

Kanatlı kökenli *Salmonella* Infantis suşlarının multilokus dizi tiplendirmesi ile filogenetik analizi*

Seyyide SARIÇAM, Hamit Kaan MÜŞTAK

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

Özet: Bu çalışmada broyler tavuk kümeslerinin altlık, toz, çevresel, kemirici kapanları, yem ve su örneklerinden izole edilen 20 adet *Salmonella* Infantis suşunun multilokus dizi tiplendirme (MLST) ile tiplendirilmesi amaçlandı. Sekans tipleri (ST) ve serotipler arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermek amacıyla yapılan filogenetik analizde, 6 farklı serotip çalışmaya dahil edildi. Her bir suşa ait 7 *housekeeping* gen üzerinden gerçekleştirilen MLST analizi sonucunda tüm *S. Infantis* suşları ST32 bulundu ve Türkiye’de *S. Infantis* için baskın sekans tipi olabileceği sonucuna varıldı. *S. Enteritidis* ST11, *S. Typhimurium* ST19, *S. Hadar* ST33, *S. Agona* ST13, *S. Mbandaka* ST413 ve *S. Coeln* ST2015 bulundu. *S. Agona*, *S. Mbandaka* ve *S. Coeln* serotipleri Türkiye’de ilk kez bu çalışmada, MLST ile tiplendirildi. İlk kez bu çalışma ile ST2015 için serotip bilgisi *S. Coeln* olarak MLST veritabanına girildi.

Anahtar Sözcükler: Filogenetik ağaç, *Housekeeping* gen, MLST, *Salmonella* Infantis, sekans tipi.

Phylogenetic Analysis of *Salmonella* Infantis Strains from Poultry by Multilocus Sequence Typing

Abstract: In this study, it was aimed to evaluate the 20 *Salmonella* Infantis strains isolated from broiler chicken hutches (base, dust, environment, rodent traps, feed and water samples) by Multilocus Sequence Typing (MLST). Six different serovars were used to exhibit the evolutionary relationship between different sequence types (ST) and serotypes on phylogenetic tree. All *S. Infantis* strains were found as ST32 as a result of MLST analysis performed on 7 *housekeeping* genes belonging to each subspecies and ST32 was thought to be the dominant sequence type for *S. Infantis* in Turkey. The other serotypes; *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Agona*, *S. Mbandaka* and *S. Coeln* was found to be ST11, ST19, ST33, ST13, ST413 and ST2015, respectively. In this study, *S. Agona*, *S. Mbandaka* and *S. Coeln* serotypes were typed with the MLST for the first time in Turkey. Serotype information of ST2015 was registered to the MLST database for *S. Coeln* serotype.

Key Words: Phylogenetic tree, *housekeeping* gene, MLST, *Salmonella* Infantis, sequence type.

Giriş

Salmonella cinsi üyeleri, Gram negatif çomak şeklinde bakteriler olup dünya çapında en sık görülen ikinci zoonotik enfeksiyon olan salmonellozise neden olmaktadır (3). İnsan ve hayvanlardaki salmonellozis vakalarının yaklaşık %99’undan sorumlu *S. enterica* subsp. *enterica* içinde yer alan 2600 serotipten biri olan *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis (*Salmonella* Infantis), kanatlı hayvanlardan en çok izole edilen serotipler arasında ilk sıralarda yer almaktadır (12, 26, 28). Bu nedenle, *S. Infantis* suşlarına ilişkin epidemiyolojik araştırmalar, etkenin koruma ve kontrolü açısından oldukça önemlidir. Bu noktada, identifikasyon için yapılan biyokimyasal ve serolojik testler neredeyse seksen yıldır kullanılmakla beraber yalnızca fenotipik bilgi sağlarken; suşlar arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koymakta yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, ortaya çıkan salgıların araştırılması ve epidemiyolojik ilişkilerinin

incelenmesi çalışmalarında DNA tabanlı tiplendirme metodları kullanılmaktadır (22).

İlk kez 1998 yılında geliştirilen ve altın standart kabul edilen Multilokus Dizi Tiplendirme (Multilocus Sequence Typing, MLST), bu metodlardan birisi olup *Salmonella* filogenetik ve epidemiyolojik çalışmalarında kullanılan genotiplendirme analizlerinin başında gelmektedir (2, 27). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* alt türü için MLST analizinde 7 *housekeeping* gen fragmentinin incelendiği görülmüştür (35). Bunlar; *aroC* (korizmat sentaz), *dnaN* (*DNA polimeraz III beta alt birimi*), *hemD* (üroporfirinojen III kosentaz), *hisD* (histidinol dehidrogenaz), *purE* (fosforibozilaminoimidazol karboksilaz), *sucA* (alfa ketoglutarat dehidrogenaz) ve *thrA* (aspartokinaz-hemoserin dehidrogenaz) gen bölgeleridir (35).

MLST analizi, ulaşılabilir veritabanları sayesinde sonuçlarının elektronik ortama aktarılabilmesi, kolayca

* Bu makale ilk yazarın “kanatlı kökenli *Salmonella* Infantis suşlarının MLST ile filogenetik analizi” başlıklı yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır.

saklanabilmesi ve tiplendirilen herhangi bir suşa ait mevcut sonuçların karşılaştırılabilmesi, filocoğrafik ve konak spesifitesi hakkında ipuçları vermesi bakımından oldukça avantajlıdır (20, 35). MLST'nin rutin kullanımına geçiş, tüm genoma dayalı dizi tabanlı tiplendirme metodlarından daha uygun olarak; *Salmonella* bulaşma rotalarının net bir görüntüsünü sağlamak ve kontrol çalışmalarını kolaylaştırmaktadır (33). Ayrıca MLST ile elde edilen diziler üzerinden oluşturulan filogeniler sayesinde suşların serotip ve sekans tipi düzeyinde evrimsel açıdan farklılığı görülebilmektedir (4, 9, 22).

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

Materyal ve Metot

Kullanılan suşlar: Bu çalışmada, 2014-2017 yılları arasında, Türkiye'deki *Salmonella* serotiplerinin varlığını ve dağılımını saptamak üzere gerçekleştirilmiş proje kapsamında, tavuk yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı 20 farklı ildeki (Adana, Afyonkarahisar, Ankara, Balıkesir, Bilecik, Bolu, Çanakkale, Çorum, Düzce, Elazığ, Eskişehir, İzmir, Kocaeli, Malatya, Manisa, Mersin, Sakarya, Samsun, Uşak ve Zonguldak) 313 farklı broyler tavuk kümesinden alınan altlık, toz, çevresel, kemirici kapları, yem ve su örneklerinden elde edilen *Salmonella* izolatları kullanıldı. ISO 6579 prosedürü ile *Salmonella* izolasyonu sonunda *Salmonella* sp. olarak belirlenerek Kauffmann-White-Le Minor şemasına göre serotiplendirilen (16, 21) suşlardan 20 adet *Salmonella* Infantis suşu kullanıldı. Bu suşlar, rRNA kodlayan genlerin (5S, 16S ve 23S) restriksiyon enzimiyle (PvuII) spesifik olarak kesilmesiyle oluşan bant profilinin (ribopattern) değerlendirilmesine dayanan ribotiplendirme metodu ile identifiye edilmiş suşlar arasından seçildi. Ribotiplendirme sonucu, *S. Infantis* suşlarının oluşturduğu 2 farklı ribopattern'den (Dupont PvuII_1071 ve PvuII_2133) eşit sayıda olmak üzere 10'ar suş kullanıldı. Ayrıca farklı serotipler ve sekans tipleri arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermek amacıyla yapılan filogenetik analizde, dış grupları göstermek amacıyla sık izole edilen serotiplerden *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* ve nadiren izole edilen serotipler olan *S. Agona*, *S. Mbandaka*, *S. Coeln* olmak üzere 6 farklı serotip çalışmaya dahil edildi. *S. Agona*, *S. Mbandaka* ve *S. Coeln* serotipinin seçilmesinde etkili faktör ise bu serotiplerin Türkiye'de yapılan önceki MLST çalışmalarında hiç ele alınmamış olması oldu.

DNA ekstraksiyonu: Nutrient agar'da saf olarak üretilen koloniler üzerinden GeneJET Genomik DNA Pürifikasyon kiti (Thermo Fisher Scientific, USA) Gram Negatif Bakteri DNA'sı Ekstraksiyon protokolüne göre DNA ekstraksiyonu yapıldı.

MLST: *Housekeeping* gen fragmentleri *aroC* (826 bp), *dnaN* (833 bp), *hemD* (666 bp), *hisD* (894 bp), *purE* (510 bp), *sucA* (643 bp) ve *thrA* (852 bp) Pubmlst veritabanında yer alan primer dizileri ile yine aynı veritabanında bulunan *Salmonella enterica* MLST analiz protokolüne göre çoğaltıldı (35). PCR ürünleri, Exosap-IT (Thermo Fisher Scientific, USA) ile saflaştırıldı. Saflaştırılan ürünler, veritabanında belirtilen DNA dizileme primerleri ve *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak dizilendi. Sephadex (Oxoid, UK) jel filtrasyonu yöntemi ile PCR ürünleri saflaştırıldı. ABI 3500 Genetik Analyzer (Applied Biosystems, USA) ile genler dizilendi. CLC Main Workbench v.7.7.3. (Qiagen, USA) dizi analiz programı ile diziler düzenlendi. Bu diziler ile Pubmlst veritabanından her bir genin allel profili saptandı ve elde edilen allellerin kombinasyonu ile her bir suşun sekans tipi belirlendi.

Filogenetik Analiz: Her bir suş için *aroC* 501 bp, *dnaN* 501 bp, *hemD* 432 bp, *hisD* 501 bp, *purE* 399 bp, *sucA* 501 bp ve *thrA* 501 bp'lik standart allelik korunmuş bölge dizileri birleştirilerek 3336 bp'lik tek bir DNA dizisi elde edildi. 26 suşa ait tek bir DNA dizisi üzerinden MEGA v.7.0.20 programı ile otomatik olarak en uygun ağaçlandırma metodu ve yer değiştirme modeli atanarak filogenetik ağaç oluşturuldu.

Bulgular

Tüm *S. Infantis* suşları ST32, *S. Enteritidis* ST11, *S. Typhimurium* ST19, *S. Hadar* ST33, *S. Agona* ST13, *S. Mbandaka* ST413 ve *S. Coeln* ST2015 bulundu. Pubmlst veritabanında kayıtlı sekans tipi ST2015 için serotip bilgisi bulunamadı ve *S. Coeln* olarak ilk kez serotip kaydı bu çalışmada yapıldı (Tablo 1).

26 farklı DNA dizisi (3336 bp) Neighbor joining metodu ile ağaçlandırıldı. Elde edilen filogenetik ağaçta yüksek benzerlik oranıyla (%90) en yakın sekans tipler ST32 ve ST19 olarak bulundu (Şekil 1).

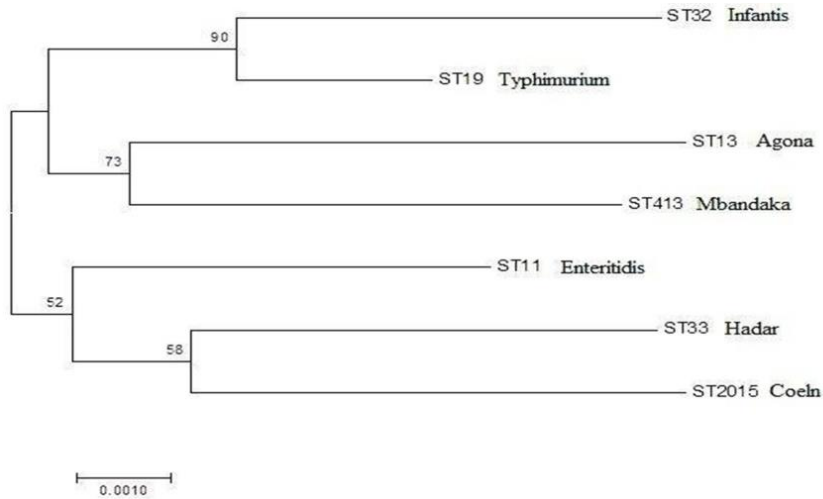
Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, insan ve hayvanlarda sistemik hastalıklara neden olan önemli salmonellosis etkenlerinden biri olan *S. Infantis* suşları MLST ile moleküler olarak karakterize edilerek filogenetik analiz ile sekans tipleri ve serotipler arası evrimsel ilişkinin gösterilebilmesi için 6 farklı serotip çalışmaya dahil edilmiştir. Her bir suş için *housekeeping* gen dizilerinin birleştirilmesiyle elde edilen tek bir DNA dizisi üzerinden oluşturulan filogenetik ağaçta sekans tipleri arası evrimsel ilişki gösterilmiştir (18, 22).

Türkiye'de *Salmonella enterica*'ya ait farklı serotiplerin MLST ile tiplendirilmesini konu alan az sayıda çalışma yapılmıştır. Durul ve ark.'nın (11) yapmış olduğu çalışmada tavuk eti ve sakatattan izole edilen *S. Infantis* suşlarının tamamı (15 adet) ST32; sakatattan izole edilen 1 adet *S. Typhimurium* suşu, ST19; peynirden izole edilen 1 adet *S. Hadar* suşu, ST33 olarak bulunmuştur.

Tablo 1. Her bir suşa ait gen allelleri ve sekans tipleri.**Table 1.** The gene alleles and sequence types of each strain.

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



Şekil 1. Neighbor joining ile oluşturulan kladogramik filogenetik ağaçta taksonların evrimsel ilişkisi (31). Analiz MEGA v.7.0.20 programı ile gerçekleştirildi (24). Her suş için 7 *housekeeping* gen dizisinin birleştirilmesiyle elde edilen 3336 bp'lik DNA dizisi veri olarak kullanıldı. Taksonlar arası evrimsel uzaklıklar hesaplanırken Tamura-3 parametrelili yer değiştirme modelinden (T92) yararlanıldı (32). Elde edilen evrimsel uzaklıklar dal uzunlukları şeklinde gösterilmiş olup taksonlar arası benzerlik oranı her bir dalın üzerinde gösterildi. %0.1'lik bootstrap değeri sol alt köşede belirtildi (14).

Figure 1. The evolutionary history of taxons was inferred on cladogramic phylogenetic tree using the Neighbor-Joining method (31). Analyses were conducted in MEGA7 (24). The data was obtained from the 3336 bp sequence which had been obtained by combining 7 *housekeeping* gene sequences for each strain. The evolutionary distances were computed using the Tamura 3-parameter method (32). The evolutionary distances were showed on phylogenetic tree with branch. The 0.1% bootstrap test value was represented on the lower left corner (14).

Günel ve ark.'nın (17) yapmış olduğu çalışmada bitkisel kaynaklı 1 adet *S. Enteritidis* suşu, ST11 olarak tanımlanmıştır. Acar ve ark.'nın (1) *Salmonella* MLST analizi çalışmasında ise tavuk etinden izole edilen *S. Infantis* suşlarının tamamı (15 adet) ST32; insan ve hayvan kaynaklı (sığır ve koyun) *S. Typhimurium* suşlarının tamamı (19 adet), ST19; peynir ile koyun dışkılarından izole edilen *S. Hadar* suşlarının tamamı (2 adet), ST33; insan kaynaklı 1 adet *S. Enteritidis* suşu, ST11 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, kullanılan kanatlı kökenli 20 adet *S. Infantis* suşunun da ST32 olduğu göz önünde bulundurulduğunda; *S. Infantis* için ülkemizde tek tip sekans tipinin mevcut olduğu ve bu sekans tipinin izolasyon kaynağına göre değişmediği sonucuna varıldı. *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* ve *S. Hadar* suşları için de benzer sekans tipleri bulunmuş olup, örnek sayısı artırıldığında izolasyon kaynağı ve sekans tipi ilişkisinin yorumlanabileceği sonucuna varıldı.

Günümüze dek yapılmış MLST analizlerinde *S. Infantis* serotipi için çok sayıda sekans tipi bulunmuştur (35). Bu sekans tipleri arasında yer alan ST32, çeşitli ülkelerde çoğunlukla gıda, insan, kanatlı kaynaklarından izole edilen suşlarda tespit edilmiştir (3, 7, 34). En sık bulunan ve hemen hemen tüm kıtalarda mevcut olan bu sekans tipinin bu çalışmada da bulunmuş olması, *S. Infantis* kaynaklı enfeksiyonlardan sorumlu olan baskın sekans tipi olabileceği görüşünü desteklemektedir.

S. Typhimurium, *S. Infantis*'e göre çok daha geniş sekans tipi çeşitliliğine sahiptir. (7, 25, 30, 35). Bu sekans tiplerinden ST19; Avrupa, Asya, Afrika kıtasında pek çok ülkede; insan, gıda, koyun ve sığır gibi çeşitli kaynaklardan izole edilerek tespit edilmiş ve yaygın sekans tipi olduğu öngörülmüştür (7, 13, 33). Bu çalışmayla da ST19 tespit edildi. *S. Enteritidis* ST11 ve *S. Hadar* ST33 Amerika, Avrupa ve Asya kıtasında pek çok ülkeye başarılı olarak adapte olmuş yaygın sekans tipleri olup bu çalışmayla ülkemizde de tespit edilmiştir (5, 6, 15, 29, 35).

Nadiren bulunan serotiplerden olan *S. Mbandaka*, *S. Agona* ve *S. Coeln* serotipleri ülkemizde ilk kez bu çalışmada MLST ile tanımlandı. *S. Mbandaka* ST413, Avrupa ülkeleri başta olmak üzere en yaygın bulunan sekans tipi olup bu çalışmada da bu küresel sekans tipinin ülkemizdeki varlığı tespit edildi (19). *S. Agona* için Afrika, Avrupa, Asya ülkelerinin çoğunda gıda, kanatlı ve insan kaynaklı olarak bulunan yaygın sekans tipi ST13, bu çalışmada da elde edildi (8, 10, 25). İncelenen son serotip *S. Coeln* serotipi ise ST2015 olarak tanımlandı. Pubmlst veritabanında ST2015 allelik formülasyonu mevcut olup, serotip bilgisi bulunmadığından bu sekans tipe ait serotip bilgisi ilk kez veritabanına girildi.

MLST ile incelenen 7 *housekeeping* gen dizisinin birleştirilmesiyle elde edilen 3336 bp'lik dizinin temel alındığı filogenetik ağaçlandırma çalışmaları incelendiğinde

uzaklık tabanlı metodların sıklıkla kullanıldığı (UPGMA, NJ, vb.) görüldü (22). Durul ve ark., (11) ile Torpdahl ve ark.'nın (34) yapmış olduğu çalışmalarda ikili dizi karşılaştırmasında farklı nükleotid sayısının, karşılaştırılan total nükleotid sayısına oranı ile elde edilen benzerlik oranını (%90) en fazla *S. Infantis* (ST32) ve *S. Typhimurium* (ST19) serotipleri arasında olduğundan bu serotipler tek bir klanda birbirine en yakın taksonlar olarak gösterilmiştir. Yukarıda bahsedilen çalışmalara benzer olarak, bu çalışmada elde edilen filogenetik ağaçta yüksek benzerlik oranıyla (%90) en yakın sekans tipleri ST32 ve ST19 olarak bulundu.

Çalışma sonunda *S. Infantis* için tek bir sekans tipinin belirlenmesi suşlar arasındaki klonal ilişkiyi göstermek açısından MLST yönteminin yeterli olmadığını düşündürdü. Yeni sekans tiplerinin tespit edilebilmesi, klonal ilişkileri gösterebilmesi ve daha detaylı filogenetik verilerin elde edilmesi için yapılacak yeni çalışmalarda ayırım gücü yüksek genotiplendirme metodlarının kullanılması gerektiği sonucuna varıldı. Bu amaçla, aynı serotip içerisinde ayırım gücü daha yüksek modifiye MLST analizlerinin ileride yapılacak çalışmalarda kullanılabileceği öngörüldü. "16S rRNA, *pduF*, *glnA*, ve *manB*" olmak üzere 4 polimorfik gene dayalı MLST şeması, virülens genler *spaM*, *hilA* ve fimbrial genler *pefB*, *fimH* genlerine dayalı MLST şeması ve PFGE'den daha yüksek ayırım gücüne sahip 16S rRNA, *pduF*, *glnA* ve *manB* genlerine dayalı MLST şemasının bu amaca uygun olduğu literatür taraması ile tespit edildi (23, 36). Ayrıca *Salmonella* tanımlanmasında MLST ile PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) ve AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) gibi tanımlama metodlarının karşılaştırıldığı ve PFGE ile AFLP metodlarının daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğunu belirten çalışmalar (34) dikkate alındığında bu metodların filogenetik ilişkilerin gösterildiği moleküler tanımlama çalışmalarında daha etkili olarak kullanılabileceği düşünüldü.

Teşekkür

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2016/16L0239015).

Kaynaklar

1. **Acar S, Bulut E, Durul B ve ark.** (2017): *Phenotyping and genetic characterization of Salmonella enterica isolates from Turkey revealing arise of different features specific to geography*. Int J Food Micro, **241**, 98-107.
2. **Achtman M, Wain J, Weil FX ve ark.** (2012): *Multilocus Sequence Typing as a replacement for serotyping in Salmonella enterica*. Plos Pathog, **8**, 15-16.
3. **Almeida F, Pitondo-Silva A, Aparecida OM ve ark.** (2013): *Molecular epidemiology and virulence markers of Salmonella Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil*. Infect Genet Evol, **19**, 145-151.

4. **Andrei A, Zervos MJ** (2006): *The application of molecular techniques to the study of hospital infection*. Arch Pathol Lab Med, **130**, 662-668.
5. **Antunes P, Mourão J, Machado J ve ark.** (2011): *First description of qnrS1 IncN plasmid in a ST11 Salmonella Enteritidis clinical isolate from Portugal*. Diagn Micr Infec Dis, **69**, 463-465.
6. **Bado I, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF ve ark.** (2012): *First Human Isolate of Salmonella enterica Serotype Enteritidis Harboring blaCTX-M-14 in South America*. Antimicrob Agents Ch, **56**, 2132-2134.
7. **Cai Y, Tao J, Jiao Y ve ark.** (2016): *Phenotypic characteristics and genotypic correlation between Salmonella isolates from a slaughterhouse and retail markets in Yangzhou, China*. Int J Food Microbiol, **222**, 5664.
8. **Carattoli A, Filetici E, Villa L ve ark.** (2002): *Antibiotic Resistance Genes and Salmonella Genomic Island 1 in Salmonella enterica Serovar Typhimurium Isolated in Italy*. Antimicrob Agents Ch, **46**, 2821-2828.
9. **David M, Aanensen DM, Spratt BG** (2005): *The Multilocus Sequence Typing Network: mlst.net*. Nucl Acids Res, **33**, 772-733.
10. **Dione M** (2010): *Epidemiology of Non-Typhoidal Salmonella (Nts) in Humans and Animals in the Gambia and Senegal*. Tropicicultura, **28**, 253-256.
11. **Durul B, Acar S, Bulut E ve ark.** (2015): *Subtyping of Salmonella food isolates suggests the geographic clustering of serotype Telaviv*. Foodborne Pathog Dis, **12**, 1-4.
12. **EFSA** (2012): *Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on special measures to reduce the risk for consumers through Salmonella in table eggs-e.g. cooling of table eggs*. EFSA J, **957**, 1-19.
13. **Feasey NA, Dougan G, Kingsley RA ve ark.** (2012): *Invasive non-typhoidal Salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa*. Lancet, **379**, 2489-2499.
14. **Felsenstein J** (1985): *Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap*. Evolution, **39**, 783-791.
15. **Ghaderi R, Tadayon K, Khaki P ve ark.** (2015): *Iranian clonal population of Salmonella enterica serovar Enteritidis, characterized by multi-locus sequence typing (MLST) Method*. I J M, **7**, 251-259.
16. **Grimont PAD, Weill FX.** (2007). *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*. Institut Pasteur, **9**, 15-166.
17. **Günel E, Kılıç G, Bulut E ve ark.** (2015): *Salmonella surveillance on fresh produce in retail in Turkey*. Int J Food Micro, **199**, 72-77.
18. **Ho YN, Chou MY, Tsai HC ve ark.** (2017): *Empirical testing of modified Salmonella MLST in aquatic environmental samples by in silico analysis*. Sci Total Environ, **581-582**, 378-380.
19. **Hoszowski A, Zajac M, Lalak A ve ark.** (2016): *Fifteen years of successful spread of Salmonella enterica serovar Mbandaka clone ST413 in Poland and its public health consequences*. Ann Agr Env Med, **23**, 237-241.
20. **Imperial College** (2007): *Multi Locus Sequence Typing*. <http://www.mlst.net/>. (5 Nisan 2017)
21. **ISO 6579** (2002): *General guidance on methods for the detection of Salmonella*. International organisation for standardization. Microbiology, **4**, 1-19.
22. **Kidgell C, Reichard U, Wain J ve ark.** (2002): *Salmonella typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old*. Infect Genet Evol, **2**, 39-40.
23. **Kotetishvili M, Stine O, Kreger A, Morris Jg, Sulakvelidze A** (2002): *Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental salmonella strains*. J Clin Microbiol, **40**, 1626-1635.
24. **Kumar S, Stecher G, Tamura K** (2016): *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets*. Mol Biol Evol, **33**, 1870-1874.
25. **Li YC, Pan ZM, Kang XL ve ark.** (2014): *Prevalence, Characteristics, and Antimicrobial Resistance Patterns of Salmonella in Retail Pork in Jiangsu Province, Eastern China*. J Food Protect, **77**, 236-245.
26. **Lublin A, Maler I, Mechani S ve ark.** (2015): *Survival of Salmonella enterica serovar Infantis on and within stored table eggs*. J Food Protect, **78**, 287-292.
27. **Maiden MCJ, Bygraves A, Feil E ve ark.** (1998): *Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms*. Proc Natl Acad Sci, **95**, 3140-3145.
28. **Miller T, Prager R, Rabsch W ve ark.** (2010): *Epidemiological relationship between Salmonella Infantis isolates of human and broiler origin*. Lohmann Information, **45**, 27.
29. **Noda T, Murakami K, Asai T ve ark.** (2011): *Multi-locus sequence typing of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strains in Japan between 1973 and 2004*. Acta Vet Scand, **53**, 1.
30. **Ranjbar R, Elhaghi P, Shokoozadeh L** (2016): *Multilocus Sequence Typing of the Clinical Isolates of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium in Tehran Hospitals*. IJMS, 1-6.
31. **Saitou N, Nei M** (1987): *The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees*. Mol Biol Evol, **4**, 406-425.
32. **Tamura K** (1992): *Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases*. Mol Biol Evol, **9**, 678-687.
33. **Taylor JW, Fisher MC** (2003): *Fungal Multilocus Sequence Typing-it's not just For bacteria*. Curr Op In Microbiol, **6**, 351-356.
34. **Torpdahl MIA, Skov MN, Sandvang D ve ark.** (2005): *Genotypic characterization of Salmonella by Multilocus Sequence Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Amplified Fragment Length Polymorphism*. J Microbiol Meth, **63**, 173-184.
35. **University Of Oxford** (2010): *Multi Locus Sequence Typing*. <http://pubmlst.org/>. (5 Nisan 2017)
36. **Wattiau P, Boland C, Bertrand S** (2011): *Methodologies for Salmonella enterica subsp. enterica subtyping: gold standards and alternatives*. Appl Environ Microbiol, **78**: 7881-7882.

Geliş tarihi: 08.08.2017 / Kabul tarihi: 27.02.2018

Yazışma adresi:

Uzm. Mol. Bio. Seyyide SARIÇAM
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı/Ankara
e-mail: s.saricam-92@hotmail.com