ve kanatlı eti tüketimi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, tavuk orijinli *S. Enteritidis* suşlarının çeşitlilik ve epidemiyolojilerinin belirlenmesi salmonellozis enfeksiyonunun izlenmesi ve kontrol altına alınması için oldukça önemlidir. Günümüzde salmonellozis epidemiyolojisinin belirlenmesi amacıyla sıklıkla genotiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA)’dır. MLVA, *Salmonella* etkenlerinin moleküler epidemiyolojisinin saptanmasında kullanılan altın standart Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) ile kıyaslanabilir düzeyde yüksek ayırım gücüne sahip bir genotiplendirme yöntemidir. Bu çalışmada, Türkiye’deki farklı illerde yer alan tavuk kümeslerinden izole edilmiş 200 adet *S. Enteritidis* suşunun MLVA ile PFGE genotiplendirildi ve AMR (antimicrobial resistance) profilleri belirlendi. AMR testi sonucunda %21 oranda MDR (multi-drug resistant) *S. Enteritidis* tespit edildi. Ülkemizde ilk kez bu çalışma ile tavuk orijinli *S. Enteritidis* suşları için MLVA ile genotiplendirme gerçekleştirildi. PFGE ile 32 PFGE genotipi (PT), MLVA ile 34 MLVA genotipi (MT) saptandı. Baskın genotiplerin PT6 ve MT22 olduğu belirlendi. İki yöntemin de belirli örnek gruplarında izolatların kümes yetiştirme tipi, izolasyon yılı ve coğrafik lokasyona göre ayırımına olanak sağladığı anlaşıldı. PFGE’e kıyasla MLVA yönteminin kolay ve kısa sürede tamamlanabilen bir genotiplendirme yöntemi olduğu belirlendi. Ayrıca MLVA’nın geniş örnek gruplarında kullanılabilir bir yöntem olduğu tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: AMR, Epidemiyoloji, MLVA, PFGE, *Salmonella* Enteritidis.

SUMMARY

Antimicrobial Resistance and Genotyping by MLVA and PFGE of Chicken Originated *Salmonella* Enteritidis in Turkey

Salmonellosis is a zoonotic infection caused by nontyphoidal *Salmonella* serovars. It is one of the leading food-borne zoonosis infections worldwide. Transmission to the food chain poses serious risks to public health with contaminated food and drinking water. In humans, an average of 94 million gastroenteritis cases occur annually, with 155.000 deaths. According to the EFSA 2019 zoonotic agents report, the most common *Salmonella* serovar in humans is *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (50.3%). The consumption of contaminated eggs and poultry meat is known to be the major transmission route for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*). Therefore, determination of diversity and epidemiology of chicken originated strains is important in monitoring and controlling salmonellosis infection. Nowadays, genotyping methods are frequently used to determine epidemiology of salmonellosis outbreaks. Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA), is one of these methods. MLVA is genotyping method that is used to reveal the molecular epidemiology of *Salmonella* agents and has a high discriminatory power comparable to the gold standard Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). In this study, a total of 200 *S. Enteritidis* strains genotyped by MLVA and PFGE and determined AMR (antimicrobial resistance) profiles which were isolated from chicken coops in different cities in Turkey. As result of the AMR test, MDR *S. Enteritidis* was detected with rate of 21%. For the first time in our country, genotyping was performed by MLVA for chicken originated *S. Enteritidis* strains. 32 PFGE genotypes (PT) were detected with PFGE, and 34 MLVA genotypes (MT) were detected with MLVA. Dominant genotypes were determined to be PT6 and MT22. It was understood that both methods allowed the separation of isolates according to poultry breeding type, isolation year and geographical location in some sample groups. Compared to PFGE, the MLVA method was determined to be an easy and short-term genotyping method. In addition, MLVA was detected to be a useful method in large sample groups.

Keywords: AMR, Epidemiology, MLVA, PFGE, *Salmonella* Enteritidis.

KAYNAKLAR

- ALEGBELEYE OO, S. SANT'ANA A (2020). Pathogen subtyping tools for risk assessment and management of produce-borne outbreaks. *Curr. Opin. Food Sci.*, **32**: 83-89.
- ALMEIDA F, PITONDO-SILVA A, OLIVEIRA MA, FALCAO JP (2013). Molecular epidemiology and virulence markers of Salmonella Infantis isolated over 25 years in Sao Paulo State, Brazil. *Infect. Genet. Evol.*, **19**: 145-151.
- BARTHOLOMEW ML, HEFFERNAN RT, WRIGHT JG, KLOS RF, MONSON T, KHAN S, TREES E, SABOL A, WILLEMS RA, FLYNN R, DEASY MP, JONES B, DAVIS JP (2014). Multistate outbreak of Salmonella enterica serotype enteritidis infection associated with pet guinea pigs. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **14**: 414-421.
- CAMPIONI F, DAVIS M, MEDEIROS MIC, FALCAO JP, SHAH DH (2013). MLVA typing reveals higher genetic homogeneity among S. Enteritidis strains isolated from food, humans and chickens in Brazil in comparison to the North American Strains. *Int. J. Food Microbiol.*, **162**: 174-181.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2013). PulseNet Standard Operating Procedure for PulseNet MLVA of Salmonella enterica Serotype Enteritidis – Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500 Platform. Eriřim Adresi: [<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/mlva.html>]. Eriřim tarihi: 01.01.2021
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2017). Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157:H7, Escherichia coli non-O157 (STEC), Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri. Eriřim Adresi: [<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>]. Eriřim tarihi: 01.01.2021
- CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *M100*. 28. Ed.
- DEWAELE I, RASSCHAERT G, BERTRAND S, WILDEMAUWE C, WATTIAU P, IMBERECHTS H, HERMAN L, DUCATELLE R, DE REU K, HEYNDRICKX M (2012). Molecular characterization of Salmonella Enteritidis: comparison of an optimized multi-locus variable-number of tandem repeat analysis (MLVA) and pulsed-field gel electrophoresis. *Foodborne Pathog. Dis.*, **9**: 885-895.
- DI MARCANTONIO L, JANOWICZ A, ZILLI K, ROMANTINI R, BILEI S, PAGANICO D, PERSIANI T, DI DONATO G, DI GIANNATALE E (2020). Genomic Comparison of Salmonella Enteritidis Strains Isolated from Laying Hens and Humans in the Abruzzi Region during 2018. *Pathogens*, **9**:1-12.

- DOMINGUEZ JE, VINAS MR, HERRERA M, MORONI M, GUTKIND GO, MERCADO EC, DI CONZA JA, CHACANA PA (2021). Molecular characterization and antimicrobial resistance profiles of Salmonella Heidelberg isolates from poultry. *Zoonoses Public Health*, **68**: 309-315.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.*, **15**:208-217.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.*, **19**: 67.
- ENG SK, PUSPARAJAH P, AB MUTALIB NS, SER HL, CHAN KG, LEE LH (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front. Life Sci.*, **8**: 284-293.
- FARDSANEI F, DALLAL MMS, DOURAGHI M, MEMARIANI H, BAKHSI B, ZAHRAEI SALEHI T, NIKKHAHI F (2018). Antimicrobial resistance, virulence genes and genetic relatedness of Salmonella enterica serotype Enteritidis isolates recovered from human gastroenteritis in Tehran, Iran. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, **12**: 220-226.
- FERRARI RG, PANZENHAGEN PHN, CONTE-JUNIOR CA (2017). Phenotypic and Genotypic Eligible Methods for Salmonella Typhimurium Source Tracking. *Front. Microbiol.*, **8**: 2587.
- GÜRAN HS, CİFTÇİ R, GURSOY NC, ÖZEKİNCİ T, ALALI WQ (2020). Prevalence of antibiotic-resistant Salmonella in retail organic chicken. *Br. Food J.*, **122** (4): 1238-1251.
- HASHEMI A, BAGHBANI-ARANI F, AHMADIYAN S, GHAVAMI-NEJAD S (2017). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis in Salmonella isolates as an effective molecular subtyping method. *Microb. Pathog.*, **113**: 11-16.
- THE BRITISH STANDARDS INSTITUTION (2017). Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella Part 1: Detection of Salmonella spp. (ISO 6579-1:2017), *BSI Standards Limited*: 1-50.
- JIANG Z, ANWAR TM, PENG X, BISWAS S, ELBEDIWI M, LI Y, FANG W, YUE M (2021). Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella recovered from pig-borne food products in Henan, China. *Food Control*, **121**.
- BAŞARAN KAHRAMAN B, ISSA G, KAHRAMAN T (2018). Prevalence, Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of Salmonella spp. and Listeria monocytogenes Isolated from Chicken Carcass. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **24**: 775-779.

- KOBAYASHI A, TAKAHASHI S, ONO M, TANAKA K, KISHIMA M, AKIBA M, UCHIDA I (2014). Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates from food-producing animals in Japan by multilocus variable-number tandem repeat analysis: evidence of clonal dissemination and replacement. *Acta Vet. Scand.*, **56**: 31.
- LINDSTEDT BA, VARDUND T, AAS L, 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.
- LIU F, KARIYAWASAM S, JAYARAO BM, BARRANGOU R, GERNER-SMIDT P, RIBOT EM, KNABEL SJ, DUDLEY EG (2011). Subtyping *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolates from different sources by using sequence typing based on virulence genes and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs). *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**: 4520-4526.
- LIU Y, SHI X, LI Y, CHEN Q, JIANG M, LI W, QIU Y, LIN Y, JIANG Y, KAN B, SUN Q, HU Q (2016). The evaluation and application of multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) for the molecular epidemiological study of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis infection. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, **15**: 1-9.
- MARKEY B, LEONARD F, ARCHAMBAULT M, CULLINANE A, MAGUIRE D (2013). CLINICAL VETERINARY MICROBIOLOGY. 2nd Ed. Dublin, Ireland, Mosby Elsevier p.: 239-272.
- MARTIN B, BOVER-CID S, AYMERICH T (2018). MLVA subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates from meat products and meat processing plants. *Food Res. Int.*, **106**: 225-232.
- MEZAL EH, SABOL A, KHAN MA, ALI N, STEFANOVA R, KHAN AA (2014). Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. *Food Microbiol.*, **38**: 67-74.
- MONTE DFM, SELLERA FP (2020). *Salmonella*. *Emerg. Infect. Dis.*, **26**: 2955-2955.
- MUVHALI M, SMITH AM, RAKGANTSO AM, KEDDY KH (2017). Investigation of *Salmonella* Enteritidis outbreaks in South Africa using multi-locus variable-number tandem-repeats analysis, 2013-2015. *BMC Infect. Dis.*, **17**: 1-9.
- PATRICK ADG, WEILL FX (2007). Antigenic Formulae of The *Salmonella* Serovars. I. Pasteur WHO, **9**: 1-166.
- SHANG K, WEI B, CHA SY, ZHANG JF, PARK JY, LEE YJ, JANG HK, KANG M (2021). The Occurrence of Antimicrobial-Resistant *Salmonella enterica* in Hatcheries and Dissemination in an Integrated Broiler Chicken Operation in Korea. *Animals*, **11**:1-14.

- TACCONELLI E, CARRARA E, SAVOLDI A, HARBARTH S, MENDELSON M, MONNET DL, PULCINI C, KAHLMETER G, KLUYTMANS J, CARMELI Y, OUELLETTE M, OUTTERSON K, PATEL J, CAVALERI M, COX EM, HOUCHENS CR, GRAYSON ML, HANSEN P, SINGH N, THEURETZBACHER U, MAGRINI N, WPPLWG (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.*, **18**: 318-327.
- TANG S, ORSI RH, LUO H, GE C, ZHANG G, BAKER RC, STEVENSON A, WIEDMANN M (2019). Assessment and Comparison of Molecular Subtyping and Characterization Methods for Salmonella. *Front. Microbiol.*, **10**: 1-20.
- TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI, GKGM (2018). Ulusal Salmonella Kontrol Programı.
- TENOVER FC, ARBEIT RD, GOERING RV, MICKELSEN PA, MURRAY BE, PERSING DH, SWAMINATHAN B (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 2233-2239.
- TORPDAHL M, SKOV MN, SANDVANG D, BAGGESEN DL (2005). Genotypic characterization of Salmonella by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *J. Microbiol. Methods*, **63**: 173-184.
- UTRARACHKIJ F, NAKAJIMA C, SIRIPANICHGON K, CHANGKAEW K, THONGPANICH Y, PORNRAUNGWONG S, SUTHIENKUL O, SUZUKI Y (2016). Genetic diversity and antimicrobial resistance pattern of Salmonella enterica serovar Enteritidis clinical isolates in Thailand. *J. Infect. Chemother.*, **22**: 209-215.
- WANG X, BISWAS S, PAUDYAL N, PAN H, LI X, FANG W, YUE M (2019). Antibiotic Resistance in Salmonella Typhimurium Isolates Recovered From the Food Chain Through National Antimicrobial Resistance Monitoring System Between 1996 and 2016 (vol 10, 985, 2019). *Front. Microbiol.*, **10**:1-11.
- WEI X, YOU Y, WANG D, HUANG H, LI S, WANG D (2019). Antimicrobial resistance and molecular genotyping of Salmonella enterica serovar Enteritidis clinical isolates from Guizhou province of Southwestern China. *Plos One*, 1-14.
- WHO (2018, June 2017). Protocol for serotyping and antimicrobial susceptibility testing of Salmonella test strains. G00-06-001.
- XIONG Z, WANG S, HUANG Y, GAO Y, SHEN H, CHEN Z, BAI J, ZHAN Z, WEN J, LIAO M, ZHANG J (2020). Ciprofloxacin-Resistant Salmonella enterica Serovar Kentucky ST198 in Broiler Chicken Supply Chain and Patients, China, 2010-2016. *Microorganisms*, **8**:1-9.
- YANG SJ, PARK KY, KIM SH, NO KM, BESSER TE, YOO HS, KIM SH, LEE BK, PARK YH (2002). Antimicrobial resistance in Salmonella enterica serovars Enteritidis and

Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. *Vet. Microbiol.*, **86**: 295-301.

