

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GIDALARDAN İZOLE EDİLEN *ENTEROBACTER* SP. VE *CRONOBACTER*
SAKAZAKII SUŞLARININ BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
TANIMLANMASI**

Esin ÇETİNKAYA

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2011**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇEŞİTLİ GIDALARDAN İZOLE EDİLEN *ENTEROBACTER* SP. VE *CRONOBACTER SAKAZAKII* SUŞLARININ BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI

Esin ÇETİNKAYA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kamuran AYHAN

Bu çalışmada evde hazırlanan bebek gıdalarında kullanılan hammaddelerden izole edilen *Enterobacter* sp. ve *Cr. sakazakii* suşlarının çeşitli yöntemler ile tanımlanıp, bu yöntemlerin birbirleri ile kıyaslanmaları amaçlanmıştır. Bebek gıdalarının temel içeriğini oluşturan tahıl unları, bitki çayları, sebzeler ve hayvansal gıdalardan izole edilen 54 adet suş; 15 klasik biyokimyasal test, 3 hızlı test kiti (API 20 E, API ZYM ve ID 32 E) ve 5 moleküler yöntem (Darbeli Alan Jel Elektroforezi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Çoklu Lokus Dizilim Analizi, 16S rRNA Dizilim Analizi, Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyonu-Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi) ile tanımlanmıştır.

İzole edilen 54 suşa uygulanan 15 klasik biyokimyasal test ile bu suşların %88,9'u tanımlanabilmiştir. Bunlardan %35,1'i *E. agglomerans*, %24'ü *E. cloacae*, %3,7'si *E. intermedus*, %3,7'si *E. amnigenus*, %1,85'i *E. gergoviae*, %5,5'i *Esc. coli*, %5,5'i *Cl. amalon*, %5,5'i *Cl. freundii*, %1,85'i *Sr. grimes*, %1,85'i *Sr. fonticola*, %1,85'i *Kl. pnemoniae* olarak tanımlanırken %11,1'i tanımlanamamıştır.

Ek olarak, API 20 E ve ID 32 E test kitleri ile tanımlanan 44 izolattan 25'inin (%56,8) birincil tanımlama sonuçları aynıdır. Bunlardan %22,7'si *Pantoea spp.*, %20,5'i *Cr. sakazakii*, %4,5'i *Kl. pnemoniae*, %4,5'i *Esc. coli*, %2,3'ü *E. aerogenes*, %2,3'ü *Esc. vulneris*'tir. İzolatlardan %43,2'si iki farklı test kitine de farklı sonuçlar vermiştir.

XbaI enziminin kullanıldığı PFGE ile suşların %93,2'sinin filogenetik analizi yapılabilmektedir. Buna göre, filogenetik ağaçta 28 farklı genetik yapı görülmüştür.

Cr. sakazakii olduğu düşünülen suşlara uygulanan PZR ve MALDI-TOF MS ile bu izolatların *Cr. sakazakii* olduğu doğrulanırken; MLST ve 16S rRNA dizilim analizi ile 7 muhtemel *Cr. sakazakii* suşundan 2'si *Cr. malonaticus*, 1'i ise *Cr. universalis* olarak tanımlanmıştır.

Haziran 2011, 88 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Enterobacter* suşları, *Cronobacter sakazakii*, biyokimyasal tanımlama, API20E, ID32E, 16S rDNA

ABSTRACT

Master Thesis

THE BIOCHEMICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF *ENTEROBACTER* SP. AND *CRONOBACTER SAKAZAKII* STRAINS ISOLATED FROM VARIOUS FOODS

Esin CETINKAYA

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Kamuran AYHAN

The aims of this study are the isolation of *Enterobacter* sp. and *Cr. sakazakii* from rawmaterials which are being used for homemade baby food, the identification of the strains with various methods and the comparison of these methods. 54 strains isolated from common baby food ingredients which were grain flours, herbal teas, vegetables and animal products, were identified via 15 biochemical tests, 3 rapid test kits (API 20 E, API ZYM, ID 32E) and 5 molecular methods (Pulsed Field Gel Electrophoresis, Polimerase Chain Reaction, Multi Locus Sequence Typing, 16S rRNA Sequence Typing, Matris Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry).

Depending on 15 classical biochemical tests which were done for 54 isolates, 88.9% of these strains could be identified. 35.1% of them were *E. agglomerans*, 24% of them were *E. cloacae*, 3.7% of them were *E. intermedus*, %3.7 of them were *E. amnigenus*, 1.85% of them were *E. gergoviae*, 5.5% of them were *Esc. coli*, 5.5% of them were *Cl. amalon*, 5.5% of them were *Cl. freundii*, 1.85% of them were *Sr. grimes*, 1.85% of them were *Sr. fonticola*, 1.85% of them were *Kl. pnemoniae*. On the other hand 11.1% of these isolates could not be identified.

Additionally, 56.8% of the primary identifications via both API20E and ID32E were in correspondance. 22.7% of the 44 strains were *Pantoea* spp., 20.5% of them were *Cr. sakazakii*, 4.5% of them were *Kl. pnemoniae*, 4.5% of them were *Esc. coli*, 2.3% of them were *E. aerogenes*, 2.3% of them were *Esc. vulneris*. 43.2% of the results gave different results for the two test kits.

XbaI enzyme was used for PFGE and phylogenetic analyses could done for 93.2% of the strains. There were 28 different genetical structure seen on the phylogenetic tree.

Isolates which were deemed to be *Cr. sakazakii* were all confirmed as *Cr. sakazakii* by PCR and MALDI-TOF MS. On the other hand, 2 of 7 possible *Cr. sakazakii* strains were identified as *Cr. malonaticus* while 1 of 7 strains was determined as *Cr. universalis* via MLST and 16S rRNA sequence typing.

June 2011, 88 pages

Key Words: *Enterobacter* strains, *Cronobacter sakazakii*, biochemical identification, API20E, ID32E, 16S rDNA

TEŞEKKÜR

Her konuda değerli görüşlerini ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve böylesine önemli bir çalışmada yer almamı sağlayarak İngiltere kapılarını bana açan çok Sevgili Hocam Sayın Prof. Dr. Kamuran AYHAN'a (Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü),

Tez çalışmalarımın bir kısmını yürütme şansı yakalamamda ERASMUS Öğrenim Hareketliliği kapsamında destek aldığım Ankara Üniversitesi Erasmus Koordinatörlüğü'ne ve Yurtiçi Yüksek Lisans Eğitimi bursu aldığım Tübitak BİDEB'e,

İkili anlaşma çerçevesinde beni kabul ederek moleküler mikrobiyoloji alanında kendimi yetiştirmemi ve tezimin moleküler tanımlama aşamasını İngiltere Nottingham Trent University-School of Science and Technology-Bioscience Laboratory'de yapma fırsatını sunan Prof. Dr. Stephen FORSYTHE'a,

Sık sık bilgi ve tecrübelerine başvurduğum Prof. Dr. Kadir Halkman'a,

Tezimin her aşamasında yardımlarını samimiyetle sunan Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünden Arş. Grv. Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ, Arş. Grv. Gökçe POLAT YEMİŞ, Nottingham Trent University-School of Science and Technology-Bioscience Laboratory doktora öğrencileri Aldukali Alkeskas ve Susan Joseph'e,

Bugünlere gelirken sahip oldukları herşeyi benim geleceğime adayan, tüm kararlarım saygı ile yaklaşp hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen başta annem ve ablam olmak üzere aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Esin ÇETİNKAYA

Ankara, Haziran 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMEL ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
3. MATERYAL ve METOT.....	8
3.1 Materyal.....	8
3.2 Metot.....	9
3.2.1 Gıda örneklerinden <i>Enterobacter</i> sp. izolasyonu.....	9
3.2.2 Gıda örneklerinden <i>Cr. sakazakii</i> izolasyonu.....	9
3.2.3 Biyokimyasal testler.....	10
3.2.3.1 Karbonhidrat fermentasyonu.....	10
3.2.3.2 Triptofandan indol oluşumu.....	10
3.2.3.3 Voges Proskauer testi.....	11
3.2.3.4 Metil Red testi.....	11
3.2.3.5 Sitrat kullanımı.....	11
3.2.3.6 Hidrojen sülfür oluşumu.....	12
3.2.3.7 Aminoasit dekarboksilasyonu.....	12
3.2.4 Hızlı test kitleri kullanarak tanımlama.....	12
3.2.5 Moleküler yöntemler.....	13
3.2.5.1 Darbeli Alan Jel Elektroforezi (PFGE).....	13
3.2.5.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	15
3.2.5.3 Çoklu Lokus Dizilim Tiplendirmesi (MLST).....	16
3.2.5.4 16S rRNA Dizilim Analizi.....	18
3.2.5.5 Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyonu - Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS).....	18
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	20

4.1 Gıda örneklerinden <i>Enterobacter</i> türlerinin ve <i>Cr. sakazakii</i> 'nin izolasyonu	20
4.2 Biyokimyasal testlerin sonuçları.....	21
4.2.1 Klasik biyokimyasal testlerle tanımlama sonuçları.....	21
4.2.2 Hızlı test kitleri ile yapılan tanımlama sonuçları.....	21
4.3 Moleküler tekniklerle yapılan tanımlamaların sonuçları.....	34
4.3.1 Darbeli alan jel elektroforezi incelemesinin sonuçları.....	34
4.3.2 Polimeraz zincir reaksiyonu incelemesinin sonuçları.....	37
4.3.3 Çoklu lokus dizilim tiplendirmesinin sonuçları.....	39
4.3.4 16S rRNA dizilim analizinin sonuçları.....	42
4.3.5 Matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu - uçuş süresi kütle spektrometresi analizinin sonuçları.....	48
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR.....	52
EKLER.....	64
Ek 1 Araştırmada kullanılan besiyerleri.....	65
Ek 2 Araştırmada kullanılan kimyasallar.....	68
Ek 3 Mlst analizi kapsamında pzt ürünlerinin atanan profil numaralarına karşılık gelen nükleik asit dizilimleri.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	88

KISALTMALAR DİZİNİ

μL	mikrolitre
bç	baz çifti
<i>C.</i>	<i>Citrobacter</i>
<i>Cl.</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Cr.</i>	<i>Cronobacter</i>
<i>E.</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Esc.</i>	<i>Escherichia</i>
FAO	Gıda ve Tarım Organizasyonu
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
g	gram
<i>H.</i>	<i>Hafnia</i>
ISO	Uluslararası Standartlar Organizasyonu
<i>K.</i>	<i>Klebsiella</i>
kob	Koloni oluşturan birim
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
MALDI-TOF	Matris Destekli Lazer İyonizasyonu – Uçuş Süresi
MLST	Çoklu Lokus Dizilim Analizi
MR	Metil Red
nm	nanometre
<i>Pa.</i>	<i>Pantoea</i>
PFGE	Darbeli Alan Jel Elektroforezi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>Rh.</i>	<i>Rahnella</i>
Rpm	dakikadaki devir
<i>Sr.</i>	<i>Serratia</i>
UN	Birleşmiş Milletler
UV	Ultra Viyole
VP	Voges Proskauer
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyonu kütle spektrometresinin şekilsel anlatımı.....	19
Şekil 4.1 PFGE analizinin biyonumerik yazılımla şematize edilmiş hali.....	36
Şekil 4.2 OmpA, Esakf&r, RecN-ES ve Esak2&3 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda UV ışık altında çekilmiş fotoğraflar.....	39
Şekil 4.3 MLST sonucuna göre elde edilen filogenetik ağaç.....	41
Şekil 4.4 Muhtemel <i>Cr. sakazakii</i> olarak tanımlanan örneklerin 16S rRNA dizilimlerinin incelenmesi sonucu elde edilen filogenetik ağaç.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan gıda örnekleri.....	8
Çizelge 3.2 Kullanılan primerlere özgü PZR koşulları.....	16
Çizelge 3.3 MLST için yollanacak örneklerle uygulanan PZR için kullanılan primerlerin hedeflediği genler, dizilimleri ve allel boyutları.....	17
Çizelge 4.1 Örnekler ve izolat kodları.....	20
Çizelge 4.2 Tahıl ürünlerinden elde edilen muhtemel <i>Enterobacter</i> sp. izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları.....	22
Çizelge 4.3 Tahıl ürünlerinden elde edilen muhtemel <i>Cr. sakazakii</i> izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları.....	22
Çizelge 4.4 Bitki çaylarından elde edilen muhtemel <i>Enterobacter</i> sp. izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları.....	23
Çizelge 4.5 Bitki çaylarından elde edilen <i>Cr. sakazakii</i> izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları.....	23
Çizelge 4.6 Hayvansal kaynaklı ürünlerden elde edilen muhtemel <i>Enterobacter</i> sp. izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları.....	24
Çizelge 4.7 Hayvansal kaynaklı ürünlerden elde edilen muhtemel <i>Cr. sakazakii</i> izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları.....	24
Çizelge 4.8 Çiğ sebzelerden elde edilen muhtemel <i>Enterobacter</i> sp. izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları.....	25
Çizelge 4.9 Tahıl ürünlerinden elde edilen muhtemel <i>Enterobacter</i> sp. izolatlarının profil numaraları ve muhtemel tanı sonuçları.....	26
Çizelge 4.10 Tahıl ürünlerinden elde edilen muhtemel <i>Cr.sakazakii</i> izolatlarının profil numaraları ve muhtemel tanı sonuçları.....	27
Çizelge 4.11 Bitki çayı örneklerinden elde edilen muhtemel <i>Enterobacter</i> sp. izolatlarının profil numaraları ve muhtemel tanı sonuçları.....	28
Çizelge 4.12 Bitki çaylarından elde edilen muhtemel <i>Cr. sakazakii</i> izolatlarının profil numaraları ve muhtemel tanı sonuçları.....	29
Çizelge 4.13 Hayvansal ürünlerden elde edilen muhtemel <i>Enterobacter</i> sp. izolatlarının profil numaraları ve muhtemel tanı sonuçları.....	30

Çizelge 4.14 Hayvansal ürünlerden elde edilen muhtemel <i>Cr. Sakazakii</i> izolatlarının profil numaraları ve muhtemel tanı sonuçları.....	31
Çizelge 4.15 Çiğ sebzelerden elde edilen muhtemel <i>Enterobacter</i> sp. izolatlarının profil numaraları ve muhtemel tanı sonuçları.....	31
Çizelge 4.16 PZR reaksiyonları ile elde edilen ürünlere çoklu lokus dizilim tiplendirmesi sonucunda verilmiş profil numaraları.....	40

1. GİRİŞ

Enterobacteriaceae ailesi üyelerinin doğru tanımlanması gıda hijyeni ve gıda kaynaklı salgınlar için esastır. Bu amaçla genellikle morfolojik ve biyokimyasal testler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler bazen suşlar arasındaki çeşitlilik veya uygun olmayan biyokimyasal profil elde edilmesi sebebi ile tanımlamada başarısız olmaktadır (Olsson vd. 2004). Son yıllarda *Enterobacteriaceae* sayısı, gıda üretimindeki proses doğrulaması için hijyen kriteri olarak önem kazanmıştır. *Enterobacteriaceae* sayısının Avrupa’da çeşitli gıda ürünleri için proses hijyen kriterlerinde parametre olarak kullanılması bugünkü mevzuatta da dile getirilmiştir (Anonymous 2005). Gerek rutin gıda kontrolünde gerek *Enterobacter*’ler üzerine yapılan araştırmalarda selektif besiyerinden izole edilen bakterinin hızla, kolaylıkla, düşük maliyetlerle ve en önemlisi doğrulukla tanımlanması gerekmektedir.

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterleri Tebliği’ne ve Avrupa Birliği Mikrobiyolojik Kriterleri’ne göre süt tozlarındaki *Enterobacteriaceae* miktarının <10 kob/g ($n=5$, $c=0$, $m<10$) olması gerekmektedir. (www.kkgm.gov.tr 2009, Anonymous 2005). FAO ve UN iyi kalitedeki bebek formüllerinde koliform sayısının 3 kob/g’den az olmasını önermektedir (Anonymous 1977). Tüm formüller bu öneriye uymaktadır (Muytjens vd. 1988). Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterleri Tebliği’ne göre özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar dahil olmak üzere bebek formülleri ve devam formüllerinden alınacak 25g veya 25 mL numunenin içinde *Cr. sakazakii* bulunmamalıdır ($n=10$, $c=0$, $m= 0/25$ M= $0/25$ g-mL) (www.kkgm.gov.tr 2009).

2004 yılında Birleşmiş Milletler FAO ve WHO tarafından bebek mamalarındaki mikroorganizmalar üzerine yapılan toplantıda enfekte edici özelliği olan bakteriler şöyle sınıflandırılmıştır. Kesin etmen olan *Salmonella* ve *Cr. sakazakii* Kategori A’da, haklarında henüz yeterli delilin olmadığı ancak muhtemel etmen olan *Enterobacter vulneris*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* Kategori B’de, haklarında henüz yeterli delilin olmadığı ve düşük düzeyde etmen olan *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Bacillus cereus* ise Kategori C’de yer almışlardır. Bununla birlikte sadece *Salmonella* ve *Cr. sakazakii*’nin kontamine olmuş bebek

mamaları vasıtasıyla yenidoğan enfeksiyonuna yol açtığı belirtilmiştir (Anonymous 2004).

Enterobacter üyelerinin %50 kadarı genellikle bağışıklığı yetersiz hastalarda hastane kaynaklı enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Leclerc vd. 2001). *E. agglomaerans*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter* spp., *Esc. coli* ve *H. alvei* de dahil bebek formülünden izole edilen birçok tür, bakteriyel menenjit etmenidir (Muyltjens vd. 1988).

Townsend vd. (2008a) çeşitli ülkelerde farklı fenotipik tanımlama yöntemleriyle *E. hormaechei*'nin *Cronobacter sakazakii* olarak yanlış tanımlandığını ve bunun yaygın bir problem olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu hatalı tanımlama nedeniyle fenotipik özellikleri belirleyen veritabanlarının geliştirilmesinin ve altın standart olarak ifade edilen DNA dizilim analizleri gibi yöntemlerin uygulanmasının daha güvenilir olacağını ileri sürmüşlerdir.

Son yıllarda uygulanmakta olan, bebek formüllerinde *Cr. sakazakii* kontaminasyonunu saptama yöntemi hem çok aşamalı olup, hem de 7 güne kadar uzamaktadır (Anonymous 2002). Ön zenginleştirme işlemi yapıldığında PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile bu süre ancak 12 saate inebilmektedir (Nair ve Venkitanarayanan 2006).

Bu tez çalışmasında, çeşitli gıdalardan izole edilen *Enterobacter* sp. ve *Cronobacter sakazakii* suşlarının klasik biyokimyasal testlerin yanı sıra API 20E ve ID 32 E gibi hızlı test kitleri ile hem de Darbeli Alan Jel Elektroforezi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Çoklu Lokus Dizilim Tiplendirmesi, 16S rRNA Dizilim Analizi, Matris Destekli Lazer Desorpsiyonu/İyonizasyonu Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi gibi moleküler yöntemlerle tanımlaması yapılmış ve kullanılan yöntemlerin sonuçları kıyaslanarak irdelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMEL ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

Gıda mikrobiyolojisinde, üzerinde en çok durulan mikroorganizma gruplarının başında *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri gelmektedir (Tunail 2009). Bu familyanın üyeleri 30 cins ve 115 tür altında toplanmışlardır ki bu cinslerden belli başlıları; *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* ve *Yersinia*'dır (Brenner vd. 1986).

Enterobacteriaceae familyası üyeleri çevrede çok yaygındır ve birçok mezofilik türü düşük sayılarda gıdaya bulaşabilir (Molin vd. 1984). Schardinger'in 1892 yılında içme sularında *Salmonella* Typhi yerine fekal bulaşma göstergesi olarak *Escherichia coli* aranmasını önermesiyle *Esc. coli* indikatör olarak kullanılmaya başlanmıştır. Birçok durumda *Esc. coli* yerine veya yanında koliform grup bakteriler de aranmaktadır (Tunail 2009). Koliform grup üyesi olan *Enterobacter* türleri *Esc. coli*'den IMVIC testleri ile ayrılırlar (Ayhan 2010).

Çevrede özellikle de toprak ve suda *Enterobacteriaceae* varlığının alışlagelmiş düzeyinden dolayı bazı gıdalarda otoriteler tarafından belirlenmiş limiti geçmemek kaydıyla bulunmasına izin verilmektedir. *Enterobacteriaceae* doğrudan sayımı örnekteki enterik benzeri organizmanın varlığının belirlenmesi için kullanılır. Bu organizmalar toprakta yaygın oldukları gibi genellikle hayvan ve insanların intestinal sistemlerinde bulunurlar ve bunların varlığı daha çok ciddi intestinal patojenlerin varlığına işaretçi olarak kullanılmaktadır (Forsythe 2005).

Hazır toz bebek maması üretiminde sterilizasyon uygulanmadığı için bebek mamalarının önerilen mikrobiyolojik spesifikasyonları taşımaları son derece önemlidir. Bebek mamaları üzerine yapılan bir araştırmada farklı formülasyonlardaki mamaların %52'sinde *Enterobacteriaceae* üyesi bakteriler tespit edilmiştir (Forsythe 2005). *Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*, ve *Klebsiella* gibi bazı *Enterobacteriaceae* türleri toz bebek formüllerinde bulunmuş ve ciddi yenidoğan enfeksiyonları ile ilişkilendirilmiştir (Bowen vd. 2006, Coignard vd.

2006, Townsend vd. 2006, Forsythe 2005, Jarvis 2005, Iversen ve Forsythe 2004a, Tullus vd. 1992, Muytjens vd. 1988).

Her ne kadar *Cr. sakazakii* bir *Enterobacteriaceae* üyesi olsa da, *Enterobacteriaceae* ve koliform grubu bakterilerin doğrudan sayımı ile bebek formüllerinde *Cr. sakazakii* varlığı her zaman saptanamamaktadır (Iversen vd. 2004a). Bu muhtemelen düşük hücre sayısından ve kurutma sırasında hasar gören hücrelerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle özgül yöntemler geliştirilmekte ve uluslararası otoriteler bebek formülleri için mikrobiyolojik kriterleri güncelleştirmektedirler (Forsythe vd. 2005).

Iversen vd. (2007) çeşitli *E. sakazakii* suşları arasındaki taksonomik ilişki f-AFLP (Floresan Güçlendirilmiş Fragman Uzunluğu Polimorfizmi), otomatize ribotyping, 16S rRNA dizilim analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu kullanılarak açığa kavuşturmuş ve böylece *E. sakazakii* yeni bir cins olan *Cronobacter* içinde yer almıştır. Buna göre *Cronobacter* cinsi 5 türden oluşmaktadır; *Cr. sakazakii*, *Cr. malonicus*, *Cr. turicensis*, *Cr. muytjensii* ve *Cr. dublinensis*. Fırsatçı insan patojenlerini de içeren bu cinsin ilk üç üyesi yenidoğan enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Cins içindeki çeşitliliğin genetik temeli ise henüz tam olarak bilinmemektedir (Kucerova vd. 2010).

Bazı *Enterobacteriaceae* üyeleri –*C. freundii* gibi bazı üyeleri de dahil- et, süt, balık gibi gıdalarda soğukta muhafaza edildiği esnasa gelişebilir. Bununla birlikte bu suşlardan bazıları enteropatojenik *Esc. coli*'ye benzer şekilde toksin genlerini barındırır. Bu sebeple dondurulmuş gıdalarda özellikle uzatılmış depolama uygulandığında ve gıdanın ön ısıtmaya tabi tutulmadan tüketildiği durumlarda *Enterobacteriaceae* varlığı potansiyel bir sağlık riski gösterebilmektedir (Lindberga vd. 1998).

Enterobacteriaceae familyası içindeki *Salmonella* spp., *Shigella* spp. ve bazı *Escherichia coli* gibi mezofilik türleri ve psikrotrofik *Yersinia enterocolitica* diyareye sebep olabilmektedir. Bununla birlikte gıdayı bozan ve et, balık, süt gibi gıdalarda soğukta muhafaza sıcaklığında gelişebilen psikrotrofik *Enterobacteriaceae* üyeleri de vardır ve bunlar klinik öneme sahiptir. Bu üyelerden bazıları fırsatçı patojen iken, *Enterobacteriaceae* cinsinin genel patojenik grupları dışındaki üyelerinde de diğer

tehlike faktörlerinin yanında shiga-benzeri toksinler (verotoksinler) ve diğer enteropatojenik toksinler bulunmuştur (Albert vd. 1992, Lund vd. 1992, Frankel vd. 1994, Ridell vd. 1994, Tschäpe vd. 1995).

Gram negatif *Enterobacteriaceae* üyeleri idrar yolu enfeksiyonuna, kan dolaşımı enfeksiyonuna neden oldukları gibi, hastane kaynaklı zatürre ve çeşitli karın içi enfeksiyonlarla ilişkili oldukları da bilinmektedir. Bu familyanın üyeleri içinde *Escherichia coli* daha çok idrar yolu enfeksiyonu, *Klebsiella* ve *Enterobacter* cinsleri içinde yer alan türler ise zatürre nedenlerindendir. Buna ilaveten *Salmonella* gibi organizmalar gastroenterite ve bazı hastalarda istilacı enfeksiyonlara neden olur (Paterson vd. 2006).

Antibiyotiklerin yaygın kullanımından önce *Enterobacter* türleri ile patojen olarak nadiren karşılaşılır iken nozokomiyal (hastane kaynaklı) enfeksiyonlara sebep olan bu organizmalara artık giderek sıklıkla rastlanmaktadır (Eichhoff vd. 1966). 1975 yılında Birleşmiş Milletler'de enfeksiyona sebep olan tüm patojen kaynaklı enfeksiyonların %4,6'sı, birincil bakteremi vakalarının %5,7'si *Enterobacter* türlerinden kaynaklanmıştır (Anonymous 1977). 1984 yılında *Enterobacter* türleri Birleşmiş Milletler'deki hastanelerde meydana gelen tüm nozokomiyal enfeksiyonların %5,9'unun, tüm nozokomiyal bakteremilerin ise %6,3'ünün kaynağı olarak gösterilmiştir (Anonymous 1984).

Enterobacter türleri hayvan ve insan bağırsak florasında yer almadığından gıdaya temel bulaşı kaynaklarının toprak, su ve sebzeler olduğu düşünülmektedir (Iversen ve Forsythe 2003). Tür üyeleri özellikle bitki ve hububat ürünlerinde bulunmaktadır (Ayhan 2010).

Ön zenginleştirme aşamalarından sonra bebek mamaları örneklerinden *Enterobacteriaceae* izolasyonu üzerine yapılan bir çalışmadan elde edilen izolatların *E. agglomerans*, *E. cloacae*, *Cr. sakazakii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca* olduğu saptanmış, hatta *Salmonella* varlığı da rapor edilmiştir (Muytjens vd. 1988, Iversen vd. 2004a)

Cronobacter sakazakii türleri; hububat, ekmek, sorgum ve pirinç (Gassem 1999, Gassem 2002), UHT süt (Skaldal vd. 1993), çeşitli otlar, baharat (Iversen ve Forsythe, 2004a), et, peynir, sebze (Leclercq vd. 2002), yumurta (Cabassi vd. 2004), kerkedeyi (*Hibiscus sabdariffa*) (Tamura vd. 1995) de içeren pek çok gıdadan da izole edilmiştir.

Son yıllarda ülkemizde de *Cr. sakazakii* üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Gültekin ve Demirel 2006, Polat vd. 2007, Gümüş vd. 2008, Togay vd. 2008, Polat vd. 2008a, Dümen 2010, Gökmen vd. 2010)

Yapılan bir araştırmada 13 ülkeden toplanan toz bebek formüllerinden *E. agglomerans*, *E. cloacae* ve *Cr. sakazakii* yüksek miktarda izole edilmiştir. Buna karşın, her ne kadar *E. agglomerans* bebek formüllerinden sıklıkla izole edilen tür olarak belirlenmiş olsa da, bu organizmanın tanımı hala tam olarak ifade edilememektedir. Çünkü önceki *E. agglomerans* grubu yeni taksonomide *Pantoea* spp. ve *E. vulneris* olarak ayrılmıştır (Muytjens vd. 1988, Iversen ve Forsythe 2004a).

Enterobacteriaceae familyası üyeleri kurutma aşamasında canlılıklarını uzun dönem sürdürebilmelerine göre üç gruba ayrılır. Yapılan bir çalışmada *C. freundii*, *C. koseri* ve *E. cloacae*'nin ilk üç ay çok hafif bir azalma gösterecekler de 6 ay canlılıklarını koruyabildikleri hatta 8 aydan sonra geri kazanılabildikleri anlaşılmıştır. *Salmonella* Enteritidis, *K. pneumoniae* ve *Esc. coli* 15 ay, *Pantoea* spp., *K. oxytoca* *E. vulneris* 2 yıldan uzun süre ve *Cr. sakazakii*'nin kapsüllü suşları ise 2,5 yıldan daha uzun süre canlılıklarını sürdürebilmişlerdir (Barron vd. 2007).

Lindberga vd. (1998) 7°C'de muhafazanın ardından tüketime hazır pastörize süt ve krema paketlerinin %6'sında, perakende balıkların %31'inde ve perakende kıymanın ise %100'ünde *Enterobacteriaceae* saptamışlardır. *Citrobacter freundii*, *Serratia liquefaciens* ve *Hafnia alvei*'nin soğukta muhafaza edilen gıdalarda hızla çoğaldığı bildirilmiştir (Lund vd. 1992, Drosinos vd. 1995, Lindberga vd. 1998).

Enterobacteriaceae üyelerinin bazılarının günümüzde kullanılmakta olan antimikrobiyellere karşı gittikçe daha da dirençli hale geldiği ileri sürülmektedir. Bu

nedenle bu familyaya ait patojenlerin dirençlerinin kontrolü için önlemlerin geliştirilmesi önem kazanmıştır (Paterson vd. 2006). Miranda vd.'nin (2008) yapmış olduğu çalışmada organik üretime özgü yöntemler ile elde edilen ette, geleneksel tarım yöntemleri ile elde edilmiş olan etlere göre daha yüksek *Enterobacteriaceae* sayımları yapılmıştır. Organik tarım ürünleri ile yetiştirilmiş tavuklardan izole edilen *Enterobacteriaceae* üyelerinde, geleneksel yöntemlere uyularak yetiştirilmiş tavuk ve hindiden izole edilen aynı suşlara göre antimikrobiyel direncin daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu da organik tarımın gıda kaynaklı bakterilerin antimikrobiyel direncinin gelişmesini ve yayılmasını engelleyebileceği fikrini desteklemektedir.

Iversen ve Forsythe (2004a,b), API 20 E kitinin sınırlı sayıda test kullanım özelliği olduğunu, tüm *Cronobacter sakazakii* izolatlarının tanımlanmasında yetersiz kalabildiğini ve sahte negatif sonuçlara yol açabildiğini ileri sürmüştür. Bunun ise bebek süt formülleri ve süt tozunun piyasaya sürülmesinde hatalara ve ekonomik kayıplara yol açabileceği ifade edilmiştir. Buna rağmen bugün standart FDA protokolü API 20 E'nin kullanmasını önermektedir. Aynı araştırma grubu (2004c, 2007) yaptıkları çalışmalar ile ISO/DTC 22964 standardında önemli hatalar olduğunu da öne sürmüştür.

3. MATERYAL ve METOT

Çalışmada çeşitli gıda örneklerinden *Enterobacter* türleri ve *Cr. sakazakii* izolasyonlarında Iversen vd. (2004b)'nin kullandığı yöntem izlenmiştir. Bu izolatlar hem temel klasik biyokimyasal testler (Temiz 2000) ile tanımlanarak sonuçları Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'ye göre (Brenner 1986) incelenmiş, hem de API 20 E (BioMérieux, Fransa) (Anonymous 2002) ve ID 32 E (BioMérieux, Fransa) (Iversen vd., 2004b) hızlı test kitleri ile analiz edilerek sonuçlar <https://apiweb.biomerieux.com/jsp/ident/index.jsp> adresli web sitesinde yer alan yazılıma göre değerlendirilmiştir. Araştırmadaki moleküler tanımlama testleri darbeleri alan jel elektroforezi, polimeraz zincir reaksiyonu, 16S rRNA dizilim analizi yöntemi (Iversen vd. 2004a), çoklu lokus dizilim analizi, matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu uçuş süresi kütle spektrometresi analizi Prof. Dr. Stephen J. Forsythe'in (Nottingham Trent University, İngiltere) laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan 4 farklı gruptaki gıda örnekleri ve satın alındıkları yerler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan gıda örnekleri

ÜRÜN GRUBU	ÖRNEK	SATIN ALINDIĞI YER
Tahıl ürünleri	Pirinç unu	Kızılay-market
	Yulaf unu	Kızılay-aktar
	Çavdar unu	Kızılay-aktar
Çiğ sebzeler	Maydanoz	Dışkapı-market
	Brokoli	Dışkapı-market
	Ispanak	Dışkapı-market
Bitkisel ürünler	Anason tohumu	Kızılay-aktar
	Rezene tohumu	Kızılay-aktar
	Papatya çayı	Kızılay-aktar
Hayvansal ürünler	Çiğ süt	Dışkapı-işletme
	Çökelek peyniri	Ulus-hal
	Kıyma	Kızılay-market

3.2 Metot

3.2.1 Gıda örneklerinden *Enterobacter* sp. izolasyonu

Enterobacter sp. izolasyonu Iversen vd. (2004b)'ye ait yöntemin modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Herbir gıda örneği 25 g olarak tartılmış ve 225 mL Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS, Merck) içinde homojen hale getirilerek 20 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde kültürlerden 10 mL alınarak 90 mL *Enterobacteriaceae* Enrichment Broth besiyerine (EE Broth, Oxoid) ekim yapılmış ve yine 37°C sıcaklıkta 20 saat süreyle inkübe edilmiştir. Buradan öze ile alınan kültürler Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, Merck) besiyerine ekilmiştir. 37°C sıcaklıkta 20 saat süren inkübasyon sonunda oluşan kolonilerden pembe olanları seçilmiş bu koloniler tek tek VRBGA besiyerlerine öze ile ekilerek saflaştırmaya tabi tutulmuşlardır. Saflaştırılmış 18 saatlik aktif kültürlerden Gram boyama yapılarak Gram negatif olduğu saptanan her bir gıda örneğine ait 3'er adet izolat Tryptik Soy Broth (Merck) besiyerine 37°C 20 saat süreyle geliştirilmiş ve tanımlama testlerinin uygulanacağı zamana kadar %20 gliserol içeren eppendorf tüplerinde derin dondurucuda (-18°C) muhafaza edilmiştir (Iversen vd. 2004b).

3.2.2 Gıda örneklerinden *Cronobacter sakazakii* izolasyonu

Gıda örneği 25 g tartılıp önce 225 mL Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS, Merck) içinde homojen hale getirilip 37°C sıcaklıkta 20 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin bitiminde 10 mL zenginleştirilmiş kültür 90 mL EE Broth (Oxoid) besiyerine ilave edilmiş ve 37°C sıcaklıkta 20 saat inkübasyonun ardından bu kültürlerden Druggan Forsythe Iversen Agar (DFI Agar, Oxoid) besiyerine öze ile ekim yapılmıştır. DFI Agar besiyerinin yüzeyinde mavi-yeşil renk veren koloniler, muhtemel *Cronobacter sakazakii* olarak izole edilip TSA besiyerinde saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış 18 saatlik aktif kültürlerden Gram boyama yapılmış ve hepsinin Gram negatif reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Yeni izolatlar TSB besiyerinde 37°C sıcaklıkta 18 saat süreyle geliştirildikten sonra %20 gliserol içeren eppendorf tüplerine alınmış ve tanımlama testlerine kadar derin dondurucuda (-18°C) muhafaza edilmiştir (Iversen vd. 2004b).

3.2.3 Biyokimyasal testler

İzolatların klasik biyokimyasal yöntemler ile tanımlanabilmesi için karbonhidrat (laktoz, maltoz, sükroz, galaktoz ve glikoz) fermentasyonu, triptofandan indol oluşumu, Voges Proskauer testi, metil red testi, sitrat kullanımı, H₂S oluşumu, amino asit (arjinin, ornitin, lizin) dekarboksilasyonundan yararlanılmıştır (Temiz 2000).

3.2.3.1 Karbonhidrat fermentasyonu

İzole edilen suşların hangi karbonhidratları fermente ettiklerinin belirlenmesi amacıyla laktoz, maltoz, sükroz, galaktoz ve glikoz içeren besiyerinde gelişme durumları incelenmiştir.

TSB (Merck) besiyerine dondurulmuş kültürden aktararak 37°C sıcaklıkta 20 saatlik inkübasyon ile aktiveleştirme yapılmıştır. Deneme süresince bahsedilecek tüm aktiveleştirmelerde aynı yöntem kullanılmıştır. İçinde durham tüpü olan ve yukarıda belirtilen karbonhidratların birinden 10g/L olacak şekilde içeren Fenol Red Broth (Merck) besiyerlerine aktif kültürlerden aşılama yapılmıştır. Tüpler 10 gün süreyle 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmış olup tüplerde oluşan sararma ve gaz oluşumu günbegün incelenmiş, rengin kırmızıdan sarıya döndüğü tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2000).

3.2.3.2 Triptofandan indol oluşumu

20 saatlik aktif kültürler 5'er mL Flourocult Lauryl Sulphate Broth (FLST Broth, Merck) besiyerine aşılansmış ve 20 saat süreyle 37°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplere 0,5 mL Kovacs' ayıracı (Merck) ilave edilmiş ve en fazla 2 dakika içinde kiraz kırmızısı renkte halka görülen tüplerdeki izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2000).

3.2.3.3 Voges Proskauer testi

20 saatlik aktif kültürler 5'er mL steril MR-VP Broth (Merck) besiyerine aktarılmış ve tüpler 48 saat 37°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra herbir kültürden VP testinin yapılması amacı ile ayrı tüplere 1'er mL alınmıştır. Bu tüplerin üzerine önce 0,6 mL α -naftol, sonra da 0,2 mL %40'lık KOH çözeltisi ilave edilmiş ve 4 saat sonra kiraz kırmızısı renk oluşumu gözlenen tüplerdeki suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

5mL'lik aktif kültürlerden VP testi amacıyla 1'er mL kültür alınmasının ardından, 4 mL kültürün kaldığı tüpler daha sonra MR testi yapılabilmesi için tekrar inkübatöre yerleştirilmiştir (Temiz 2000).

3.2.3.4 Metil Red testi

Voges Proskauer testinden sonra MR-VP Broth (Merck) besiyerindeki kültürler 37°C sıcaklıkta 48 saat daha inkübasyona bırakılmış ve bu sürenin sonunda tüplere pastör pipeti ile 4 damla kadar metil red indikatörü damlatılmıştır. Sarıdan kırmızıya dönen tüplerdeki izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2000).

3.2.3.5 Sitrat kullanımı

Simmons Sitrat Agar (Merck) besiyeri bileşimine göre hazırlanıp tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlanmış ve tüpler yatık şekilde soğumaya bırakılmışlardır. Agar yüzeyine öze ile 20 saatlik aktif kültürden ekim yapılmış ve izolatlar 2-7 gün süre ile 37°C sıcaklıkta inkübe edilmişlerdir. Bu süre içinde yeşilden mavi renge dönüşüm gösteren tüplerdeki suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2000).

3.2.3.6 Hidrojen sülfür oluşumu

Kligler Iron Agar (Merck) besiyeri hazırlanıp tüplere dağıtılmış ve 121°C’de 15 dakika süreyle otoklavlanmış ve tüpler yatık şekilde soğumaya bırakılmışlardır. Agar yüzeyine öze ile 20 saatlik aktif kültürlerden ekim yapılmış ve izolatlar 2-7 gün süre ile 37°C sıcaklıkta inkübe edilmişlerdir. Bu süre içinde kırmızı besiyerinde siyah rengin görüldüğü tüplerdeki suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2000).

3.2.3.7 Aminoasit dekarboksilasyonu

İzolatların lizin, arjinin ve ornitin dekarboksilaz enzimlerinin varlığına bakılması için temel dekarboksilaz besiyerine 5g/L olacak şekilde lizin, arjinin ve ornitin aminoasitleri birbirlerinden ayrı ayrı eklenerek besiyerleri hazırlanmıştır. Kontrol amacıyla da hiçbir amino asit içermeyen temel dekarboksilaz besiyeri kullanılmıştır.

Aktif 20 saatlik kültürden dekarboksilaz besiyerlerine ekim yapılmasının ardından tüplerin hava ile temasının kesilip anaerobik koşul oluşturulması için üzerlerine 1 mL steril sıvı parafin eklenmiş ve tüpler 37°C sıcaklıkta 10 güne kadar inkübe edilmiştir. Tüplerdeki renk değişimi düzenli olarak kontrol edilmiştir. Tüplerdeki mor renkli besiyerinin bileşiminde bulunan glikozun kullanılması sonucu inkübasyonun birinci gününde renk sarıya dönmüştür. İnkübasyonun ilerleyen zamanlarında aminoasitlerin kullanılmasına bağlı olarak sarı rengin tekrar mor renge döndüğü tüplerdeki izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2000).

3.2.4 Hızlı test kitleri kullanılarak tanımlama

Tez çalışmasında izole edilen suşlar API ZYM (BioMérieux, Fransa), API 20E (BioMérieux, Fransa) ve ID32E (BioMérieux, Fransa) hızlı test kitleri kullanılarak incelenmişlerdir. Buna göre, TSA besiyeri üzerine yapılan ekimi takiben 37°C sıcaklıkta 20 saatlik inkübasyon ile aktiveleştirilen kültürler öze yardımı ile alınmış ve %0,85’lik fizyolojik tuzlu su içinde homojenize edilerek test gözeneklerine aşılanmıştır. API ID 32 ve API 20 E hızlı test kitleri ile tanımlama için test kartları tekrar 37°C

sıcaklıkta 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar <https://apiweb.biomerieux.com/jsp/ident/index.jsp> sitesinde yer alan yazılıma göre değerlendirilirken, API ZYM hızlı test kiti ile tanımlama için aynı sıcaklıkta sadece 4 saatlik inkübasyonun ardından test kartı üzerindeki sonuçlar değerlendirilmiştir. Kart üzerindeki her bir petekte farklı enzim aktivitesine bakılmıştır. İzolatın gösterdiği enzim aktivitelerine göre her bir petekteki renk değişimi gözlenmiştir. Oluşan rengin koyuluğuna göre 0-5 arasında numara verilmiştir. Ancak bu test sistemi tanımlama yapmaktan ziyade enzim aktivitesi hakkında bilgi vermeye yöneliktir. Bu testler sırası ile alkalın fosfat, esteraz (C4), esteraz lipaz (C8), lipaz (C14), lösin arilamidaz, valin arilamidaz, sistin arilamidaz, tripsin, alfa-çimotripsin, asit fosfat, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, alfa-galaktozidaz, beta-galaktozidaz, alfa-glukozidaz, beta-glukozidaz, N-asetil-beta-glukozaminidaz, alfa-mannozidaz ve alfa-fukozidazdır.

3.2.5 Moleküler yöntemler

3.2.5.1 Darbeli alan jel elektroforezi (PFGE)

Çalışmada klasik biyokimyasal yöntemlerle tanımlanan tüm izolatlardan aynı veya farklı olanlarının belirlenebilmesi amacıyla PFGE analiz yöntemi kullanılmıştır. Yöntem Center for Disease Control and Prevention (Anonymous 2004) protokolünde tarif edildiği gibi uygulanmıştır. Bu amaçla takip edilen işlem basamakları aşağıdaki şekildedir;

Dolgu, agaroz jelin içine yerleştirilecek örnek parçasıdır. İncelenecek izolatlara ait dolgu parçaları şu şekilde hazırlanmıştır. TSA üzerindeki koloniler swap yardımı ile alınarak kapaklı plastik tüplerde bulunan laboratuvar ortamında hazırlanmış 3 mL hücre süspansiyonu tampon çözeltisi (çözeltiler kısmında anlatılmıştır) içinde homojen olarak dağıtılmış ve bunlar spektrofotometrede 610 nm altında (JENWAY, İngiltere) okunarak optik yoğunlukları 1,3-1,4 OD (optik yoğunluk) arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu ayarlama hücre süspansiyonu tampon çözeltisi eklenerek seyreltme ya da swap ile daha fazla kültür alınarak süspansiyon içinde çözülmesi şeklinde yapılmıştır.

55°C sıcaklığa ayarlanmış termoblok (TECHNE, İngiltere) içindeki eppendorf tüplerine 300 µL TE tampon çözeltisi koyulmuştur. Bu çözelti %1 agaroz ve %1 SDS içermektedir. Ardından her eppendorfa 15 µL proteinaz-K ve 300'er µL optik yoğunluğunu ayarlanmış olunan kültürler dağıtılmıştır. Eppendorflardaki karışımlardan 500 µL alınarak dolguların katı hale getirileceği kalıplara otomatik pipet ile dolum yapılmıştır.

Katı hale gelen dolgular kalıplardan alınarak vida kapaklı 50 mL'lik polipropilen tüplere koyulup üzerlerine 5 mL hücre lize tampon çözeltisi ve 25 µL proteinaz-K ilave edilerek 55°C sıcaklığa getirilmiş çalkalamalı su banyosunda 150-175 rpm'de (2 x g) 1,5-2 saat süre ile lize edilmişlerdir.

Tüpler içindeki çözelti daha sonra süzülerek dolgular tüplere dağıtılan 15'er mL 60°C sıcaklıktaki steril destile su ile 55°C sıcaklıktaki su banyosunda 150 rpm'de (2 x g) 15 dakika yıkanmış, bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Sıcak su ile yıkama işleminin ardından dolgular aynı şekilde 2 kez 15'er mL TE tampon çözeltisi ile yıkanmıştır.

Tüplerden alınan dolgular PFGE koşumuna kadar içlerinde 3mL TE tampon çözeltisi olan kapaklı tüplerde 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

TE tampon çözeltisi içindeki dolguların üçte biri kesilerek eppendorflara alınmış ve herbir eppendorfa 135 µL steril su ve 15 µL RE tampon çözeltisi koyularak 30 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakılmıştır. Kapaklı tüp içine 2100 µL steril su, 240 µL RE tampon çözeltisi ve 60 µL XbaI (Ozyme, Saint-Quentin, Fransa) koyulmuştur. Beklemeye bırakılan eppendorfların içindeki çözeltiler 30 dakika sonra otomatik pipet yardımı ile boşaltılmış ve eppendorflara kapaklı tüpte hazırlanmış bulunan karışımdan 150'şer µL dağıtılarak daha önceden 37°C sıcaklığa ayarlanmış su banyosunda 1,5-2 saat bırakılmıştır.

Bu eppendorflardaki dolgu parçaları tarak dişlerine yerleştirilmiş ve tarak kalıba oturtulmuştur. Kalıba 60°C sıcaklıkta sıvı halde %1 agaroz içeren 100 mL 0,5M TBE tampon çözeltisi dökülmüş ve katılaşması beklenmiştir.

Tanka 2L 0,5 M TBE tampon çözeltisi dökülüp soğutma pompası 14°C sıcaklığa sabitlenmiştir. Elektroforez cihazı (BIO-RAD, A.B.D) 20 saatliğine 6 voltta başlangıç akım süresi 2,2 saniye, bitiş akım süresi 63,8 saniye olmak üzere ayarlanmış ve hazırlanan jel tanka yerleştirilerek koşturulmuştur.

Koşturma bitiminde tanktan alınan jel 400 mL saf su ve 20 µL etidyum bromür içeren boyama kabında 30 dakika tutulduktan sonra UV ışık altında jelin fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.5.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Suşların polimeraz zincir reaksiyonuna hazır hale gelmesi için gereken DNA izolasyonu 37°C sıcaklıkta TSB besiyerinde 18 saatlik inkübasyonun ardından Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma GenElute™, İngiltere) ile set içindeki çözeltiler ile kullanıcı talimatına uygun olarak yapılmıştır.

Hazırlanan DNA örnekleri, polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutuluncaya dek -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

DNA örnekleri farklı primerler için aynı şekilde hazırlanmıştır. Her bir örnek 5 µL tampon çözelti, 2 µL MgCl₂, 1 µL dNTP karışımı (eşit miktarlarda adenin, guanin, sitozin ve timin), 2,5 µL ileri primer, 2,5 µL geri primer, 0,25 µL Taq Polimeraz enzimi, 1 µL daha önce hazırlanmış olan örnek DNA'sı ve 10,75 µL steril destile su, bir eppendorf içinde karıştırılmış ve tüp, reaksiyonun meydana getirileceği cihaza yerleştirilmiştir (Lehner vd. 2004, Nair ve Venkitarayanan 2006, Kuhnert vd. 2009, Barron vd. 2009).

Kullanılan primerlerin özelliklerinin farklı olması sebebi ile PZR cihazı farklı süre ve sıcaklık şartlarında çalıştırılmıştır. Bu koşullar Çizelge 3.2'de kısaca özetlenmiştir.

Çizelge 3.2 Kullanılan primerlere özgü PZR koşulları

PRİMER	DÖNGÜ SAYISI	AŞAMA	SICAKLIK	SÜRE
Omp A	29	Başlangıç		
		denatürasyonu	92°C	2 dakika
		Denatürasyon	94°C	30 saniye
		Bağlanma	52°C	90 saniye
		Uzama	72°C	2 dakika
Esakf&r	30	Son uzama	72°C	10 dakika
		Başlangıç		
		denatürasyonu	92°C	2 dakika
		Denatürasyon	94°C	30 saniye
		Bağlanma	64°C	1 dakika
RecNEs	30	Uzama	72°C	90 saniye
		Son uzama	72°C	5 dakika
		Başlangıç		
		denatürasyonu	95°C	3 dakika
		Denatürasyon	95°C	30 saniye
Esak 2 & 3	35	Bağlanma	54°C	30 saniye
		Uzama	72°C	2 dakika
		Son uzama	72°C	5 dakika
		Başlangıç		
		denatürasyonu	95°C	5 dakika
		Denatürasyon	95°C	40 saniye
		Bağlanma	60°C	60 saniye
		Uzama	72°C	72 saniye
		Son uzama	72°C	72 saniye

3.2.5.3 Çoklu lokus dizilim tiplendirmesi (MLST-multilocus sequence typing)

MLST; 7 ekspresyonu değişmeyen temel genin iç kısmındaki parçalarının kullanılarak bakteri izolatlarının karakterizasyonun yapıldığı kesin karakterizasyon yöntemidir. Herbir genin iç kısmındaki yaklaşık 450-500 baz çifti büyüklüğündeki parçalar, otomatik DNA dizilimleyicisi vasıtası ile iki iplikçik yönünden de doğru bir şekilde dizilimlenerek kullanılırlar. Herbir ekspresyonu değişmeyen temel gen için, bakteri türündeki farklı dizilimler farklı alleller olarak atanır ve herbir izolat için 7 lokustaki alleller, allelik profili ya da dizilim analizini tanımlar.

Türlere ait her bir izolat 7 ekspresyonu değişmeyen temel gen lokusundaki allellere karşılık gelen 7 tamsayı serisi sayesinde doğru bir şekilde tanımlanır.

MLST’de alleller arasındaki nükleotid farklılıklarının sayısı gözardı edilerek, bu farklılıkların tek bir nükleotid alanında mı yoksa birkaç alanda mı meydana geldiği göz önünde bulundurulur ve farklı allel numaraları verilir. Buradaki mantık; yeni bir allel oluşumuna sebep olan tek bir genetik olayın nokta mutasyonu ya da sonradan meydana gelecek olan allele nazaran orjinal allelle ilişkili olan yeniden birleşim anındaki yer değişimi ile meydana gelmesidir (www.mlst.net 2010).

İzolatların bu yöntem ile incelenmesi için polimeraz zincir reaksiyonundan faydalanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonuna tabii tutulacak her bir örnek 5 µL tampon, 2 µL MgCl₂, 1 µL dNTP karışımı (eşit miktarlarda adenin, guanin, sitozin ve timin), 2,5 µL ileri primer, 2,5 µL geri primer, 0,25 µL Taq Polimeraz enzimi, 1 µL daha önce hazırlanmış olan örnek DNA’sı ve 10,75 µL steril destile suyun bir eppendorf içinde karıştırılmış ve tüp, reaksiyonun meydana getirileceği cihaza yerleştirilmiş ve cihaz 30 döngü için 94°C sıcaklıkta 2 dakika başlangıç denatürasyonu, 94°C sıcaklıkta 1 dakika denatürasyon, 58°C sıcaklıkta 1 dakika bağlanma, 72°C 2 dakika uzama ve 72°C sıcaklıkta 5 dakika son uzama aşamaları olmak üzere çalıştırılmıştır. Kullanılan primerler *atpD*, *fusA*, *glnS*, *gltB*, *gyrB*, *infB*, *pps*’dir ve bu primerlerin kodladıkları genler sırası ile B alt ünitesinde ATP sentezi, uzama faktörü EF-2, glutamil tRNA sentetaz, glutamat sentaz büyük alt ünite, tip IIA topoizomerase, başlama transkripsiyon faktörü 2, fosfoenol pirüvat sentazdır (Baldwin vd. 2009). Kullanılmış olan primerler Çizelge 3.3’te daha ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 MLST için yollanacak örneklerle uygulanan PZR için kullanılan primerlerin hedeflediği genler, dizilimleri ve allel boyutları

GEN	YÖN	PRİMER DİZİLİMİ	ALLEL BOYUTU (bp)
<i>atpD</i>	İleri	CGAAATGACCGACTCCAA	390
	Geri	GGATGGCGATGATGTCTT	
<i>fusA</i>	İleri	GCTGGATGCGGTAATTGA	438
	Geri	CCCATAACCAGCGATGATG	
<i>glnS</i>	İleri	GGGTGCTGGATAACATCA	363
	Geri	CTTGTTGGCTTCTTCACG	
<i>gltB</i>	İleri	GCGAATAACCACGCCTACA	507
	Geri	GCGTATTTCACGGAGGAG	
<i>gyrB</i>	İleri	CTCGCGGGTCACTGTAAA	402
	Geri	ACGCCGATACCGTCTTTT	

Çizelge 3.3 MLST için yollanacak örneklere uygulanan PZR için kullanılan primerlerin hedeflediği genler, dizilimleri ve allel boyutları (devam)

<i>infB</i>	İleri	FTGACCACGGTAAAACCTC	441
	Geri	GGACCACGACCTTTATCC	
<i>Pps</i>	İleri	ACCCTGACGAATTCTACG	495
	Geri	CAGATCCGGCATGGTATC	

Reaksiyonun ardından elde edilen PZR ürünleri saflaştırma işlemi yapılmıyaya dek -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmiş, sonrasında MinElute PZR saflaştırma kiti (Qiagen, Almanya) ile üretici talimatlarına göre DNA saflaştırması yapılmıştır. DNA miktarının ölçülmesinin ardından örnekler çoklu lokus dizilim tiplendirmesinin yapılması için Eurofins MGW (İngiltere) firmasına gönderilmiştir. Firmadan gelen dizilim analizi sonuçları www.phylogeny.fr adresindeki yazılım kullanılarak incelenmiştir.

3.2.5.4 16S rRNA dizilim analizi

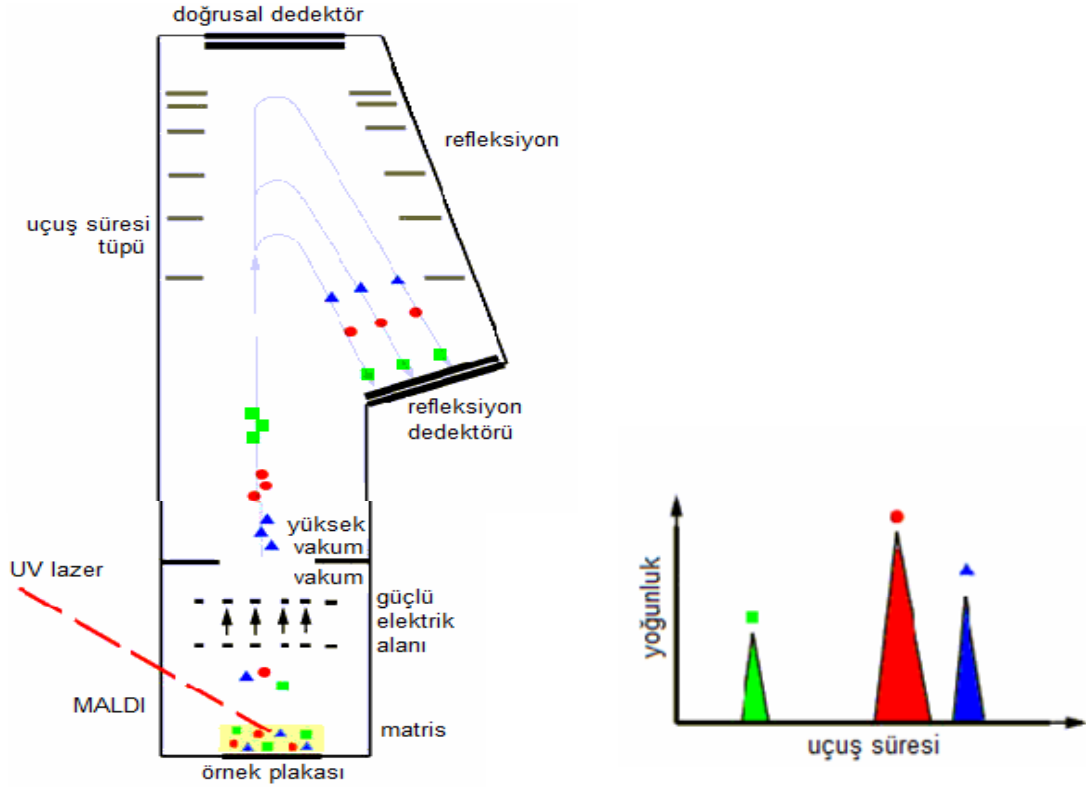
İzolatların 16S rRNA dizilim analizi incelemesi Accugenix (A.B.D.) tarafından, bu incelemenin ardından yapılması gereken filogenetik araştırma ise ClustalW (Wellcome Sanger Centre, İngiltere) tarafından yapılmıştır.

3.2.5.5 Matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu - uçuş süresi kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS)

Matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu (MALDI) proteinler, peptidler ve şekerler gibi biyomoleküllerin ve daha geleneksel iyonizasyon yöntemleri tarafından iyonize edildiğinde kırılıp parçalanmaya eğilimli olan polimerler, dendrimerler gibi büyük organik moleküllerin analizini mümkün kılan hassas bir tekniktir. Karakteristik olarak hem hassasiyet hem de üretilen iyonlar açısından -her ne kadar daha az yüklü iyonlara sebep olsa da- en çok elektrosprey iyonizasyonuna benzer (<http://en.wikipedia.org> 2010).

İyonizasyon lazer ışması ile tetiklenir ki bu amaçla normal olarak nitrojen lazer kullanılır. Matris ise doğrudan lazer ışmasının biyomoleküle zarar vermesini

engelleyerek buharlaşmayı ve iyonlaşmayı sağlar (http://en.wikipedia.org 2010). Şekil 3.1’de yer alan çizim ile bu teknik özetlenmektedir.



Şekil 3.1 Matris destekli lazer desorpsiyon/ iyonizasyonu kütle spektrometresinin şekilsel anlatımı

MALDI/TOF MS’de (time of flight/uçuş süresi kütle spektrometresi) spektrumlar mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılmaktadır. İncelenmek istenen mikroorganizmaya ait koloni doğrudan örnek hedef noktasının üzerine yayılır ve matris ile kaplanır. Üretilmiş kütle spektrumları ilgili yazılım ile incelenir ve kayıtlı profiller ile karşılaştırılır. Türlerin bu teknik ile tanımlanması günümüz standart immünolojik ve biyokimyasal yöntemlerden daha güvenilir ve ucuzdur (Seng vd. 2009).

İzolatların MALDI-TOF MS ile incelenmesi 16S rRNA dizilim analizinde olduğu gibi, Accugenix (A.B.D.) tarafından yapılmıştır. Firmanın gönderdiği 16S rRNA dizilim analizi sonuçları www.phylogeny.fr adresindeki yazılım vasıtası ile incelenmiştir.

4 ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1 Gıda Örneklerinden *Enterobacter* Türlerinin ve *Cr. sakazakii*'nin İzolasyonu

Çalışmada kullanılan örneklerin ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirmeyi takip eden VRBGA (Merck) besiyerine ekimin sonucunda oluşan pembe koloniler muhtemel *Enterobacter* sp. suşları olarak kabul edilirken, aynı örneklerin ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirme ardından ekimin yapıldığı DFI agar (Oxoid) besiyerinde mavi-yeşil koloni oluşturan izolatlar muhtemel *Cr. sakazakii* olarak çalışmada yer almıştır.

Anason, papatya, çiğ süt, maydanoz, brokoli, ıspanak örneklerinden yapılan ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirmeyi takiben DFI agar besiyerine yapılmış olan ekim sonunda herhangi mavi-yeşil renkte koloniye rastlanmamıştır.

İzolatlar Çizelge 4.1’de belirtildiği şekilde kodlanmıştır.

Çizelge 4.1 Örnekler ve izolat kodları

ÖRNEK GRUBU	ÖRNEK	MUHTEMEL <i>ENTEROBACTER</i> SP. İZOLATLARININ KODLARI	MUHTEMEL <i>CRONOBACTER</i> SP. İZOLATLARININ KODLARI
Tahıl ürünleri	Pirinç unu	B1, 2B3, 2B4	BS1, BS2, BS3
	Yulaf unu	E1, E2, E3	ES1, ES2, ES3
	Çavdar unu	D1, D2, D3	DS1, DS2, DS3
Bitki çayları	Anason	F1, F2, F3	--
	Rezene	H1, H2, H3	HS1, HS2, HS3
	Papatya	G1, G2, G3	--
Hayvansal ürünler	Çiğ süt	L1, L2, L3	--
	Çökelek	M1, M2, M3	MS1, MS2, MS3
	Kıyma	J1, J2, J3	JS1, JS2, JS3
Sebzeler	Maydanoz	P1, P2, P3	--
	Brokoli	K1, K2, K3	--
	Ispanak	N1, N2, N3	--

4.2 Biyokimyasal Testlerin Sonuçları

4.2.1 Klasik Biyokimyasal Testlerle Tanımlama Sonuçları

Klasik biyokimyasal testler ile yapılan incelemede, G1, J2, K1, K2, K3 ve N1 izolatlarının tanımlanması mümkün olmamıştır. DFI agarda oluşturdukları mavi-yeşil tipik koloniler sebebi ile muhtemel *Cr. sakazakii* olarak izole edilmiş olan JS1, JS2, JS3, MS1, MS2, MS3 kodlu örnekler klasik biyokimyasal testlerle yapılmış olunan tanımlamada *Enterobacter agglomerans* olarak tanımlanmamıştır.

Çalışmada izolatların tanımlanması amacıyla yapılan biyokimyasal testlerin sonuçları 4.2 - 4.8 numaralı çizelgelerde verilmiştir.

4.2.2 Hızlı Test Kitleri ile yapılan Tanımlama Sonuçları

Araştırmada 13 adedi muhtemel *Cr. sakazakii* olan 45 adet izolata ait API ZYM, API 20 E ve ID 32 E hızlı test kiti profil sayıları ve tanımlama sonuçları çizelge 4.9- 4.16 verilmiştir.

Çizelge 4.2 Tahıl ürünlerinden elde edilen muhtemel *Enterobacter* sp. izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları

	Maltoz	Sükroz	Galaktoz	Glikoz	Gli-gaz	Laktoz	La-gaz	Lisin	Ornitin	Arjinin	MR	VP	Indol	Sitrat	H ₂ S	Tanımlama
B1	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	<i>E. gergoviae</i> , <i>Sr. marces</i> , <i>Sr. pantoea</i>
2B3	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>E. agglomerans</i>
2B4	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>E. agglomerans</i>
E1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	<i>E. amnigenus</i>
E2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	<i>E. cloacae</i> , <i>Cr. sakazakii</i> , <i>E. dissolvans</i>
E3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	<i>E. amnigenus</i> , <i>E. agglomerans</i>
D1	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>E. agglomerans</i>
D3	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>E. agglomerans</i>
D5	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>E. agglomerans</i>

Çizelge 4.3 Tahıl ürünlerinden elde edilen muhtemel *Cr. sakazakii* izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları

	Maltoz	Sükroz	Galaktoz	Glikoz	Gli-gaz	Laktoz	La-gaz	Lisin	Ornitin	Arjinin	MR	VP	Indol	Sitrat	H ₂ S	Tanımlama
BS1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	<i>E. cloacae</i> , <i>Cr. sakazakii</i> , <i>E. dissolvans</i>
BS2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	<i>E. cloacae</i> , <i>Cr. sakazakii</i> , <i>E. dissolvans</i>
BS3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	<i>E. cloacae</i> , <i>Cr. sakazakii</i> , <i>E. dissolvans</i>
ES1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>E. agglomerans</i>
ES2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	<i>E. cloacae</i> , <i>Cr. sakazakii</i> , <i>E. dissolvans</i>
ES3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>E. agglomerans</i>
DS1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	<i>E. cloacae</i> , <i>Cr. sakazakii</i> , <i>E. dissolvans</i>
DS2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	<i>E. cloacae</i> , <i>Cr. sakazakii</i> , <i>E. dissolvans</i>
DS3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	<i>E. cloacae</i> , <i>Cr. sakazakii</i> , <i>E. dissolvans</i>

Çizelge 4.4 Bitki çaylarından elde edilen muhtemel *Enterobacter* sp. izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları

	Maltoz	Sükroz	Galaktoz	Glikoz	Gli-gaz	Laktoz	La-gaz	Lisin	Ornitin	Arjinin	MR	VP	Indol	Sitrat	H ₂ S	Tanımlama
F1	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	-	+	-	+	-	<i>E. cloacae</i> , <i>Cr. sakazakii</i> , <i>E. dissolvens</i>
F2	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	<i>E. cloacae</i> , <i>Cr. sakazakii</i> , <i>E. dissolvens</i>
F3	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>E. agglomerans</i> , <i>Pa.</i>
H1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>agglomerans</i> , <i>E. agglomerans</i> , <i>E. amnigenus</i> , <i>Rh. aquati</i>
H2	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	<i>E. agglomerans</i> , <i>K. ozaena</i> , <i>E. agglomerans</i> , <i>E. amnigenus</i> , <i>Rh. aquati</i>
H3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>E. agglomerans</i> , <i>E. amnigenus</i> , <i>Rh. aquati</i>
G1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	--
G2	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	<i>Sr. grimes</i>
G3	+	+	+	+	-	+	+	±	-	-	-	+	-	+	-	<i>E agglomerans</i> , <i>K. terrig</i> <i>Pa.</i> <i>agglomerans</i> ,

Çizelge 4.5 Bitki çaylarından elde edilen *Cr. sakazakii* izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları

	Maltoz	Sükroz	Galaktoz	Glikoz	Gli-gaz	Laktoz	La-gaz	Lisin	Ornitin	Arjinin	MR	VP	Indol	Sitrat	H ₂ S	Tanımlama
HS1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	<i>E. cloacae</i> , <i>Cr. sakazakii</i> , <i>E. dissolvens</i>
HS2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	<i>E. cloacae</i> , <i>Cr. sakazakii</i> , <i>E. dissolvens</i>
HS3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	<i>E. cloacae</i> , <i>Cr. sakazakii</i> , <i>E. dissolvens</i>

Çizelge 4.6 Hayvansal kaynaklı ürünlerden elde edilen muhtemel *Enterobacter* sp. izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları

	Maltoz	Sükroz	Galaktoz	Glikoz	Gli-gaz	Laktoz	La-gaz	Lisin	Ornitin	Arjinin	MR	VP	Indol	Sitrat	H ₂ S	Tanımlama
J1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	<i>Sr. fonticola</i>
J2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	--
J3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	-	-	-	-	<i>Esc. coli</i>
L1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	<i>Cl. amalon</i>
L2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	<i>Cl. amalon</i>
L3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	<i>Cl. amalon</i>
M1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae,</i> <i>K. terrig</i>
M2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>Esc. coli</i>
M3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>Esc. coli</i>

Çizelge 4.7 Hayvansal kaynaklı ürünlerden elde edilen muhtemel *Cr. sakazakii* izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları

	Maltoz	Sükroz	Galaktoz	Glikoz	Gli-gaz	Laktoz	La-gaz	Lisin	Ornitin	Arjinin	MR	VP	Indol	Sitrat	H ₂ S	Tanımlama
JS1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>E. agglomerans</i>
JS2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	<i>E. agglomerans,</i> <i>K. ozaena</i>
JS3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	<i>E. agglomerans</i>
MS1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	<i>E. agglomerans</i>
MS2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	<i>E. agglomerans</i>
MS3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	<i>E. agglomerans,</i> <i>L. adecar</i>

Çizelge 4.8 Çiğ sebzelerden elde edilen muhtemel *Enterobacter* sp. izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları

	Maltoz	Sükroz	Galaktoz	Glikoz	Gli-gaz	Laktoz	La-gaz	Lisin	Ornitin	Arjinin	MR	VP	Indol	Sitrat	H ₂ S	Tanımlama
K1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	--
K2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	--
K3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	--
N1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	--
N2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	<i>Cl. freundii</i> , <i>E. asburi</i>
N3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	<i>Cl. freundii</i> , <i>E. asburi</i>
P1	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	<i>E. intermedius</i>
P2	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>E. intermedius</i>
P3	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	<i>E. agglomerans</i>

Çizelge 4.9 Tahıl ürünlerinden elde edilen muhtemel *Enterobacter* sp. izolatlarının profil numaraları ve muhtemel tanı sonuçları

İZOLAT KODU	HIZLI KİT ÇEŞİDİ	PROFİL NUMARASI	MUHTEMEL TANI
B1	ID 32 E	00074711001	<i>Pantoea</i> spp.1 (%66,3), <i>Pantoea</i> spp. (%33,2), <i>Pantoea</i> spp.4 (%0,2) <i>Pantoea</i> spp., <i>E. cloacae</i>
2B3	API 20E API ZYM ID 32 E	3225132 03100200005404000000 30215740020	<i>Aeromonas hydrophila</i> /sobria <i>Pantoea</i> spp.2 (%99,91), <i>K. oxytoca</i> (%0,2)
2B4	API ZYM ID32 E API 20E	01210200005302000000 30215740020 1245572	<i>Aeromonas hydrophila</i> / sobria <i>Pantoea</i> spp.2 (%99,91), <i>K. oxytoca</i> (%0,2)
E1	API ZYM ID 32 E API 20E	01210200005302000000 74074757330 7305773	<i>E. aerogenes</i> (%94,3), <i>E. cloacae</i> (%5,3) <i>E. aerogenes</i> (%52,8), <i>E. cloacae</i> (%41,2), <i>Cr. sakazakii</i> (%2,5)
E2	API ZYM ID 32 E API 20E	04000200005301000100 74074547231 7305773	<i>E. cloacae</i> (%98,9), <i>E. amnigenus</i> (%1,0) <i>E. aerogenes</i> (%52,8), <i>E. cloacae</i> (%41,2), <i>Cr. sakazakii</i> (%2,5)
E3	API ZYM ID 32 E API 20E	00000200003214010100 75074757331 5215773	<i>K. pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i> (%50,8), <i>E. aerogenes</i> (%48,1), <i>E. cloacae</i> (%1,0) <i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> (%97,6), <i>K. oxytoca</i> (%2,1)
D1	API ZYM ID 32 E API 20E	04000300005223000000 30275751010 7265123	<i>E. cloacae</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> / caviae/sobria
D3	API ZYM ID 32 E API 20E	02320300005403000000 30214000001 1022132	<i>K. pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i> (%86,7), <i>E. aerogenes</i> (%12,4), <i>E. cloacae</i> (%0,6) <i>K. pneumoniae</i> ssp. ozaenae, <i>C. freundii</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Rh. aquatilis</i>
D5	API ZYM ID 32 E API 20E API ZYM	03010100005103000000 30275751010 7265123 02320300005403000000	<i>E. cloacae</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> / caviae/sobria

Çizelge 4.10 Tahıl ürünlerinden elde edilen muhtemel *Cr.sakazakii* izolatlarının profil numaraları ve muhtemel tanı sonuçları

İZOLAT KODU	HIZLI KİT ÇEŞİDİ	PROFİL NUMARASI	MUHTEMEL TANI
BS1	ID 32 E	34274767251	<i>Cr.sakazakii</i> (%99,9), <i>E.cloacae</i> (%0,1)
	API 20E	3305373	<i>E.cloacae</i> (%98,4), <i>Cr.sakazakii</i> (%1,5)
BS2	API ZYM ID 32 E	01230100001121021000 34274767451	<i>Cr. sakazakii</i> (%99,9), <i>E. cloacae</i> (%0,1)
	API 20E	3305373	<i>E.cloacae</i> (%98,4), <i>Cr.sakazakii</i> (%1,5)
BS3	API ZYM ID32 E	00220100002122021000 34274767251	<i>Cr.sakazakii</i> (%99,9), <i>E.cloacae</i> (%0,1)
	API 20E	3305373	<i>E.cloacae</i> (%98,4), <i>Cr.sakazakii</i> (%1,5)
ES1	API ZYM ID 32 E	01230100001121021000 14234767010	<i>Cr. sakazakii</i> (%99,9), <i>E. cloacae</i> (%0,1)
	API 20E	1304373	<i>Cr. sakazakii</i> (%59,6), <i>Sr. fonticola</i> (%18,5), <i>E. gergoviae</i> (% 7,8), <i>E. cloacae</i> (%0,1), <i>E. anmigenus</i> 1 (%2,3)
ES2	API ZYM ID 32 E	01220000001121010000 34276763010	<i>Cr. sakazakii</i> (%99,9), <i>E. cloacae</i> (%0,1)
	API 20E	1304373	<i>Cr. sakazakii</i> (%59,6), <i>Sr. fonticola</i> (%18,5), <i>E. gergoviae</i> (%7,8), <i>E. cloacae</i> (%0,1), <i>E. anmigenus</i> 1 (%2,3)
ES3	API ZYM ID 32 E	01441221103355135110 14234767010	<i>Cr. sakazakii</i> (%99,9), <i>E. cloacae</i> (%0,1)
	API 20E	1304373	<i>Cr. sakazakii</i> (%59,6), <i>Sr. fonticola</i> (%18,5), <i>E. gergoviae</i> (%7,8), <i>E. cloacae</i> (%0,1), <i>E. anmigenus</i> 1 (%2,3)
DS1	API ZYM ID 32 E	01220000001121010000 3435676710	<i>Cr. sakazakii</i> , <i>E. cloacae</i>
	API 20E	3304373	<i>Cr. sakazakii</i> (%97,3), <i>E. cloacae</i> (%2,6)
DS2	API ZYM ID 32 E	02331211102145134210 34276763011	<i>Cr. sakazakii</i> (%99,9), <i>E. cloacae</i> (%0,1)
	API 20E	3305373	<i>Cr. sakazakii</i> (%98,4), <i>E. cloacae</i> (%1,5)
DS3	API ZYM ID 32 E	02341311103145045300 3435676710	<i>Cr. sakazakii</i> , <i>E. cloacae</i>
	API 20E	3304373	<i>Cr. sakazakii</i> (%97,3), <i>E. cloacae</i> (%2,6)
	API ZYM	02331211102145134210	

Çizelge 4.11 Bitki çayı örneklerinden elde edilen muhtemel *Enterobacter* sp. izolatlarının profil numaraları ve muhtemel tanı sonuçları

İZOLAT KODU	HIZLI KİT ÇEŞİDİ	PROFİL NUMARASI	MUHTEMEL TANI
F1	ID 32 E	74464743400	<i>Esc. coli</i> (%98,5), <i>Salmonella choleraesuis</i> ssp <i>arizonae</i> (%1,4)
	API 20E	5204572	<i>Sr. fonticola</i> (%36), <i>Khuyvera</i> spp. (%34,2), <i>E. aerogenes</i> (%13,3), <i>Salmonella choleraesuis</i> ssp <i>arizonae</i> (%8,4)
F2	API ZYM ID 32 E	02100200004202010000 00274707011	<i>Pantoea</i> spp. 1 (%99,9), <i>E. cloacae</i> (%0,1)
	API 20E	1005133	<i>Pantoea</i> spp. 3 (%99,2), <i>Rh. aquatilis</i> (%0,3)
F3	API ZYM ID32 E	02100200005201000000 00273707011	<i>Pantoea</i> spp. 1 (%99,9), <i>Aeromonas hydrophila/</i> <i>caviae/ sobria</i> (%0,1)
	API 20E	0005121	<i>Pantoea</i> spp. 1 (%98,4), <i>Cedecea davisae</i> (%0,6)
H1	API ZYM ID 32 E	03000400005201000400 01474563011	<i>Buttiauxella agrestis</i> (%85,6), <i>Esc. vulneris</i> (%13,6), <i>Leclercia</i> <i>adecarboxylata</i> (%0,6)
	API 20E	1205773	<i>Pantoea</i> spp. 2 (%42,2), <i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> (%38,2), <i>Sr. ficaria</i> (%11,6), <i>Raoultella terrigena</i> (%5,2)
H2	API ZYM ID 32 E	03000200005002000000 04476563051	<i>Buttiauxella agrestis</i> (%89,7), <i>Esc. vulneris</i> (%10,1)
	API 20E	1004153	<i>Esc. vulneris</i> (%61,5), <i>Buttiauxella agrestis</i> (%23,6), <i>Pantoea</i> spp. 4 (%8,2), <i>K. pneumoniae</i> ssp <i>ozaenae</i> (%4,5)
H3	API ZYM ID 32 E	00210100101123032200 04074743030	<i>Pantoea</i> spp. 3 (%86,8), <i>Rh.aquatilis</i> (%12,7), <i>E. amnigenus</i> (%0,1)
	API 20E	1205773	<i>Pantoea</i> spp. 2 (%42,2), <i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> (%38,2), <i>Sr. ficaria</i> (%11,6), <i>Raoultella terrigena</i> (%5,2)
	API ZYM	0210020000500300000	

Çizelge 4.11 Bitki çayı örneklerinden elde edilen muhtemel *Enterobacter* sp. izolatlarının profil numaraları ve muhtemel tanı sonuçları (devam)

G1	ID 32 E	74074543231	<i>E. amnigenus</i> (%81,1), <i>E. cloacae</i> (%18,8), <i>E. intermedius</i> (%0,1)
	API 20E	330553	<i>E. amnigenus</i> 2 (%96,4) <i>E. cloacae</i> (%3,4), <i>Cr. sakazakii</i> (%0,1)
G2	API ZYM ID 32 E	01100100003213002000 00274613011	<i>Pantoea</i> spp. 1 (%99,9), <i>Pantoea</i> spp. 2 (%0,1)
	API 20E	1005133	<i>Pantoea</i> spp. 3 (%99,2), <i>Rh. aquatilis</i> (%0,3)
G3	API ZYM ID 32 E	02100400005104000100 40270713011	<i>Pantoea</i> spp.1, <i>Serratia</i> <i>rubidaea</i>
	API 20E	2027133	<i>Pantoea</i> spp. 3, <i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae/sobria</i> 1
	API ZYM	03120100005300001000	

Çizelge 4.12 Bitki çaylarından elde edilen muhtemel *Cr. sakazakii* izolatlarının profil numaraları ve muhtemel tanı sonuçları

İZOLAT KODU	HIZLI KİT ÇEŞİDİ	PROFİL NUMARASI	MUHTEML TANI
HS1	ID 32 E	34276367210	<i>Cr. sakazakii</i> (%99,9), <i>E. cloacae</i> (%0,1)
	API 20E	3305373	<i>Cr. sakazakii</i> (%98,4), <i>E. cloacae</i> (%1,5)
HS2	API ZYM ID 32 E	01330210102124143200 34276367210	<i>Cr. sakazakii</i> (%99,9), <i>E. cloacae</i> (%0,1)
	API 20E	3305373	<i>Cr. sakazakii</i> (%98,4), <i>E. cloacae</i> (%1,5)
HS3	API ZYM ID32 E	01330210102124143200 34276367210	<i>Cr. sakazakii</i> (%99,9), <i>E. cloacae</i> (%0,1)
	API 20E	3305373	<i>Cr. sakazakii</i> (%98,4), <i>E. cloacae</i> (%1,5)
	API ZYM	01330210102124143200	

Çizelge 4.13 Hayvansal ürünlerden elde edilen muhtemel *Enterobacter* sp. izolatlarının profil numaraları ve muhtemel tanı sonuçları

İZOLAT KODU	HIZLI KİT ÇEŞİDİ	PROFİL NUMARASI	MUHTEMEL TANI
J2	ID 32 E	74464763400	<i>Esc. coli</i> (%99,8), <i>Salmonella choleraesuis</i> ssp <i>arizonae</i> (%0,1)
	API 20E	7104572	<i>Esc. coli</i> 1 (%76,8), <i>Salmonella choleraesuis</i> ssp <i>arizonae</i> (%20,6), <i>E. cloacae</i> (%1,1)
	API ZYM	03100300005303120000	
L1	ID 32 E	34463343420	<i>Esc. coli</i> , <i>C. braakii</i>
	API 20E	1045553	<i>Pantoea</i> spp. 4 (%76), <i>Leclercia</i> <i>adecarboxylata</i> (%20,8), <i>Esc. coli</i> 1 (%0,2)
	API ZYM	03100300005102010000	
L2	ID 32 E	34463343420	<i>Esc. coli</i> , <i>C. braakii</i>
	API 20E	1045553	<i>Pantoea</i> spp. 4 (%76), <i>Leclercia</i> <i>adecarboxylata</i> (%20,8), <i>Esc. coli</i> 1 (%0,2)
	API ZYM	03100300005102010000	
L3	ID 32 E	34465543400	<i>Esc. coli</i> (%99,9), <i>Salmonella choleraesuis</i> ssp <i>arizonae</i> (%0,1)
	API 20E	7044553	<i>Esc. coli</i> 1(%81,8), <i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>ozanae</i> (%11,4)
	API ZYM	02000400005102010000	
M1	ID 32 E	74465541420	<i>Esc. coli</i> (%99,8), <i>Salmonella choleraesuis</i> ssp <i>arizonae</i> (%0,1)
	API 20E	7214773	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> (%90,6), <i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>ozanae</i> (%4,4)
	API ZYM	05100400005225000000	
M3	ID 32 E	74465541420	<i>Esc. coli</i> (%99,8), <i>Salmonella choleraesuis</i> ssp. <i>arizonae</i> (%0,1)
	API 20E	7344542	<i>Salmonella chloraesuis</i> ssp. <i>arizonae</i> (%68,4), <i>Salmonella</i> spp. (%17,8), <i>Esc. coli</i> 1 (%13,2)
	API ZYM	02000100005303100000	

Çizelge 4.14 Hayvansal ürünlerden elde edilen muhtemel *Cr. sakazakii* izolatlarının profil numaraları ve muhtemel tanı sonuçları

İZOLAT KODU	HIZLI KİT ÇEŞİDİ	PROFİL NUMARASI	MUHEMEL TANI
JS1	ID 32 E	31441323142	<i>Proteus vulgaris</i> grubu,
	API 20E	2676030	<i>Proteus vulgaris</i> grubu,
	API ZYM	022115102012000020000	<i>Providencia rettgeri</i>

Çizelge 4.15 Çiğ sebzelerden elde edilen muhtemel *Enterobacter* sp. izolatlarının profil numaraları ve muhtemel tanı sonuçları

İZOLAT KODU	HIZLI KİT ÇEŞİDİ	PROFİL NUMARASI	MUHEMEL TANI
K1	ID 32 E	00074713011	<i>Pantoea</i> spp. 1 (%99,9)
	API 20E	3025133	<i>Pantoea</i> spp. 3 (%0,1)
	API ZYM	03110200005303000100	<i>Pantoea</i> spp. 3 (%92,9)
K2	ID 32 E	00074713011	<i>E. cloacae</i> (%2,8)
	API 20E	3025133	<i>Pantoea</i> spp. 1 (%99,9)
	API ZYM	03110200005303000100	<i>Pantoea</i> spp. 3 (%0,1)
K3	ID32 E	00074713011	<i>Pantoea</i> spp. 3 (%92,9)
	API 20E	3025133	<i>E. cloacae</i> (%2,8)
	API ZYM	03110200005303000100	<i>Pantoea</i> spp. 1 (%99,9)
P1	ID 32 E	00076713001	<i>Pantoea</i> spp. 3 (%0,1)
	API 20E	3004133	<i>Pantoea</i> spp. 3 (%92,9)
	API ZYM	02110100005203000000	<i>E. cloacae</i> (%2,8)
P2	ID 32 E	00276713011	<i>Pantoea</i> spp.1 (%99,9)
	API 20E	1045333	<i>Pantoea</i> spp.2 (%0,1)
	API ZYM	03000300005103000200	<i>E. cloacae</i> (%0,4)
P3	ID 32 E	74475543011	<i>Esc. vulneris</i> (%41,4),
	API 20E	3064153	<i>Pantoea</i> spp. 3 (%22,3),
	API ZYM	02100300004102000000	<i>K. pneumoniae</i> spp. ozaenae (%21,4),
			<i>Pantoea</i> spp. 4 (%10,0),
			<i>C. freundii</i> (%1,1)
			<i>Pantoea</i> spp.1 (%99,9),
			<i>Cedecea neteri</i> (%0,1)
			<i>Pantoea</i> spp. 3 (%90,5),
			<i>Pantoea</i> spp. 2 (%7,0),
			<i>Pantoea</i> spp. 4 (%2,1),
			<i>Cr. sakazakii</i> (%0,1)
			<i>K. pneumoniae</i> spp. pneumoniae (%50,8),
			<i>E. aerogenes</i> (%48,1),
			<i>E. cloacae</i> (%1,0)
			<i>Pantoea</i> spp.4, <i>Leclercia adecarboxylata</i> ,
			<i>Esc. vulneris</i>

Yapılan 15 klasik biyokimyasal testin ardından izole edilen 54 örneğin 48'i (%88,9) tanımlanabilmiştir. İzolatlardan 10 tanesi (%18,5) (J1, J3, JS2, JS3, MS1, MS2, MS3, N1, N2, N3) ise İngiltere Nottingham Trent University laboratuvarlarına ulaştırılmaları esnasında canlılıklarını kaybetmişlerdir.

NTU laboratuvarlarına ulaştığında canlılığını koruyabilmiş olan 44 adet izolattan 25'inin (%56,8) API 20E ve ID 32E hazır test kitlerinden edinilen birincil tanımlama sonuçları aynıken, yalnız 4 adet izolatin klasik biyokimyasal test ve API 20E uygulamalarına ait birincil tanımlama sonuçları örtüşmekte ve sadece 2 örneğin klasik biyokimyasal test ve ID 32E uygulamalarına ait birincil tanımlama sonuçları uyumluluk göstermektedir. Her üç yöntemden de elde edilen birincil tanımlama sonuçlarının aynı olduğu bir izolat görülmemiştir.

Iversen vd. (2004d) API 20E ve ID 32E'nin sahte negatif ve sahte pozitif sonuçlara yol açabildiğini belirtmesinin yanında Drudy vd. (2006) ID 32E ile 57 adet izolatin %98'ini doğru tanımlamışlardır. ID 32E üzerine yapılmış olan diğer bir çalışmada bu kit ile 118 adet *E. cloacae* izolatinin sadece %67,8'i doğru tanımlanabilmiştir (Andersen 1995). ID 32E'nin, yaygın olan izolatlar arasında, atipik veya alışılmadık karakteristik gösteren izolat gruplarına göre daha başarılı olduğunu rapor etmişlerdir (O'Hara ve Miller 1999). API 20E sonuçları hakkında rapor edilmiş en düşük tanımlama düzeyleri ise %85 dolaylarındadır (Altwegg vd. 1983, Rhoden vd. 1984).

VRBG agar üzerinden izole edilen 36 adet muhtemel *Enterobacter* suşundan 11'i (%30,5) bu klasik testler ile *E. agglomerans*, 3'ü (%8,3) *E. cloacae*, 2'si (%5,5) *E. intermedus*, 2'si (%5,5) *E. amnigenus*, 1'i (%2,7) *E. gergoviae*, 3'ü (%8,3) *Esc. coli*, 3'ü (%8,3) *Cl. amalon*, 2'si (%5,5) *Cl. freundii*, 1'i (%2,7) *K. pneumoniae*, 1'i (%2,7) *Sr. grimes*, 1'i (%2,7) *Sr. fonticola* olarak tanımlanırken 6'sı (%16,7) tanımlanamamıştır.

DFI agar üzerinden yapılan muhtemel *Cr. sakazakii* izolasyonunda elde edilen 18 adet suştan 10'u (%55,5) birincil olarak *E. cloacae* şeklinde tanımlanırken, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'ye (Brenner 1986) göre bu 10 örneğin *Cr. sakazakii* ve *E. dissolvens* olması da mümkündür. API 20E ve ID 32E sonuçlarına göre bu 10 adet

izolat *Cr. sakazakii* olarak tanımlanmıştır. *Cr. sakazakii* 1980 yılında Farmer vd. tarafından yeni bir tür olduğu ortaya çıkarılıp Japon mikrobiyolog Riichi Sakazakii'nin adı verilinceye kadar “sarı pigmentli *E. cloacae*” olarak da bilinmiştir (Muytjens vd. 1983).

Bu 18 adet izolattan diğer 8'i (%44,4) ise *E. agglomerans* olarak tanımlanmıştır. API 20E ve ID 32E hızlı test kitlerine göre bu örneklerden 2'si *Cr. sakazakii*'dir. Muytjens vd.'nin (1988) yaptığı bir çalışmada *E. agglomerans* olarak yapılan tanımlamalarda *E. agglomerans*'ın kimliğinin tam olarak belli olmadığı ve *E. agglomerans* ifadesinin hem *Pantoea* spp.'yi hem de *Escherichia vulneris*'i kapsadığı rapor edilmiştir (Janda ve Abbott 1998). *Pantoea* spp. de, *Esc. vulneris* de, DFI agar üzerinde mavi-yeşil koloniler oluşturmaktadır (Ivrsen vd. 2004c).

VRBG agar üzerinden elde edilen 36 adet izolattan 25'inin her iki test kiti ile tanımlanma sonuçları aynıdır. Bunlardan 10'u (%33,3) *Pantoea* spp., 9'u *Cr. sakazakii*, 2'si *Esc. coli*, 2'si *K. pneumoniae* spp., 1'i *E. aerogenes*, 1'i *E. vulneris* olarak tanımlanmışlardır.

API 20E sistemi ile 503 hayvansal *Enterobacteriaceae* izolatu üzerinde farklı laboratuvarlarda yapılan tanımlamalardan %83'ü uyum içerisindeyken %16'sı farklılık göstermiş ve %1'i ise API 20E ile tanımlanamamıştır. Bu farklı tanımlamalar öncelikli olarak *Klebsiella – Enterobacter* ve *Enterobacter – Esc. coli* arasında gözlemlenmiştir (Swanson ve Collins 1980).

Stoklanmış kültürlerde daha düşük doğru tanımlanma oranlarının görüldüğü ve bunun sebebinin stoklanan kültürlerin taze klinik izolatlardan daha düşük enzim aktivitesi gösterdiği belirtmiştir (Aldridge vd. 1978, Blazevic vd. 1979). Her ne kadar çalışmada izolatlarının enzim aktivitelerini arttırmak için ardarda birkaç kez aktifleştirme yapılmış ve aşılama miktarı tavsiye edilen miktara göre arttırılmış olsa da bu işlemlerin ne kadar işe yarar olduğu hususunda kesin bir bilgi verilememiştir (Holmes ve Humphry 1985).

4.3 Moleküler tekniklerle yapılan tanımlamaların sonuçları

4.3.1 Darbeli alan jel elektroforezi incelemesinin sonucu

XbaI ile gerçekleştirmiş olduğumuz PFGE uygulamasından sonra agaroz jellerin UV ışık altında fotoğrafları çekilmiş ve bu fotoğraflar Bionumerics yazılımı (Applied-Maths, Belçika) altında incelenmiştir. Yapılan inceleme sonucu Şekil 4.1’de yer almakta olan filogenetik ağaçta gösterilmiştir.

Son zamanlardaki çalışmalara (Coignar ve Vaillant 2006, Nazarowec-White ve Farber 1999) göre XbaI ve SpeI restriksiyon enzimlerinin *Cr. sakazakii*’nin PFGE genotiplemesinde benzer kümelenmeler göstermiş ve izolatların birbirlerinden kolayca ayrılmasını sağlayacak bantlar oluşmuştur. Proudly vd. (2007)’nin araştırmasında XbaI ve SpeI enzimlerinin benzer bant oluşumlarını sağladığı doğrulanmış ve SpeI enzimi ile daha kolay okunabilen bantların elde edildiği belirtilmiştir.

Moleküler yöntemler; antibiyogramlar ve API profillemelerinden daha ayırıcıdır (Van Nierop vd. 1998, Van Belkum 1996, Garaizar vd. 1991). Gıda mikrobiyolojisinde en yaygın kullanılan moleküler yöntemler kromozomal DNA restriksiyon analizi, plazmid typing, ribotyping, PFGE ve PZR temelli yöntemlerdir (Louws vd. 1994, Versalovic vd. 1991).

Townsend vd.’nin (2008a) çalışmasında Vitek (BioMérieux, Fransa) tarafından *Cr. sakazakii* olarak tanımlanmış 5 adet klinik izolata uygulanan PFGE analizi ile bunlardan 4’ünün (%80) *E. hormaechei-hormaechei*, 1’inin (%20) ise *E. hormaechei-steigerwaltii* olduğu belirlenmiştir.

İncelemeye alınan 44 adet izolattan M2, P2 ve JS1 kodlu olan 3 adedi (%6,8) fotoğraf üzerinde analiz için gerekli bant oluşumunu vermemişlerdir.

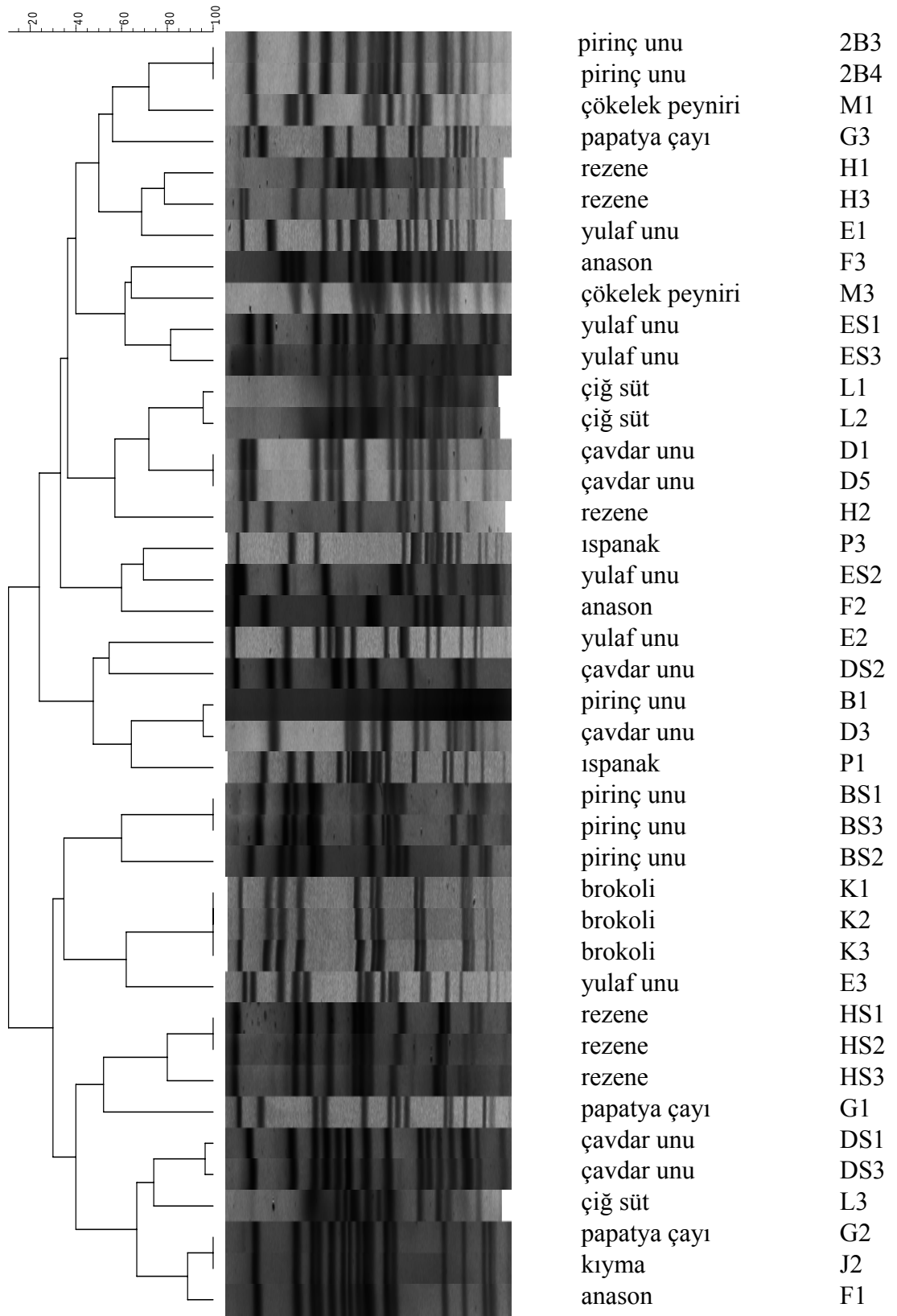
Şekil 4.1’de de açıkça görüldüğü gibi 2B3 ve 2B4; D1 ve D5; G2, F1 ve J2; K1, K2 ve K3; L1 ve L2; BS1 ve BS3; DS1 ve DS3; ES1 ve ES3; HS1, HS2 ve HS3 aynı genetiğe

sahiptir. Muhtemel *Cr. sakazakii* izolatlarının diğerk moleküler yöntemler ile tanımlanmasında, aynı genetiğı taşıyan izolatların kullanılmasına gerek olmadığından, bundan sonraki moleküler analiz yöntemlerine BS2, BS3, DS3, ES3, HS2 ve HS3 kodlu örnekler olmadan devam edilmiştir.

Yapılan analiz sonucu hem yulaf hem de çavdar unlarında 2 farklı genetiğı taşıyan muhtemel *Cr. sakazakii* izolatlarının olduğu saptanmıştır. Burada önemli olan nokta; tek bir gıda örneğinden aynı koloni morfolojisine sahip oldukları halde genetik olarak birbirlerinden farklı olan *Cr. sakazakii* suşlarının izole edilebilmiş olmasıdır.

Bu suşlardan DS1 ve DS2 arasındaki genetik farklılık DS1 kodlu izolatın diğerk moleküler tanımlama yöntemleriyle *Cr. universalis* olarak tanımlanması ile açığa kavuşturulurken, ES1 ve ES2 arasındaki genetik farklılığın iki farklı genetiğı taşıyan suş olmalarından mı yoksa ulaştırma ve muhafaza esnasında stres altında kalmalarından dolayı olası bir mutasyon sebebiyle mi olduğunun anlaşılabilmesi için daha fazla analizin yapılmasına ihtiyaç vardır.

Bir örnekten yapılacak izolasyonda hedef bakteri yerine farklı genetikteki herhangi bir *Cr. sakazakii* suşunun izole edilmesi muhtemel olduğundan, tipik kolonilerden mümkün olduğu kadar fazla izole edilmesi ve bunların hepsinin analize alınması sahte negatif sonuçların engellenmesi için alınacak önlemlerden biridir.



Şekil 4.1 PFGE analizinin biyonomerik yazılımıyla şematize edilmiş hali

4.3.2 Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları

Nair ve Venkitanarayanan (2006) yaptıkları çalışma sonucunda *Cr. sakazakii*'nin hızlı tanısında ompA-PZR yönteminin potansiyel bir araç olduğunu ve ompA primerinin türe özgül olduğunu belirlemişlerdir. Cawthron vd. (2008) *Cr. sakazakii* varlığının belirlenmesinde en kesin sonuç veren iki primer çiftini Esak2/Esak3 ve Esakf/Esakr olarak açıklamışlardır. Diğer bir çalışmada, ise El-Sharoud vd. (2009) *Cronobacter* türlerinin kendi aralarında ayırdedilmesi için recN geninin kullanılmasını önermişlerdir. Polat'ın (2008b) çalışmasında da *Cr. sakazakii* tanımlanmasında PZR yönteminden faydalanılmıştır.

Diğer yandan, GNB 24E (Microbact, İngiltere) ve ID 32 (BioMérieux, Fransa) hızlı test kitleri ile *E. cloacae* olarak (%99,9) tanımlanan 5 adet izolata PZR uygulanmış, *Cr. sakazakii* suşlarının tanımlanması için kullanılan ompA primeri, *E. cloacae* izolatlarına karşı negatif sonuç vermiştir (Townsend vd. 2008a). Ancak aynı araştırma ekibinin (2007) yapmış oldukları diğer bir çalışmada ompA primeri, NTU84 kodunu verdikleri *Cr. sakazakii* suşuna karşı da negatif sonuç verdiği için bu durum ompA primerinin *Cr. sakazakii* suşlarını her durumda saptayamadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Cawthron vd. (2008)'nin yılında yayınladıkları çalışmaya göre, 64 adet izolat içinden 13'ü (%21) 16S rRNA dizilim analizi ile *Cr. sakazakii* olarak tanımlanmıştır. Bu 64 adet izolattan 16 adedi (%25) Esak2/Esak3 primerleri ile pozitif sonuç verirken, 20 adedi (%31,2) ise Esakf/Esakr primerleri ile pozitif sonuç vermiştir. Aynı çalışmada *Cr. sakazakii* varlığının belirlenmesinde Esak2/Esak3 primer çifti %87 duyarlılık gösterdiği ifade edilirken, Esakf/Esakr primer çifti için bu rakamın %100 olduğu vurgulanmıştır. Her ne kadar *Cr. sakazakii* varlığının saptanmasında her iki çiftin de kesin sonuç verme oranı %90 olsa da, Esak2/Esak3 primer çiftinin (%94), Esakf/Esakr primer çiftinden (%90) türe karşı daha özgül olduğu açıklanmıştır.

Gösterdikleri duyarlılık bakımından 6 primer çifti içinde (Esakf/Esakr, EsAgf/EsAgr, SG-F/SG-R, SI-F/SI-R, Saka-1/Saka-2b) en düşük değeri gösteren %87 ile Esak2/Esak3 primer çifti olurken, bu primer çiftinin *Cr. sakazakii* varlığının saptanmasında en az sayıda sahte negatif sonucu verdiği de belirtilmiştir (Cawthron vd. 2008).

Cr. sakazakii'nin düşük yoğunluklardaki varlığı bile bağışıklığı yetersiz bireylerde çeşitli sağlık sorunlarına yol açtığından, bu organizmanın saptanmasında sahte negatif sonuçların alınmasını engelleyecek bir yöntemin geliştirilmesi çok önemlidir. Cawthron vd. (2008)'nin araştırmasında Esak2/Esak3 primer çiftinden sahte negatif sonuçların alındığı 3 adet izolatın *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp. ve *Acinetobacter* sp. olduğu rapor edilmiştir.

ARB yazılımında bulunan PROBE MATCH uygulamasının kullanımı sayesinde; "Keyser (Keyser 2003) Sistemi"nde yer alan primerlerden biri olan Esak2/Esak3 primer çiftinin, *Cr. sakazakii* ATCC 51329 suşunun 16S rRNA geni 3' ucunda 4 hatalı eşleşme gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu durum Esak2/Esak3 primer çiftinin *Cr. sakazakii* ATCC 51329 suşuna karşı neden negatif sonuç verdiğini ortaya koymuştur. Aynı çalışma sayesinde Keyser Esak2/Esak3 sisteminin; *E.cloacae*, *S. liquefaciens*, *S. fucaria*, *S. Enteritidis* gibi hedef olmayan suşlar ile sahte pozitif sonuçlar verebildiği de anlaşılmıştır (Lehner vd. 2004).

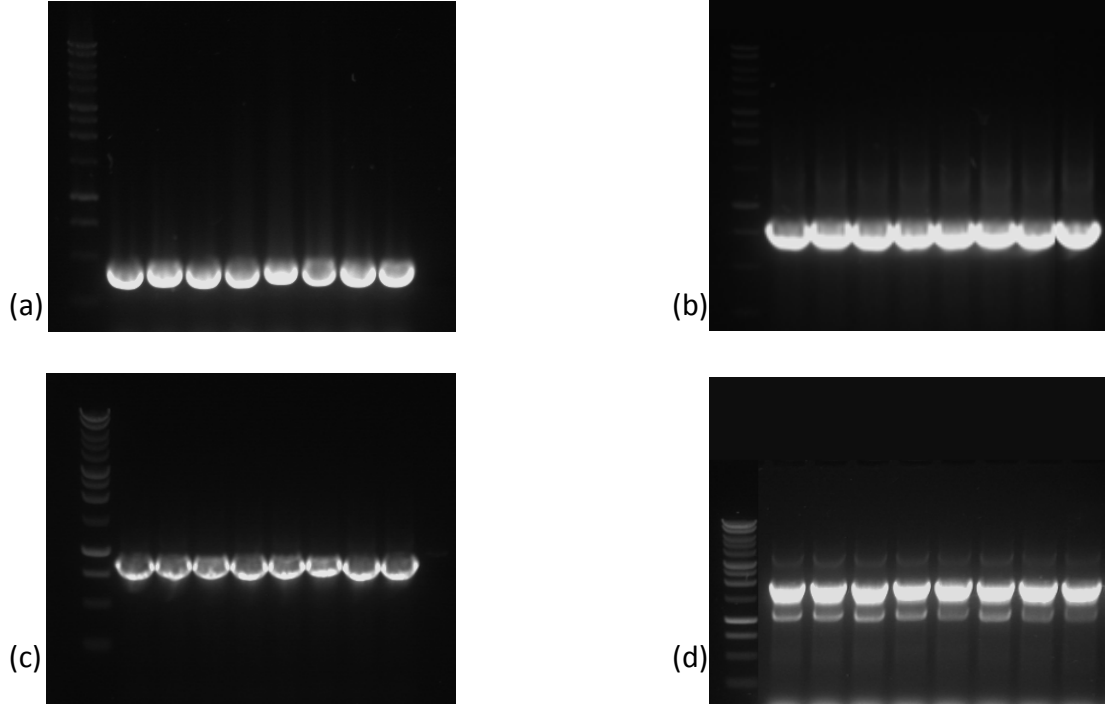
Cawthorn vd. (2008)'nin araştırmasında Esakf/Esakr primer çifti kullanılarak yapılan amplifikasyonda 5 adet sahte pozitif sonuç alındığı ve bu suşların gıda kaynaklı *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp., *Acinetobacter* sp. ve *E. cloacae* olduğu açıklanmıştır.

Healy vd. 2009 yılında yaptıkları çalışmada recN genini kullanarak 78 adet *Cronobacter* izolatının tamamını başarılı bir şekilde tanımladıklarını rapor etmişlerdir.

Enterobacteriaceae üyeleri arasındaki genetik ve fenotipik ilişki üzerine ışık tutulan bir çalışmada (Kuhnert vd. 2009) ise, recN geninin tek başına amplifiye edilmesinin oldukça etkili olduğu kanıtlanırken, *Cronobacter* izolatlarının türlerinin belirlenmesi konusunda recN geninin 16S rRNA dizilim analizine kıyasla daha yüksek ayırtedici güce sahip olduğu da ortaya çıkarılmıştır.

Çalışmada yukarıda söz edilen tüm primerler kullanılarak 7 adet muhtemel *Cronobacter sakazakii* suşu Çizelge 3.2'de açıklandığı gibi polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak incelenmişlerdir. Deneme sonuçlarını gösteren UV ışık altında çekilmiş fotoğraflar

Şekil 4.2’de verilmiştir. Herbir fotoğrafta da görüleceği gibi tüm muhtemel *Cr. sakazakii* izolatları, *Cr. sakazakii*’ye özgü oldukları bilinen 4 farklı PZR primerine karşı (ompA, Esak2 & Esak3, Esakf & Esakr ve recN-ES) pozitif sonuç vermiştir.



Şekil 4.2.a. OmpA, b. Esak2 & Esak3, c. Esakf & Esakr, d. RecN-ES primerleri kullanılarak gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda UV ışık altında çekilmiş fotoğraflar

4.3.3 Çoklu lokus dizilim tiplendirmesi sonuçları

Çalışmada, Çizelge 3.3’de belirtildiği gibi 7 farklı primer kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonları sonucunda elde edilen her PZR ürünün çoklu lokus dizilim tiplendirmesi incelenmiş ve ardından her izolat için atanan profil numaraları Çizelge 4.16’da verilmiştir. Bu numaralar, dünyanın farklı yerlerindeki örneklerden izole edilmiş birçok *Cr. sakazakii* izolatına ait profilleri de içeren bir veri tabanı olan http://pubmlst.org/perl/mlstdbnet/mlstdbnet.pl?file=cronobacter_isolates.xml&_page=browse adresinde yerini almış ve çalışmamız sayesinde veri tabanında izolatları olan ülkeler arasına ilk kez Türkiye’de katılmıştır.

Çizelge 4.16 PZR reaksiyonları ile elde edilen ürünlere çoklu lokus dizilim tiplendirmesi sonucunda verilmiş profil numaraları

ÖRNEK KODU	<i>atpD</i>	<i>fusA</i>	<i>glnS</i>	<i>gltB</i>	<i>gyrB</i>	<i>infB</i>	<i>pps</i>	DİZİLİM TİPİ (ST)
BS1	10	13	40	37	12	35	48	55
BS2	10	13	40	37	12	35	48	55
DS1	27	33	38	35	39	45	45	51
DS2	15	8	39	36	38	38	47	58
ES1	3	8	3	3	18	46	46	52
ES2	1	1	1	1	1	1	1	1
HS1	15	14	15	13	22	5	16	13

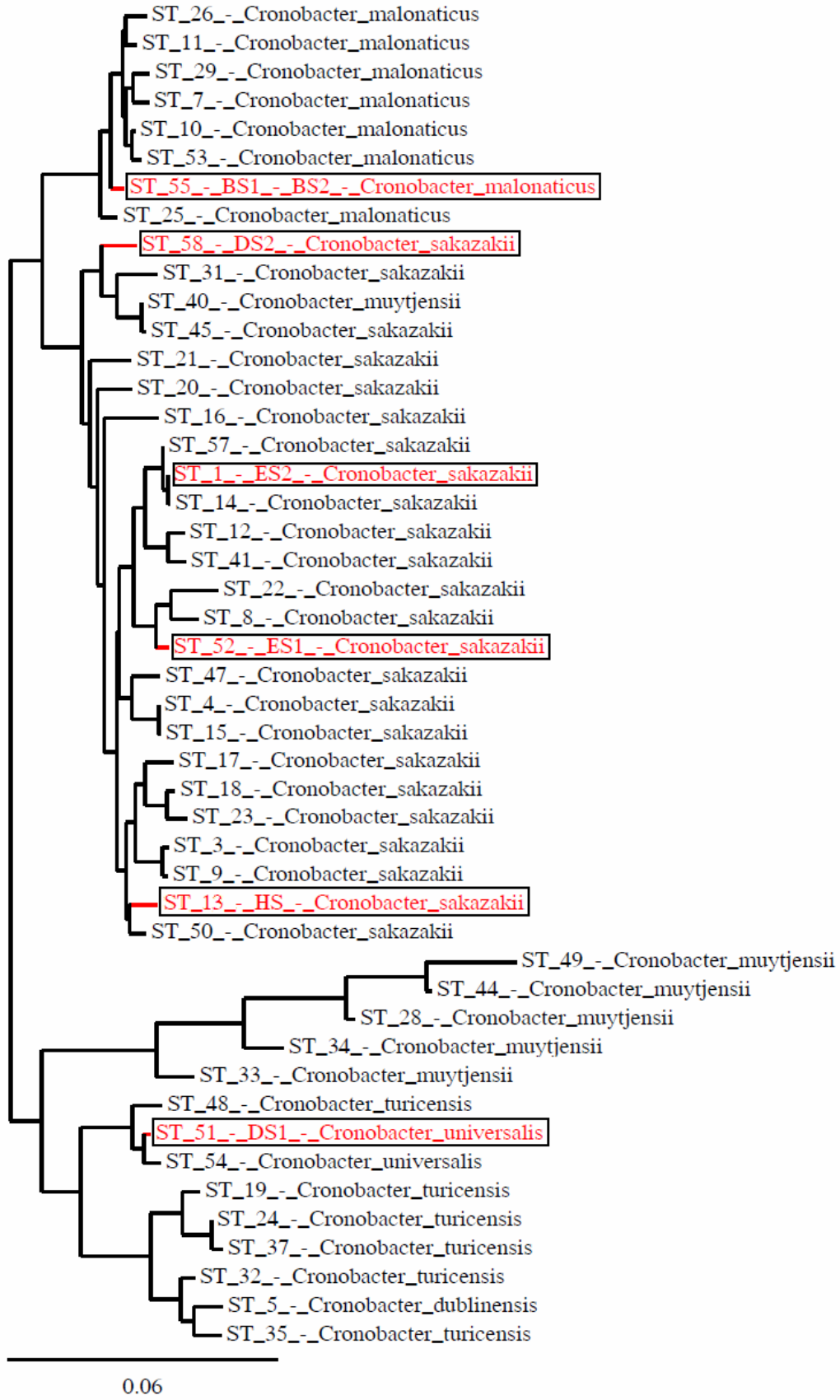
Her PZR ürünü için bu profil numaralarının karşılık geldiği dizilimler bilgi olarak EK-3'te verilmiştir.

Elde edilen profil numaralarının www.phylogeny.fr adresindeki yazılım aracılığı ile oluşturduğu filogenetik ağaç Şekil 4.3'te görülmektedir.

Yapılan bu analiz ile BS1 ve BS2 kodlu izolat *Cr. malonaticus*, DS1 kodlu izolat *Cr. universalis*, DS2, ES1, ES2 ve HS1 kodlu izolatlar da *Cr. sakazakii* olarak tanımlanmışlardır. PFGE analizi ile çizilen genetik ağaçta birbirinden farklı görünen BS1 ve BS2 kodlu izolatlar MLST'de aynı profil numaralarını vererek aynı genetik dizilime sahip olduklarını göstermişlerdir.

Şekil 4.3'deki filogenetik ağaçta *Cr. sakazakii* ve *Cr. malonaticus* arasındaki yakın genetik ilişki açıkça görülürken, *Cr. sakazakii* ve yeni bir tür olan ve adını “universal” kelimesinden alan *Cr. universalis* arasındaki mesafe de dikkate değerdir.

DS1 kodlu izolatın MLST ile *Cr. universalis* olarak tanımlanmasının ardından bu suşumuz, Nottingham Trent University'de yapılan çalışmalarda kullanılmış ve *Cr. universalis* üzerine yazılan ilk makalede (Joseph vd. 2011) yerini almıştır.



Şekil 4.3 MLST sonucuna göre elde edilen filogenetik ağaç

4.3.4 16S rRNA Dizilim Analizinin Sonuçları

16S rRNA geni; yüksek oranda korunması, her organizmada bulunması ve dizilimde değişken kısımları içermesinden dolayı hedef gen olarak yaygın şekilde kullanılmakta ve bu gen üzerine geliştirilmiş genetik yöntemler bakterinin karakterizasyonu ve tanımlanması için standart yöntemler olarak kabul edilmektedir (Kolbert ve Persing 1999, Woo vd. 2003).

16S rRNA genindeki değişken kısımlar, türler ve cinsler arasında ayırım için kullanılmaktadır. Bu konu ile ilgili gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Bentley ve Leigh 1995, Monstein vd. 1996, Monstein vd. 2001, Bertilsson vd. 2002, Tärnberg vd. 2002).

Townsend vd. (2008a)'nın kültür koleksiyonlarında yer alan ve daha önce fenotipleme ile *Cr. sakazakii* olarak tanımlanan suşlara uygulanan 16S rRNA dizilim analizi sonucunda, bunlardan 7 adedinin aslında *E. hormaechei* olduğu saptanmıştır.

Cawthorn vd. (2008) 'nin araştırmasında ise bebek gıdaları ve üretim alanlarından izole edilen 64 adet suşa ait 16S rRNA dizilim analizi sonuçlarına bakıldığında, bunlardan 54'ünün (%81) *Enterobacter* sp., 13'ünün (%20) de *Cr. sakazakii* olduğu görülmüştür.

Bu zamana kadar bilinen tipik *Cronobacter* suşlarına ait 16S rRNA dizilimleri aşağıdaki gibidir.

>*Cronobacter-sakazakii*

```
TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACA
TGCAAGTCGAACGGTAACAGGGAGCAGCTTGCTGCTCTGCTGACGAGTGGC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
GGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCT
TCGGGCCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGG
GTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAG
CCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
```

GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAA
GAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGT
TAATAACCrCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTA

>*Cronobacter-malonatucus*

ACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGrGAGCAGCTTGCTGCTCTGCTGACGA
GTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAA
CTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGTGGGG
GACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAG
GTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATG
ACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT
ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTT
GTGGTTAATAACCrCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA

>*Crobobacter-turicensis*

TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACA
TGCAAGTCGAACGGTAACAGAGAGCAGCTTGCTGCTCTGCTGACGAGTGGC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
GGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGTGGGGGACCT
TCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGG
GTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAG
CCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAA
GAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGRTTGTGGT
TAATAACCGCAGTCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC
GTGCCAGCAGCCGCGGTA

>*Cronobacter-muytjensii*

TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACA
TGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
GGAAACGGTAGCTAATAACCGCATAACGTGCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCT
TCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGG
GTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAG
CCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAA
GAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGGGTAAAGGT
TAATAACCTTGGyCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTA

>*Cronobacter-dublinensis*

TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACA
TGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCCGGGTGACGAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGG
AAACGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGTGGGGGACCTTC
GGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGT
AAAGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC
ACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAG
AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGTTGTGGTT
AATAACCACAGCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTA

>*Cronobacter-universalis*

TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACA
TGCAAGTCGAACGGTAACAGAGAGCAGCTTGCTGCTCTGCTGACGAGTGGC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
GGAAACGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGTGGGGGACCT
TCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGG

GTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAG
CCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAA
GAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGATTGTGGT
TAATAACCrCAGTCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTA

Araştırmamız kapsamında Accugenix (A.B.D.) firmasına yollamış olduğumuz BS1, BS2, DS1, DS2, ES1, ES2, HS1 kodlu izolatların 16S rRNA dizilimleri ise aşağıda belirtildiği şekildedir.

>BS1

GGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACC
GCATAACGTCTTCGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAG
ATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCG
ACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTCTGAGACA
CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG
CAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA
AGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTGTGGTTAATAACCGCAGCGATTGA
CGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGNNCCGCGGTA

>BS2

GGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACC
GCATAACGTCTTCGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAG
ATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCG
ACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTCTGAGACA
CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG
CAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA
AGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTGTGGTTAATAACCGCAGCGATTGA
CGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGCGGTA

>DS1

TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACA
TGCAAGTCGAACGGTAACAGGGAGCAGCTTGCTGCTCTGCTGACGAGTGGC

GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
GGAAACGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGTGGGGGACCT
TCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGG
GTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAG
CCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAA
GAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGATTGTGGT
TAATAACCRCAAGTCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC
GTGCCAGCAGCCGCGGTA

>DS2

TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACA
TGCAAGTCGAACGGTAACAGGGAGCAGCTTGCTGCTCTGCTGACGAGTGGC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
GGAAACGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCT
TCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGG
GTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAG
CCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAA
GAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGT
TAATAACCACAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC
GTGCCAGCAGCCGCGGTA

>ES1

TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACA
TGCAAGTCGAACGGTAACAGGGAGCAGCTTGCTGCTCTGCTGACGAGTGGC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
GGAAACGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCT
TCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGG
GTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAG
CCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAA
GAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTGTGGT

TAATAACCACAGCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC
GTGCCAGCAGCCGCGGTA

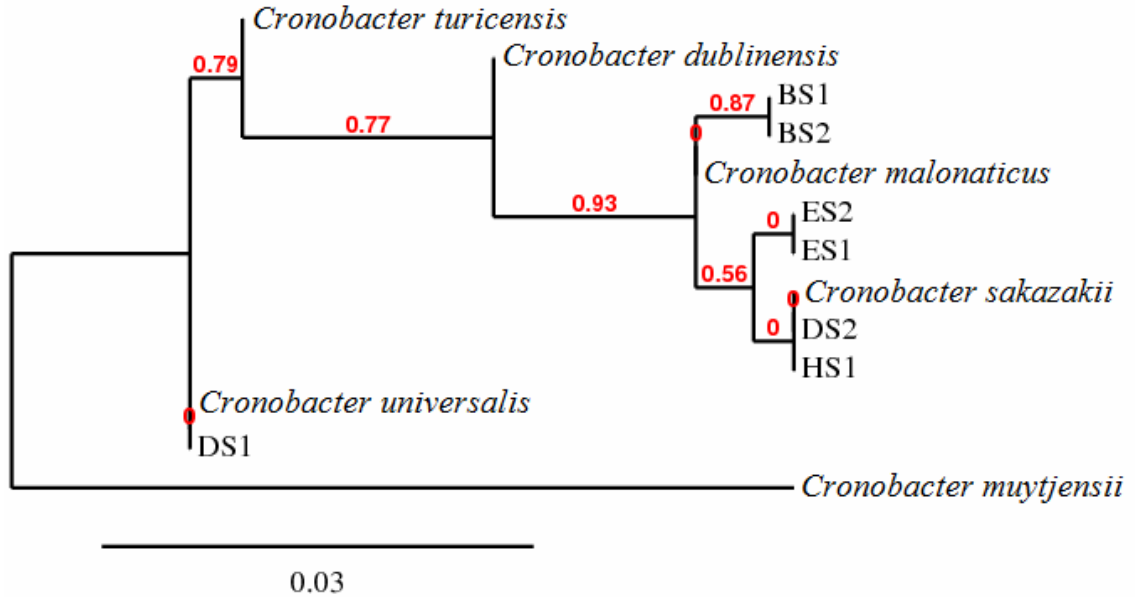
>ES2

TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACA
TGCAAGTCGAACGGTAACAGGGAGCAGCTTGCTGCTCTGCTGACGAGTGGC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
GGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCT
TCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGG
GTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAG
CCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAA
GAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTGTGGT
TAATAACCRACAGCRATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC
GTGCCAGCAGCCGCGGTA

>HS1

GGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACC
GCATAACGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAG
ATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCG
ACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACA
CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG
CAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA
AGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGYGTTGTGGTTAATAACCRACAGCRATTGA
CGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGNNCCGCGGTA

Elde edilen dizilimlerin www.phylogeny.fr adresindeki yazılıma yüklenerek incelenmesi sonucunda ortaya çıkan filogenetik ağaç Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4 Muhtemel *Cr. sakazakii* olarak tanımlanan örneklerin 16S rRNA dizilimlerinin analizi sonucu elde edilen filogenetik ağaç

Şekil 4.4'te de görüldüğü üzere 16S rRNA dizilim analizi sonuçları, MLST sonuçları ile uyumluluk içindedirler. BS1 ve BS2 kodlu izolatlar *Cr. malonaticus*, ES1, ES2, DS2, HS1 kodlular *Cr. sakazakii* ve filogenetik ağaçta diğer izolatlardan daha uzak bir konumda yer alan DS1 kodlu izolat da *Cr. universalis* olarak tanımlanmıştır.

4.3.5 Matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyonu - uçuş süresi kütle spektrometresi incelemesinin sonuçları

Bakterilere ait protein kütlesi örneklerinin saptanması, son zamanlarda bakterilerin hızlı analizi için uygun bir araç haline gelmiştir (Freiwald ve Sauer 2009).

Bakteriden aktarılan proteinlerin profillerinin analizine dayanmakta olan MALDI-TOF MS, çok sayıda rastgele molekülü etkili şekilde saptayabilir. Protein kütlesi örnekleri bakterinin cins, tür, hatta bazı durumlarda alt tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılabilir (Stephan vd. 2010).

Kütle örneğini saptama yöntemi, gıda kaynaklı patojenler üzerine son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda kullanılmıştır (Carbonelle vd. 2007, Barbuddhe vd. 2008,

Dieckmann vd. 2008, Grosse-Herrenthey vd. 2008, Hazen vd. 2009, Yang vd. 2009, Alispahic vd. 2010, Sauer ve Kliem 2010)

Stephan vd. (2010)'nin yaptıkları çalışmada, yakın zamanda tanımlanan 6 adet *Cronobacter* türünün hızlı tanısı için MALDI-TOF MS yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla 54 adet hedef *Cronobacter* suşu ve 17 adet hedef olmayan suşlara ait bir referans kütle spektrometrometresi veritabanı oluşturmuşlardır. Yaptıkları bu araştırma sonucunda *Cronobacter* suşlarının cins ve tür düzeyinde tanımlanmasında MALDI-TOF MS'nin güvenilir ve güçlü bir araç olduğunu belirtmişlerdir.

MALDI-TOF MS ile tanımlama yapılması için Accugenix (A.B.D.) firmasına göndermiş olduğumuz izolatlardan BS1, BS2 ve HS1 kodlu olanlar tanımlanamazken; DS2, ES1, ES2 ve diğer moleküler yöntemler (MLST, 16S rRNA dizilim analizi) ile *Cr. universalis* olarak tanımlanan DS1 kodlu izolat *Cr. sakazakii* olarak tanımlanmıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

- DFI agardan izole edilen 18 adet muhtemel *Cr. sakazakii* suşuna uygulanan 15 klasik biyokimyasal test ile bu suşların 10 adedinin birincil tanımlama sonucu *E. cloacae*, 8 adedinin tanımlama sonucu *E. agglomerans* olarak bulunmuştur. Diğer yöntemlerle *Cr. sakazakii* olarak tanımlanan bu izolatların klasik biyokimyasal testler ile *E. cloacae* olarak tanımlanması ilk zamanlarda “sarı pigmentli *E. cloacae*” olarak bilinen (Muytjens vd. 1983) *Cr. sakazakii* ve *E. cloacae* arasındaki benzerlikten kaynaklandığı düşünülmektedir.
- Klasik biyokimyasal testlerle *E. agglomerans* olarak tanımlanan ve NTU laboratuvarlarına ulaştırılmaları esnasında diğer yöntemlerle tanımlanamayan JS1, JS2, JS3, MS1, MS2, MS3 kodlu izolatların *Cr. sakazakii* olmaması da olası bir sonuçtur. Çünkü *E. agglomerans* tanımı net bir ifade değildir. Daha sonra bu tür *Esc. vulneris* ve *Pantoea agglomerans* olarak ikiye bölünmüştür (Janda ve Abbott 1998). Bunula birlikte hem *Esc. vulneris* hem de *Pantoea agglomerans* DFI agar üzerinde mavi-yeşil koloni oluşturabilmektedir (Iversen vd. 2004c).
- 44 adet izolatın hızlı test kitleri ile tanımlanması için kullanılmış olan API 20 E ve ID 32 E test kitlerinin birincil tanımlama sonuçları arasında %56,8 oranında uyum olsa da, birincil tanımlama sonuçlarının hem klasik hem de her iki hızlı biyokimyasal test kitinde aynı olduğu herhangi bir izolata rastlanmamıştır.
- ID 32E test kiti ile tanımlanan 12 muhtemel *Cr. sakazakii* izolatının %100’ü *Cr. sakazakii* olarak tanımlanırken, API 20E ile tanımlanan bu suşların %75’i *Cr. sakazakii*, %25’i ise *E. cloacae* olarak tanımlanmışlardır.
- Yapılan araştırmada %25 daha fazla doğru tanımlama sonucu vermesi ve daha fazla sayıda test içermesi (ID 32E 32 adet, API 20E 20 adet test içerir) sebebi ile ID 32E’nin API 20E’den daha güvenilir olduğunu kanısına varılmıştır. Klasik biyokimyasal testler ise hem uzun zaman alması hem de doğru tanımlama oranının ID 32E’den daha düşük olması sebebi ile tavsiye edilmemektedir.
- XbaI enziminin kullanıldığı PFGE ile suşların %93,2’sinin filogenetik analizi yapılabilmiş ve filogenetik ağaçta 28 farklı genetik yapı görülmüştür. Bu yöntem,

MLST ve 16S rRNA dizilim analizleri ile aynı genetik dizilime sahip olduğu anlaşılan BS1 ve BS2 kodlu izolatların arasında genetik mesafe olduğunu göstererek yöntemde hata payının olabileceğini ortaya koymuştur. Çeşitli amaçlar için PFGE yöntemi ile filogenetik ilişki üzerine herhangi bir sonuç vermeden önce, çizilmiş olan filogenetik ağaçla beraber bant oluşumlarının da mutlaka incelenmesi yararlı olacaktır.

- Darbeli alan jel elektroforezi ile sonuçlar MLST ve 16S rRNA dizilim analizlerinden daha kısa sürede alınmıştır. Bununla birlikte PFGE sistemi birçok laboratuvara da kurulabilir. Bu sebeplerden dolayı salgın araştırmaları gibi zamanın ve sonuçlarda kesinliğin önemli olduğu durumlarda deneyimli personel tarafından darbeli alan jel elektroforezinin kullanılması uygun olacaktır.
- Yulaf unundan iki farklı genetikte *Cr. sakazakii* suşunun ve çavdar unundan iki farklı *Cronobacter* türünün izole edilmiş olması ve tüm bu izolatların koloni morfolojilerinin ve hızlı test kitleri ile elde edilen tanımlama sonuçlarının aynı olması sebebi ile yapılan araştırmalarda –özellikle belli bir türün aranmakta olduğu salgın araştırmalarında- hedef organizmaya ait tipik kolonilerden mümkün olduğunca fazla izole edilmesi ve bunların analize alınması sahte negatif sonuçların engellenmesi açısından çok önemlidir.
- DFI agar üzerinde oluşturduğu tipik koloniler ile *Cr. sakazakii* olduğu düşünülen suşlara uygulanan PZR ve MALDI-TOF MS aracılığıyla, bu izolatlar *Cr. sakazakii* olarak doğrulanmış olsa da; MLST ve 16S rRNA dizilim analizi ile bu örneklerden 2'si (BS1 ve BS2) *Cr. malonaticus*, 1'i (DS1) ise *Cr. universalis* olarak tanımlanmıştır. PZR ve MALDI-TOF MS tavsiye edilen hızlı yöntemler olmalarına rağmen, yöntemlerin kullanılmasının ardından ortaya çıkan tür düzeyindeki farklı sonuçlar göz önüne alındığında, zaman ve laboratuvar imkanları elverişli olduğu sürece bu yöntemler yerine nükleik asit dizilimlenmesi temeline dayanan MLST ve 16S rRNA dizilim analizi tercih edilebilir.

KAYNAKLAR

- Albert, M.J., Faruque, S.M., Ansaruzzaman, M., Islam, M.M., Haider, K., Alam, K., Kabir, I. and Robins-Browne, R. 1992. Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Esc. coli* and *Hafnia alvei*. *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 37, pp. 310–314.
- Alispahic, M., Hummel, K., Jandreski-Cvetkovic, D., Nöbauer, K., Razzazi-Fazeli, E., Hess, M. and Hess, C. 2010. Species specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight spectrometry analysis. *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 59, pp. 295–301.
- Aldridge, K.E., Gardener, B.B., Clark, S.J. and Matsen, J.M. 1978. Comparison of Micro-ID, API 20E, and conventional media systems in identification of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 7, pp. 507-13.
- Altwegg, M. 1983. Performance of two four-hour identification systems with atypical strains of *Enterobacteriaceae*. *European Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 2, pp. 529-33.
- Andersen, B.M. 1995. Biochemical profiles and serotypes of nosocomial *E. cloacae* strains in Northern Norway: biochemical identification problems with commercial test systems. *Infection*, Vol. 23(6), pp. 339-43.
- Anonim 2010. Web Sitesi: www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2009-6.html, 2010.
- Anonymous 1977. Microbiological specifications for foods. Report of the second joint FAO/WHO expert consultation. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.
- Anonymous 1997. Centers for Disease Control. National nosocomial infection study report: annual summary 1975. Atlanta, Centers for Disease Control.
- Anonymous 1984. Centers for Disease Control Nosocomial infection surveillance. *CDC Surveillance Summaries*, Vol. 33, pp. 17-29.

- Anonymous 2002. Food and Drug Administration. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula. <http://cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>
- Anonymous 2004. Centers for Disease Control. One-day (24-48h) standarsized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by PFGE Center for Disease Control and Prevention. http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf
- Anonymous 2004. Joint FAO-WHO workshop of *E. sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Geneva, 2–5 February 2004. Online report: <http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/feb2004/en/>
- Anonymous 2005. Commission regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2005/1_338/1_33820051222en00010026.pdf.
- Anonymous 2010. Web Sitesi: http://en.wikipedia.org/wiki/Matrix-assisted_laser_desorption/ionization, 2010.
- Anonymous 2010. Web Sitesi: <http://www.mlst.net>, 2010.
- Ayhan, K. 2010. Gıda Mikrobiyolojisi I Ders Notları. Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü. Basılmamış.
- Baldwin, A., Loughlin, M., Caubilla-Barron, J., Kucerova, E., Manning, G., Dowson, C. and Forsythe, S. 2009. Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes. *BMC Microbiology*, Vol. 9, pp. 223.
- Barbuddhe, S. B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T. and Hain, T. 2008. Rapid identification and typing of *Listeria* species by MALDI-TOF MS. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 74, pp. 5402–5407.
- Barron, J.C. and Forsythe, S.J. 2007. Dry stress and survival time of *E. sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. *Journal of Food Protection*, Vol. 70(9), pp. 2111–2117.

- Bentley, R.W. and Leigh, J.A. 1995. Development of PCR-based hybridization protocol for identification of streptococcal species. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 33, pp. 1296–1301.
- Bertilsson, S., Cavanaugh, C.M. and Polz, M.F. 2002. Sequencing-independent method to generate oligonucleotide probes targeting a variable region in bacterial 16S rRNA by PCR with detachable primers. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 6, pp. 6077–6086.
- Blazevic, D.J., Mackay, D.L. and Warwood, N.M. 1979. Comparison of Micro-ID and API 20E systems for identification of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 9, pp. 605-8.
- Bowen, A.B. and Braden, C.R., 2006. Invasive *E. sakazakii* in infants. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 12, pp. 1185–1189.
- Brenner, D.J. 1986. Section 5: Family 1. *Enterobacteriaceae*. In N. R. Krieg & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: The Williams & Wilkins.
- Cabassi, C.S., Taddei, S., Predari, G., Galvani, G., Ghidini, F., Schiano, E. and Cavarani, S., 2004. Bacteriologic findings in ostrich (*Struthio camelus*) eggs from farms with reproductive failures. *Avian Diseases*, Vol. 48, pp. 716–722.
- Carbonnelle, E., Beretti, J. L., Cottyn, S., Quesne, G., Berche, P., Nassif, X. and Ferroni, A. 2007. Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by MALDI-TOF MS. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 45, pp. 2156–2161.
- Cawthorn, D.M., Botha, S. and Witthuhn, R.C. 2008. Evaluation of different methods for the detection and identification of *E. sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 127, pp. 129-138.
- Coignard, B., Vaillant, Vincent, J.P., Lefléche, A., Mariani-Kurkdjian, P., Bernet, C., L'Héritau, F., Sénéchal, H., Grimont, P., Bingen, E. and Desenclos, J.C. 2006. Infections sévères à *E. sakazakii* chez des nouveau-nés ayant consommé une préparation en poudre pour nourrissons, France. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, Vol 2–3, pp. 10–13.

- Dieckmann, R., Helmuth, R., Erhard, M. and Malorny, B. 2008. Rapid classification and identification of *Salmonella* at the species and subspecies levels by whole-cell MALDI-TOF MS. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 74, pp. 7767–7778.
- Dümen, E. 2010. *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*): Only An Infant Problem? *Kafkas Universitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, Vol. 16, 171-178 s.
- Drosinos, E. H. and Board, R. G. 1995. Attributes of microbial as sociations of meat growing as xenic batch cultures in a meat juice at 48°C. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 26, pp. 279–293.
- Drudy, D., O'Rourke, M., Murphy, M., Mullane, N. R., O'Mahony, R., Kelly, L., Fischer, M., Sanjaq, S., Shannon, P., Wall, P., O'Mahony, M., Whyte and P., Fanning, S. 2006. Characterization of a collection of *E. sakazakii* isolates from environmental and food sources. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 110, pp. 127-134.
- Eickhoff, P. R. and Ewing, W. H. 1966. Identification of *Enterobacteriaceae*. Minneapolis Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- El-Sharoud, W.M., O'Brien, S., Negredo, C., Iversen, C., Healy, F. and Healy, B. 2009. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. *BMC Microbiology*, Vol. 9, pp. 24.
- Farmer, J. J., Asbury, M. A., Hickman, F. W. and Brenner, D. J. 1980. *E. sakazakii*: a new species of “*Enterobacteriaceae*” isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 30, pp. 569–584.
- Forsythe, S. J. 2005. *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula. *Maternal and Child Nutrition*, Vol. 1, pp. 44–50.
- Frankel, G., Candy, D.C., Everest, P. and Dougan, G., 1994. Characterization of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infective Immunology*, Vol. 62, pp. 1835–1842.
- Freiwald, A. and Sauer, S. 2009. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocol*, Vol. 4, pp. 732–742.

- Garaizar, J., Kaufmann, and M.E., Pitt, T. L. 1991. Comparison of ribotyping with conventional methods for the type identification of *Enterobacter cloacae*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 29, pp. 1303–1307.
- Gassem, M.A.A. 1999. Study of the microorganisms associated with the fermented bread (Khamir) product produced from sorghum in Gizan region, Saudi Arabia. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 86, pp. 221–225.
- Gassem, M.A.A. 2002. A microbiological study on sorbia: A fermented beverage in the western province of Saudi Arabia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 18, pp. 173-177.
- Gökmen, M., Tekinşen, K.K. and Gürbüz, Ü. 2010. Presence of *Enterobacter sakazakii* in milk powder, whey powder and cheese produced in Konya. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, Vol. 16, pp. 163-166.
- Grosse-Herrenthey, A., Maier, T., Gessler, F., Schaumann, R., Böhnelt, H., Kostrzewa, M. and Krüger, M. 2008. Challenging the problem of clostridial identification with MALDI-TOF MS. *Anaerobe*, Vol. 14, pp. 242–249.
- Gültekin, M. ve Demirel, N. N. 2006. Hazır bebek mamaları ve *E. sakazakii*. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, Vol. 36(1), 67-74 s.
- Gümüş, T., Velioğlu, S.D., Arıcı ve M. 2008. Bebek Mamalarında *Enterobacter sakazakii* Riski. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- Hazen, T. H., Martinez, R. J., Chen, Y., Lafon, P. C., Garrett, N. M., Parsons, M. B., Bopp, C. A., Sullards, M. C. and Sobecky, P. A. 2009. Rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 75, pp. 6745–6756.
- Healy, B., Huynh, S., Mullane, N., O'Brien, S., Iversen, C., Lehner, A., Stephan, R., Parker and C.T., Fanning, S. 2009. Microarray-based comparative genomic indexing of the *Cronobacter* genus (*Enterobacter sakazakii*). *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 136, pp. 159–164.

- Holmes, B. and Humphry, P.S. 1985. Four hour identification of *Enterobacteriaceae* with the API Rapid 20E and Micro-ID systems. *Journal of Clinical Pathology*, Vol. 38, pp. 1132-1138.
- Iversen, C. and Forsythe, S.J. 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 14, pp. 443–454.
- Iversen, C. and Forsythe S.J. 2004a. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiology*, Vol. 21, pp. 771–776.
- Iversen, C., Lane, M. and Forsythe, S. J. 2004b. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 38, pp. 378–382.
- Iversen, C., Druggan, P. and Forsythe, S. 2004c. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 96(2), pp. 133-139.
- Iversen, C., Dale, H., Druggan, P., Waddington, M., Crawford, J. and Forsythe, S.J. 2004d. The identification of *Enterobacter sakazakii* using partial 16S rRNA sequencing and biochemical techniques. Özet 037. 104th General Meeting of American Society of Microbiology, Washington, DC.
- Iversen, C., Lehner, A. and Mullane, N. 2007. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *C. sakazakii* comb. nov. *C. sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *C. sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *C. turicensis* sp. nov., *C. muytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. *BMC Evolutionary Biology*, Vol. 7, pp. 64.
- Janda, J.M. and Abbott, S.L. 1998. The genus *Enterobacter*. In: *The Enterobacteria*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, pp. 148–177.
- Jarvis, C. 2005. New Investigator Award, Blue Ribbon Abstract Award: Fatal *E. sakazakii* infection associated with powdered infant formula in a neonatal intensive care unit in New Zealand. *American Journal of Infection Control*, Vol. 33(5), pp. 19.

- Joseph, S., Cetinkaya, E., Drahovska, H., Levican, A., Figueras, M. and Forsythe, S. 2011. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat and *Cronobacter universalis* sp. nov., a novel species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from water, and food ingredients. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Basimda).
- Keyser, M., Witthuhn, R.C., Ronquest, L.C. and Britz, T.J. 2003. Treatment of winery effluent with upflow anaerobic sludge blanket (UASB)-granular sludges enriched with *Enterobacter sakazakii*. *Biotechnology Letters*, Vol. 25, pp. 1893–1898.
- Kolbert, C.P. and Persing, D.H. 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 2, pp. 299-305.
- Kucerova, E., Clifton, S. W., Xia, X., Long, F. and Porwollik, S. 2010. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. *PLoS ONE*, Vol. 5(3), pp. 95-56.
- Kuhnert, P., Korczak, B.M., Stephan, R, Joosten, H. and Iversen, C. 2009. Phylogeny and prediction of genetic similarity of *Cronobacter* and related taxa by multilocus sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 136, pp. 152–158.
- Leclerc, H., Mossel, D.A.A., Edberg, S.C. and Struijk, C. B. 2001. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 55, pp. 201–234.
- Leclercq, A., Wanequ, C. and Baylac, P. 2002. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, pp. 1631–1638.
- Lehner, A., Tasara, T. and Stephan, R. 2004. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. *BMC Microbiology*, Vol. 4, pp. 43.
- Lindberg, A.M., Ljungh, Å., Åhrné, S., Löfdahl, S. and Molina, G. 1998. *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 39, pp. 11–17.

- Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and de Bruijn, F.J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas pathovars* and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 60, pp. 2286–2295.
- Lund, A. M., Mostert, J. F., Carelsen, M. A. and Lategan, B. 1992. Proteolytic and lipolytic psychrotrophic *Enterobacteriaceae* in pasteurised milk and dairy products. *South Africa Journal of Dairy Science*, Vol. 24, pp. 7–10.
- Miranda, J.M., Guarddon, M., Vázquez, B.I., Fente, C.A., Barros-Velázquez, J., Cepeda, A. and Franco, C.M. 2008. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* strains isolated from organic chicken, conventional chicken and conventional turkey meat: A comparative survey. *Food Control*, Vol. 19, pp. 412–416.
- Molin, G. and Stenström, I.-M. 1984. Effect of temperature on the microbial flora of herring fillets in air or carbon dioxide. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 56, pp. 275–282.
- Monstein, H.J., Kihlstrom, E. and Tiveljung, A. 1996. Detection and identification of bacteria using in-house broad range 16S rRNA gene PCR amplification and genus-specific DNA hybridization probes, located within variable regions of 16S rRNA genes. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, Vol. 104, pp. 451–458.
- Monstein, H.J., Nikpour Badr, S. and Jonasson, J. 2001. Rapid molecular identification and subtyping of *Hafnia pylori* by pyrosequencing of the 16S rDNA variable V1 and V3 regions. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 199, pp. 103–107.
- Muytjens, H.L., Zanen, H.C., Sonderkamp, H.J., Kollée, L.A., Wachsmuth, I.K. and Farmer, J.J. 1983. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 18, pp. 115–120.
- Muytjens, H.L., Roelofs-Willemse, H. and Jaspar, G.H.J. 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 26(4), pp. 743-746.
- Nair, M.K.M. and Vankitanarayanan, K. S. 2006. Cloning and sequencing of the *ompA* gene of *E. sakazakii* and development of an *ompA*-targeted PCR for rapid detection of *E.*

- sakazakii* in infant formula. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72(4), pp. 2539-2546.
- Nazarowec-White, M. and Farber, J.M. 1999 Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *E. sakazakii*. *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 48, pp. 559–567.
- O’Hara C. M. and Miller, M. 1999. Evaluation of the ID 32E for the detection of Gram negative glucose fermenting and glucose non fermenting bacilli. *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 5, pp. 277-281.
- Olsson, C., Ahrné, S., Pettersson, B. and Molin, G. 2004. DNA Based Classification of Food Associated *Enterobacteriaceae* Previously Identified by Biolog GN Microplates. *Systematic Applied Microbiology*, Vol. 27, pp. 219-228.
- Paterson, D.L. 2006. Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Medicine*, Vol. 119, pp. 520–528.
- Polat, G. ve Halkman, A.K. 2007. Bebek mamalarında *E. sakazakii* ve önemi. *Gıda* Vol. 32(3), 151-161 s.
- Polat, G. ve Halkman, A.K. 2008a. Bebek maması ve bileşenlerinin *E. sakazakii* varlığı açısından incelenmesi. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- Polat, G. ve Halkman, A.K. 2008b. Development and application of PCR based method for the rapid detection of *E. sakazakii* in infant formula. *1st International Congress on Food Technology*, November 3-6, 2010 Antalya
- Proudy, D., Coton, B.E., Coton, M., Leclercq, R. ve Vergnaud M. 2007 Genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* isolates by PFGE, BOX-PCR and sequencing of the *fliC* gene. *Journal of Applied Microbiology*, 1364-5072 s.
- Rhoden, D.L., Esaias, A.O. and Smith, P.B. 1984. Evaluation of the DMS Rapid E system for the identification of *Enterobacteriaceae* strains. *Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology*, pp. 241.
- Ridell, J., Siitonen, A., Paulin, L., Mattila, L., Korkeala, H. and Albert, M.J., 1994. *Hafnia alvei* in stool specimens from patients with diarrhoea and healthy controls. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 32, pp. 2335–2337.

- Sauer, S. and Kliem, M. 2010. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 8, pp. 74–82.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.E., Rolain, J.M. and Raoult, D. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by MALDI-TOF MS. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 49(4), pp. 552–3.
- Skaldal, P., Mascini, M., Sal Vadori, C. and Zannoni, G. 1993. Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk using an L-Lactate biosensor. *Enzyme Microbiology and Technology*, Vol. 15, pp. 508–512.
- Stephan, R., Ziegler, D., Pflüger, V., Vogel, G. and Lehner, A. 2010. Rapid genus and species-specific identification of *Cronobacter* spp. by MALDI-TOF MS. *Journal of clinical Microbiology*, pp. 2846-2851.
- Swanson, E.C. and Collins, M.T. 1980. Use of the API 20E system to identify veterinary *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 12(1), pp. 10-14.
- Tamura, A., Kato, M., Omori, M., Nanba, A., Miyagawa, K., Yang, C.R. and Zhou, W.H., 1995. Flavour components and microorganisms isolated from Suancha. *Journal of Home Economics*, Vol. 46, pp. 759–764.
- Tärnberg, M., Jakobsson, T., Jonasson, J. and Forsum, U. 2002. Identification of randomly selected colonies of lactobacilli from normal vaginal fluid by pyrosequencing of the 16S rRNA gene variable V1 and V3 regions. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, Vol. 110, pp. 802–810.
- Temiz, A. 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. 3. Baskı. Hatipoğlu Yayınları, Ankara. 291 s.
- Togay, S.Ö., Bağcı, U. ve Şener, A. 2008. *E. sakazakii* ve gıda endüstrisindeki önemi. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- Townsend, S., Caubilla Barron, J., Loc-Carrillo, C. and Forsythe, S.J. 2006. The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin and *E. sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat. *Food Microbiology*, Vol. 24, pp. 67–74.

- Townsend, S.M., Hurrell, E., Gonzalez-Gomez, I., Lowe, J., Frye, J.G. and Forsythe, S.J., Badger, J.L. 2007. *E. sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat. *Microbiology*, Vol. 153, pp. 3538–3547.
- Townsend, S.M., Hurrell, E., Caubilla-Barron, J., Loc-Carrillo, C. and Forsythe, S.J. 2008a. Characterization of an extended-spectrum betalactamase *Enterobacter hormaechei* nosocomial outbreak, and other *Enterobacter hormaechei* misidentified as *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*. *Microbiology*, Vol. 154, pp. 000– 000.
- Townsend, S., Hurrell, E. and Forsythe, S.J. 2008b. Virulence studies of *E. sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. *BMC Microbiology*, Vol. 8, pp. 64.
- Tschäpe, H., Prager, R., Streckel, W., Fruth, A., Tietze, E., Bohme, Oh, T. and Tay, L., 1995. Bacteremia caused by *Rahnella aquatilis*: severe gastroenteritis and cases of hemolytic uremic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. *Epidemiologic Infections*, Vol. 114, pp. 441–450.
- Tullus, K., Ayling-Smith, B., Kuhn, I., Rabsch, W., Reissbrodt, R. and Burman, L.G. 1992. Nationwide spread of *Klebsiella oxytoca* K55 in Swedish neonatal special care wards. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, Vol. 110, pp. 1008–1014.
- Tunail, N. 2009. Mikrobiyoloji. Bölüm 9. Taksonomi ve Prokaryotların Sınıflandırılması (198-199). Pelin Ofset, Ankara 448 sayfa.
- Van Belkum, A. 1996. Molecular typing techniques for epidemiological studies in medical microbiology. *Medical Microbiology Letters*, Vol. 5, pp. 271–283.
- Van Nierop, W.H., Duse, A. G., Stewart, R. G., Bilgeri, Y. R. and Koornof, H. J. 1998. Molecular Epidemiology of an Outbreak of *E. cloacae* in the Neonatal Intensive Care Unit of a Provincial. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 36(10), pp. 3085–3087.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, pp. 6823–6831.

- Woo, P.C., Ng, K.H., Lau, S.K., Yip, K.T., Fung, A.M., Leung, K.W., Tam, D.M., Que, T.L. and Yuen, K.Y., 2003. Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 41, pp. 1996–2001.
- Yang, J., Wei, L., Gu, M., Fang, X. and Yang, P. 2009. Identification of proteins involved in infectivity and enterotoxin production in *E. sakazakii*. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, Vol. 17, pp. 164–181.

EKLER

EK 1 ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ

EK 2 ARAŞTIRMADA KULLANILAN KİMYASALLAR

**EK 3 MLST ANALİZİ KAPSAMINDA PZR ÜRÜNLERİNİNE ATANAN
PROFİL NUMARALARINA KARŞILIK GELEN NÜKLEİK ASİT
DİZİLİMLERİ**

EK 1 ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ

1.1 Tamponlanmış Peptonlu Su (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 25,5 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, erlenlere 225 mL olacak şekilde dağıtılmış ve ardından 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir (pH 7,0±0,2).

1.2 Tryptic Soy Broth (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 30 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, tüplere 5 mL olacak şekilde dağıtılmış ve ardından 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir (pH 7,3±0,2).

1.3 Tryptic Soy Agar (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 40 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edildikten sonra steril petri kutularına dağıtılmıştır (pH 7,3±0,2).

1.4 Violet Red Metil Red Dextrose Agar (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 39,5 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edildikten sonra steril petri kutularına dağıtılmıştır (pH 7,3±0,2).

1.5 Brilliance *Enterobacter sakazakii* Agar (DFI Formulation) (Oxoid)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 43,1 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edildikten sonra steril petri kutularına dağıtılmıştır (pH 7,3±0,2).

1.6 EE Broth (Oxoid)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 43,5 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, erlenlere 90 mL olacak şekilde dağıtıldıktan sonra 100°C sıcaklıkta 30 dakika kaynatılmış ve hemen soğutulmuştur (pH 7,2±0,2).

1.7 Fenol Red Broth (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 15 g alınıp 800mL destile su içerisinde çözülmüş, tüplere 4'er mL dağıtıp, 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edildikten sonra tüplerin içerisine daha önceden 0,5 g/10 mL olarak hazırlanıp, filtre ile sterilize edilmiş olan denenecek karbohidratlardan her biri tüplerdeki besiyeri üzerine 1 mL eklenmiştir (pH 7,4±0,2).

1.8 Metil Red – Voges Proskauer Broth (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 17 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, tüplere 5 mL olacak şekilde dağıtılmış ve ardından 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir (pH 6,9±0,2).

1.9 Florocult LST Broth (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 36,5 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, tüplere 5 mL olacak şekilde dağıtılmış ve ardından 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir (pH 7,3±0,2).

1.10 Simmon's Citrate Agar (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 22,3 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, tüplere 7 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav çıkışında besiyeri henüz sıvı iken tüpler 1-1,5 cm yüksekliğinde bir

çubuğa yatırılarak (tüpün dibinde 2-2,5 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olacak şekilde) besiyerinin katılaşması beklenmiştir (pH 6,6±0,2).

1.11 Kligler Iron Agar (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 55 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülüş, tüplere 7 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav çıkışında besiyeri henüz sıvı iken tüpler 1-1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılarak (tüpün dibinde 2-2,5 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olacak şekilde) besiyerinin katılaşması beklenmiştir (pH 7,4±0,2).

1.12 Aminoasit Dekarboksilaz Besiyerleri

Pepton	5,0 g/L
Maya ekstraktı	3,0 g/L
D(+) Glikoz	1,0 g/L
Bromkresol Moru	0,02 g/L

Bu besiyerleri laboratuvar ortamında gerekli içerikteki maddelerin tek tek eklenmesi ile hazırlanmışlardır. Bileşim olarak Lysine Decarboxylase Broth (Oxoid) baz alınmıştır. Bu besiyeri önce bileşiminde lysine olmadan hazırlandıktan sonra 4 erlene bölünmüş, bir erlendeki besiyerine kontrol amacı ile amino asit eklenmezken, diğer erlenlerin her birine 5g/L olacak şekilde lizin, arjinin ve ornitin eklendikten sonra 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmişlerdir (pH 6,1±0,2).

EK 2 ARAŞTIRMADA KULLANILAN KİMYASALLAR

2.1 Barzit (α -Naftol)

0,5 g α -naftolün 10 mL mutlak etil alkol içinde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

2.2 O'meara (%40'lık Potasyum Hidroksit) Çözeltisi

4g KOH'ın 10 mL saf su içinde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

2.3 Metil Red İndikatörü

0,1 g metil kırmızısının 300 mL %95'lik alkol içinde çözülmesinin ardından bu çözeltinin saf su ile 500 mL'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır.

2.4 0,5M EDTA

EDTA	186,1 g/L
NaOH	20 g/L

Kimyasallar steril destile su ile 1L'ye tamamlanıp tam çözünme gerçekleşene kadar ısıtılarak karıştırılmıştır (pH 8,0).

2.5 1 M Tris Buffer

Tris Bazı	121 g/L
HCL	70 mL/L

Kimyasallar steril destile su ile 1L'ye tamamlanıp tamamen çözünene kadar karıştırılmıştır (pH 8,0).

2.6 TE Buffer

1 M Tris (pH 8,0)	10 mL/L
0,5 M EDTA (pH 8,0)	2 mL/L

Kimyasallar steril destile su ile 1L'ye tamamlanıp karıştırılmıştır.

2.7 10X TBE Buffer

Tris bazı	108 g/L
Borik asit	55 g/L
0,5M EDTA (pH 8,0)	40 mL/L

Kimyasallar steril destile su ile 1L'ye tamamlandıktan sonra, tamamen çözülünceye kadar ısıtılarak karıştırılmıştır.

2.9 TEB+ %1 Agaroz +%1 SDS Çözeltisi

Agaroz	10 g/1L TEB
SDS	10 g/1L TEB
TE Buffer	1000mL

20 mL TE buffer içine 2g agaroz ve 2 gram SDS eklendikten sonra taşmamasına özen göstererek mikrodalga fırında kimyasallar tamamen çözülünceye kadar ısıtılmıştır.

2.10 Hücre Süspansiyon Tampon Çözeltisi

1 M Tris (pH 8,0)	100mL/L
0,5M EDTA (pH 8,0)	200mL/L

Kimyasallar destile su ile 1L'ye tamamlanıp karıştırılmıştır.

2.11 Hücre Lize Tampon Çözeltisi

1 M Tris (pH 8,0)	50 mL/L
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 mL/L

Kimyasallar destile su ile 1L'ye tamamlanıp karıştırılmıştır.

EK 3 MLST ANALİZİ KAPSAMINDA PZR ÜRÜNLERİNİNE ATANAN PROFİL NUMARALARINA KARŞILIK GELEN NÜKLEİK ASİT DİZİLİMLERİ

BS1:

>atpD-10

GAGCCGCCGGGAAACCGTCTGCGCGTTGCGCTGACCGGCCTGACCATGGCT
GAGAAATTCCGTGACGAAGGTCGTGACGTTCTGCTGTTTCGTCGACAACATCT
ACCGTTACACCCTGGCCGGTACTGAAGTATCCGCACTGCTGGGCCGTATGCC
TTCAGCGGTAGGTTACCAGCCGACCCTGGCGGAAGAGATGGGCGTTCTGCA
GGAGCGTATCACCTCCACCAAAACCGGTTCTATCACCTCCGTACAGGCGGT
ATACGTACCGGCGGATGACTTGACTGACCCGTCACCAGCCACCACCTTTGCG
CACCTTGACGCAACTGTGGTACTGAGCCGTCAGATTGCTTCTCTGGGTATCT
ACCCGGCCGTTGACCCGCTGGATTCCACC

>fusA-13

GGTATCCTGGACGACGGTAAAGATACTCCGGCTGAGCGTCACGCTAGCGAT
GAAGAGCCGTTCTCTGCACTGGCGTTCAAAATCGCTACCGACCCGTTTCGTTG
GTAACCTGACGTTCTTCCGCGTGTACTCTGGTGTGGTTAACTCTGGTGATAC
CATCCTGAACTCCGTGAAATCCGCACGTGAGCGTTTCGGTCGTATCGTACAG
ATGCACGCTAACAAACGTGAAGAGATCAAAGAAGTTCGCGCGGGCGACATC
GCTGCGGCTATCGGTCTGAAAGACGTGACCACTGGTGACACTCTGTGTAAC
CCGGATCACCCGATCATTCTGGAGCGCATGGAGTTCCCTGAGCCGGTAATCT
CTATCGCGGTTGAACCGAAAACCAAAGCTGACCAGGAAAAAATGGGTCTGG
CTCTGGGCCGTCTGGCTAAAGAAGAC

>glnS-40

CGCCTGAATCTGGAATATACGGTGATGTCCAAGCGTAAGCTGAACCTGCTG
GTCACCGATAAGCATGTCGAAGGCTGGGACGATCCGCGTATGCCGACCATT
TCCGGCCTGCGCCGTCGCGGTTATACCGCCGCGTCCATCCGTGAATTCTGCA
AGCGTATCGGCGTGACCAAACAGGATAACACCGTGGAATGGCCGCGCTGG

AAGCCTGCATTTCGCGAAGATCTCAACGAGAATGCGCCGCGCGCGATGGCGG
TTATCGATCCGGTGAAACTGGTTATCGAAAACCTACCCGCAGGGCCACAGCG
AAATGGTGTCCATGCCTAACCATCCGAACAAACCGGAAATGGGCAACCGCG
ACGTG

>glbB-37

AACCCGCAGGCAGACGCGGTGCGCGTGGAAGATGTCGAACCGGCAAGCGA
GCTGTTCAAACGCTTTGATACCGCGGCGATGTCCATCGGCGCGCTCAGCCCG
GAAGCGCATGAGTCGCTGGCGGAGGCGATGAACAGCCTCGGCGGTTTCTCG
AACTCCGGCGAAGGCGGCGAAGATCCGGCGCGTTACGGCACCAATAAAGTC
TCGCGCATTAAAGCAGGTGGCCTCCGGCCGCTTCGGCGTAACGCCTGCGTATC
TGGTCAACGCCGATGTGATTCAGATTAAAGTGGCGCAGGGCGCGAAGCCGG
GCGAAGGCGGTCAGTTACCTGGCGACAAAGTGACGCCGTACATCGCGCGTC
TGC GTTATTCGGTGCCGGGCGTGACGCTGATCTCCCCGCCGCCGCACCACGA
TATCTACTCGATTGAAGATCTGGCGCAGCTGATTTTCGACTTAAAACAGGTC
AACCCGAAGGCGATGATCTCCGTGAAGCTGGTGTCTGAGCCGGGC

>gyrB-12

TCGGCGGCGGAAGTTATCATGACCGTTCTGCACGCAGGCGGTAAATTCGAT
GATAACTCCTATAAAGTTTCCGGTGGTCTGCACGGCGTGGGCGTCTCCGTGG
TTAACGCCCTTTCCCAGAACTGGAAGTGGTGATTCGCCGCGAAGGCAAAA
TCCACCAGCAGACTTACGTGCACGGCGTGCCGCAAGCGCCGCTGGCCGTCA
CCGGCGATACCGATCAGACCGGTACTCAGGTTTCGTTTCTGGCCAAGCCTTGA
AACCTTCACCAACGTCACTGAGTTTGAATATGACATTCTGGCGAAGCGCCTG
CGCGAACTCTCGTTCCTGAACTCCGGCGTGTCGATTCGTCTCGTGGATAAGC
GCGACGGTAAGCAGGATCACTTCCATTACGAAGGCGGCATC

>infB-35

GCGTCTGGCGAAGCGGGTGGCATTACCCAGCACATCGGTGCATACCATGTG
CAGACCGATAACGGCATGATCACCTTCCTGGATACCCCGGGCCACGCCGCG
TTTACCGCGATGCGTGACGTGGTGCGCAGGCAACGGACATTGTGGTTCTG
GTGGTTGCGGCGGACGACGGCGTGATGCCTCAGACCATCGAAGCTATCCAG

CATGCGAAAGCGGCGAAAGTGCCGGTCGTCGTTGCGGTGAACAAAATCGAT
AAGCCTGATGCCGATCCGGATCGCGTTAAAAACGAACTGTCTCAGCACGGC
ATCATCCCGGAAGAGTGGGGCGGCGATTGCCAGTTCGTCCACGTTTCTGCG
AAAGCGGGTACCGGTATCGATGAGCTGCTTGACGCTATCCTGCTGCAGTCC
GAAGTTCTGGAACTGAAAGCGGTACGTAAAGGT

>pps-48

CATGGCAAGCAGGTGCGCATCGAAGATGTCCCGCAGGCTGAACGCGACCGT
TTCTGCATCACGCCGGAAGAGGTGCAGGAACTGGCGAAACAGGCCGTACAG
ATTGAGAAACACTATGGCCGCCCCGATGGATATCGAGTGGGCTAAAGATGGT
CACACCGGCAAGCTGTTTATTGTGCAGGCGCGTCCGGAAACCGTGCGCTCG
CGCGGCCAGGTGATGGAGCGCTACACGCTGCATTACAGGGGAAAGTGGTA
GCGGAAGGCCGCGCCATTGGCCATCGCATCGGCGCGGGCACCGTGAAGGTC
ATTCATGACATCAGCGAGATGAACCGCATTACAGCCGGGCGATGTGCTGGTC
ACCGACATGACCGACCCGGACTGGGAACCTATCATGAAAAAAGCGGCGGC
GATTGTACCAACCGCGGCGGGCGTACCTGCCATGCGGCGATCATCGCCCG
CGAGCTGGGCATTCCGGCGGTCGTCGGCTGCGGCGAC

BS2:

>atpD-10

GAGCCGCCGGGAAACCGTCTGCGCGTTGCGCTGACCGGCCTGACCATGGCT
GAGAAATTCCGTGACGAAGGTCGTGACGTTCTGCTGTTTCGTGACAACATCT
ACCGTTACACCCTGGCCGGTACTGAAGTATCCGCACTGCTGGGCCGTATGCC
TTCAGCGGTAGGTTACCAGCCGACCCTGGCGGAAGAGATGGGCGTTCTGCA
GGAGCGTATCACCTCCACCAAACCGGTTCTATCACCTCCGTACAGGCGGT
ATACGTACCGGCGGATGACTTGACTGACCCGTCACCAGCCACCACCTTTGCG
CACCTTGACGCAACTGTGGTACTGAGCCGTCAGATTGCTTCTCTGGGTATCT
ACCCGGCCGTTGACCCGCTGGATTCCACC

>fusA-13

GGTATCCTGGACGACGGTAAAGATACTCCGGCTGAGCGTCACGCTAGCGAT
GAAGAGCCGTTCTCTGCACTGGCGTTCAAAATCGCTACCGACCCGTTTCGTTG
GTAACCTGACGTTCTTCCGCGTGTACTCTGGTGTGGTTAACTCTGGTGATAC
CATCCTGAACTCCGTGAAATCCGCACGTGAGCGTTTCGGTCGTATCGTACAG
ATGCACGCTAACAAACGTGAAGAGATCAAAGAAGTTCGCGCGGGGCGACATC
GCTGCGGCTATCGGTCTGAAAGACGTGACCACTGGTGACACTCTGTGTAAC
CCGGATCACCCGATCATTCTGGAGCGCATGGAGTTCCTGAGCCGGTAATCT
CTATCGCGGTTGAACCGAAAACCAAAGCTGACCAGGAAAAAATGGGTCTGG
CTCTGGGCCGTCTGGCTAAAGAAGAC

>glnS-40

CGCCTGAATCTGGAATATACGGTGATGTCCAAGCGTAAGCTGAACCTGCTG
GTCACCGATAAGCATGTCGAAGGCTGGGACGATCCGCGTATGCCGACCATT
TCCGGCCTGCGCCGTCGCGGTTATACCGCCGCGTCCATCCGTGAATTCTGCA
AGCGTATCGGCGTGACCAAACAGGATAACACCGTGGAATGGCCGCGCTGG
AAGCCTGCATTCGCGAAGATCTCAACGAGAATGCGCCGCGCGCGATGGCGG
TTATCGATCCGGTGAAACTGGTTATCGAAAACCTACCCGCAGGGCCACAGCG
AAATGGTGTCCATGCCTAACCATCCGAACAAACCGGAAATGGGCAACCGCG
ACGTG

>gltB-37

AACCCGCAGGCAGACGCGGTGCGCGTGGAAGATGTCGAACCGGCAAGCGA
GCTGTTCAAACGCTTTGATAACCGCGGCGATGTCCATCGGCGCGCTCAGCCCG
GAAGCGCATGAGTCGCTGGCGGAGGCGATGAACAGCCTCGGCGGTTTCTCG
AACTCCGGCGAAGGCGGCGAAGATCCGGCGCGTTACGGCACCAATAAAGTC
TCGCGCATTAAGCAGGTGGCCTCCGGCCGCTTCGGCGTAACGCCTGCGTATC
TGGTCAACGCCGATGTGATTCAGATTAAAGTGGCGCAGGGCGCGAAGCCGG
GCGAAGGCGGTCAGTTACCTGGCGACAAAGTGACGCCGTACATCGCGCGTC
TGCGTTATTCGGTGCCGGGCGTGACGCTGATCTCCCCGCCGCCGCACCACGA
TATCTACTCGATTGAAGATCTGGCGCAGCTGATTTTCGACTTAAACAGGTC
AACCCGAAGGCGATGATCTCCGTGAAGCTGGTGTCTGAGCCGGGC

>gyrB-12

TCGGCGGCGGAAGTTATCATGACCGTTCTGCACGCAGGCGGTAAATTCGAT
GATAACTCCTATAAAGTTTCCGGTGGTCTGCACGGCGTGGGCGTCTCCGTGG
TTAACGCCCTTTCCCAGAACTGGAAGTGGTGATTCCGCCGGAAGGCCAAAA
TCCACCAGCAGACTTACGTGCACGGCGTGCCGCAAGCGCCGCTGGCCGTCA
CCGGCGATACCGATCAGACCGGTACTCAGGTTCGTTTCTGGCCAAGCCTTGA
AACCTTCACCAACGTCACTGAGTTTGAATATGACATTCTGGCGAAGCGCCTG
CGCGAACTCTCGTTCCTGAACTCCGGCGTGTCGATTCTGTCTCGTGGATAAGC
GCGACGGTAAGCAGGATCACTTCCATTACGAAGGCGGCATC

>infB-35

GCGTCTGGCGAAGCGGGTGGCATTACCCAGCACATCGGTGCATACCATGTG
CAGACCGATAACGGCATGATCACCTTCCTGGATACCCCGGGCCACGCCGCG
TTTACCGCGATGCGTGCACGTGGTGCAGGCAACGGACATTGTGGTTCTG
GTGGTTGCGGCGGACGACGGCGTGATGCCTCAGACCATCGAAGCTATCCAG
CATGCGAAAGCGGCGAAAGTGCCGGTCGTCTGCGGTGAACAAAATCGAT
AAGCCTGATGCCGATCCGGATCGCGTTAAAAACGAACTGTCTCAGCACGGC
ATCATCCCGGAAGAGTGGGGCGGCGATTGCCAGTTCGTCCACGTTTCTGCG
AAAGCGGGTACCGGTATCGATGAGCTGCTTGACGCTATCCTGCTGCAGTCC
GAAGTTCTGGAAGTGAAGCGGTACGTAAAGGT

>pps-48

CATGGCAAGCAGGTGCGCATCGAAGATGTCCCGCAGGCTGAACGCGACCGT
TTCTGCATCACGCCGAAGAGGTGCAGGAACTGGCGAAACAGGCCGTACAG
ATTGAGAAACACTATGGCCGCCCCGATGGATATCGAGTGGGCTAAAGATGGT
CACACCGGCAAGCTGTTTATTGTGCAGGCGCGTCCGGAAACCGTGCGCTCG
CGCGGCCAGGTGATGGAGCGCTACACGCTGCATTACAGGGGAAAGTGGTA
GCGGAAGGCCGCGCCATTGGCCATCGCATCGGCGCGGGCACCGTGAAGGTC
ATTCATGACATCAGCGAGATGAACCGCATTACAGCCGGGCGATGTGCTGGTC
ACCGACATGACCGACCCGGACTGGGAACCTATCATGAAAAAAGCGGCGGC
GATTGTCACCAACCGCGGCGGGCGTACCTGCCATGCGGCGATCATCGCCCG
CGAGCTGGGCATTCCGGCGGTCGTCTGGCTGCGGCGAC

DS1:

>atpD-27

GAGCCGCCGGGAAACCGTCTGCGCGTTGCGCTGACCGGCCTGACCATGGCG
GAGAAATTCCGTGACGAAGGTCGTGACGTTCTGCTGTTTCGTGACAACATCT
ACCGTTACACCCTGGCCGGTACTGAAGTATCCGCACTGCTGGGCCGTATGCC
TTCAGCGGTAGGTTACCAGCCGACCCTGGCGGAAGAGATGGGCGTTCTGCA
GGAGCGTATCACCTCCACCAAACCGGTTCTATCACCTCCGTACAGGCGGT
ATACGTACCGGCGGATGACTTGACTGACCCGTCACCAGCCACCACCTTTGCG
CACCTTGACGCAACCGTGGTACTGAGCCGTCAGATCGCGTCTCTGGGTATCT
ACCCGGCCGTTGACCCGCTGGATTCCACC

>fusA-33

GGTATCCTGGACGACGGTAAAGATACTCCGGCTGAGCGTCACGCTAGCGAT
GAAGAGCCGTTCTCCGCACTGGCGTTCAAAATCGCTACCGACCCGTTTGTG
GTAACCTGACGTTCTTCCGCGTGTACTCTGGCGTGGTTAACTCTGGCGATAC
CATCCTGAACTCCGTGAAATCCGCACGTGAGCGTTTCGGCCGTATCGTACAG
ATGCACGCTAACAAACGTGAAGAGATTAAAGAAGTTCGCGCAGGCGACATC
GCTGCGGCTATCGGTCTGAAAGACGTGACCACCGGTGACACGCTGTGTAAC
CCGGATCACCCGATCATTCTGGAGCGCATGGAGTTCCCTGAGCCGGTAATCT
CTATCGCGGTTGAACCGAAAACCAAAGCTGACCAGGAAAAAATGGGTCTGG
CTCTGGGCCGTCTGGCTAAAGAAGAC

>glnS-38

CGCCTGAATCTGGAATATACGGTGATGTCCAAGCGTAAGCTGAACCTGCTG
GTCACCGATAAGCACGTCGAAGGCTGGGATGACCCGCGTATGCCGACGATT
TCCGGCCTGCGCCGTCGCGGTTATACCGCCGGATCCATCCGCGAATTCTGCA
AACGTATCGGCGTGACCAAACAGGATAACACCGTGGAATGGCCGCGCTGG
AAGCCTGCATTCGCGAAGATCTCAACGAGAACGCGCCGCGTGCCATGGCGG
TTATCGATCCAGTGAACTGGTTATCGAAAACCTACCCGCAGGGCCACAGCG
AAATAGTGTCGATGCCTAACCATCCGAACAAACCGGAAATGGGCAACCGCG
ACGTG

>glbB-35

AACCCGCAGGCGGACGCGGTGCGCGTGGAAGATGTCTGAACCGGCGAGCGA
GCTGTTCAAACGCTTTGATACCGCGGCGATGTCTATCGGCGCGCTGAGCCCG
GAAGCGCATGAGTCGCTGGCGGAGGCGATGAACAGCCTCGGCGGTTTCTCG
AACTCCGGCGAAGGCGGCGAAGATCCGGCGCGTTACGGCACCAATAAAGTC
TCGCGCATTAAGCAGGTGGCCTCCGGCCGCTTCGGCGTAACGCCCCGCGTATC
TGGTTAACGCCGATGTGATTCAGATTAAAGTGGCGCAGGGCGCGAAGCCGG
GCGAAGGCGGTCAGTTACCTGGCGACAAAGTGACGCCGTACATCGCGCGTC
TGCGTTATTCGGTGCCGGGCGTGACGCTGATCTCCCCGCCGCCGCACCACGA
TATCTACTCGATTGAAGATCTGGCGCAGCTGATTTTCGACTTAAAACAGGTC
AACCCGAAGGCGATGATCTCCGTGAAGCTGGTGTCTGAGCCGGGC

>gyrB-39

TCGGCGGCGGAAGTTATCATGACCGTGCTGCACGCGGGCGGTAAATTCGAT
GATAACTCCTATAAAGTCTCCGGTGGCCTGCACGGCGTGGGCGTCTCTGTGG
TTAACGCCCTGTCCCAGAACTGGAGCTGGTGATTCGCCGCGAAGGCAAAA
TCCATCAGCAGACTTACGTGCACGGCGTACCGCAAGCGCCGCTGGCGGTGA
CCGGCGATACCGATCAGACCGGTACTCAGGTCCGTTTCTGGCCGAGCCTTGA
AACCTTCACCAACGTCACTGAATTTGAATATGAGATCCTGGCGAAGCGCCT
GCGCGAACTCTCATTCCCTCAATTCCGGCGTTCCTATTTCGTCTGGTCGATAAA
CGCGACGGCAAGCAGGATCACTTCCATTACGAAGGCGGCATC

>infB-45

GCTTCGGGCGAAGCGGGCGGCATTACCCAGCATATCGGTGCGTACCACGTA
CAGACCGATAACGGCATGATCACCTTCCTGGATACCCCGGGCCACGCCGCG
TTTACCGCGATGCGTGACGTGGTGCGCAGGCAACGGACATCGTGGTTCTG
GTGGTTGCGGCGGACGACGGCGTGATGCCGCAGACCATCGAAGCTATCCAG
CACGCGAAAGCGGCGAAAGTGCCGGTTGTCGTTGCGGTGAACAAAATCGAT
AAGCCTGACGCCGATCCGGATCGTGTTAAAAACGAACTGTCTCAGCACGGC
ATCATCCCGGAAGAGTGGGGCGGCGAGAGCCAGTTCGTCCACGTTTCTGCG
AAAGCGGGCACCGGTATCGATGAACTGCTGGACGCTATCCTGCTGCAGTCC
GAAGTTCTGGAAGTGCACGCGGTACGTAAAGGC

>pps-45

CATGGCAAGCAGGTGCGCATCGAAGATGTGCCGCAGGCTGAACGCGACCGT
TTCTGCATCACGCCGGAAGAAGTGCAGGAGCTGGCGAAACAGGCCGTACAG
ATTGAGAAACACTATGGCCGCCCCGATGGATATCGAGTGGGCTAAAGACGGG
CACACCGGCAAGCTGTTTATCGTGCAGGCGCGCCCCGGAACCGTGCGTTTCG
CGCGGCCAGGTGATGGAGCGCTACACGCTGCATTCCCAGGGCAAAGTCGTG
GCCGAAGGCCGCGCCATCGGCCACCGCATCGGCGCGGGCACCGTGAAGGTG
ATCCACGACATCAGCGAGATGAACCGCATTCAGCCGGGCGATGTGCTGGTC
ACCGACATGACCGACCCGGACTGGGAACCTATCATGAAAAAAGCGGCGGC
GATTGTCACCAACCGCGGGCGGGCGCACCTGTCACGCGGCGATCATCGCCCG
CGAGCTGGGCATTCCGGCGGTGGTCGGCTGCGGCGAC

DS2:

>atpD-15

GAGCCGCCGGGAAACCGTCTGCGCGTTGCGCTGACCGGCCTGACCATGGCT
GAGAAATTCCGTGACGAAGGTCGTGACGTTCTGCTGTTTCGTGACAACATCT
ACCGTTACACCCTGGCCGGTACTGAAGTATCCGCACTGCTGGGCCGTATGCC
TTCAGCGGTAGGTTACCAGCCGACCCTGGCGGAAGAGATGGGCGTTCTGCA
GGAGCGTATCACCTCCACCAAAACCGGTTCTATCACCTCCGTACAGGCGGT
ATACGTACCGGCGGATGACTTGACTGACCCGTCACCAGCCACCACCTTTGCG
CACCTTGACGCAACCGTGGTACTGAGCCGTCAGATTGCTTCTCTGGGTATCT
ACCCGGCTGTTGACCCGCTGGATTCCACC

>fusA-8

GGTATCCTGGACGACGGTAAAGATACTCCGGCTGAGCGTCACGCTAGCGAT
GAAGAGCCGTTCTCTGCACTGGCGTTCAAAATCGCTACCGACCCGTTTCGTTG
GTAACCTGACGTTCTTCCGCGTGTACTCTGGTGTGGTTAACTCTGGTGATAC
CATCCTGAACTCCGTGAAATCCGCACGTGAGCGTTTCGGTCGTATCGTTCAG
ATGCACGCTAACAAACGTGAAGAGATCAAAGAAGTTCGCGCAGGCGACATC
GCGGCTGCAATCGGTCTGAAAGACGTGACCACTGGTGACACTCTGTGTAAC
CCGGATCACCCGATCATTCTGGAGCGCATGGAGTTCCTGAGCCGGTAATCT

CTATCGCGGTTGAACCGAAAACCAAAGCTGACCAGGAAAAAATGGGTCTGG
CTCTGGGCCGTCTGGCTAAAGAAGAC

>glnS-39

CGCCTGAATCTGGAATATACGGTGATGTCCAAGCGTAAGCTGAACCTGCTG
GTTACCGATAAGCACGTCGAAGGCTGGGACGACCCGCGTATGCCGACGATT
TCCGGCCTGCGCCGCCGCGGTTATACTGCCGCGTCCATCCGTGAATTCTGCA
AGCGTATCGGTGTGACCAAGCAGGATAACACCGTGGAATGGCGGCGCTGG
AAGCCTGTATTCGCGAAGATCTCAACGAGAATGCGCCGCGCGCGATGGCGG
TTATCGATCCGGTGAAACTGGTTATCGAAAACCTACCCGCAGGGCCACAGCG
AAATGGTGTCGATGCCTAACCATCCGAACAAACCGGAAATGGGCAACCGCG
ACGTA

>glbB-36

AATCCGCAGGCGGACGCGGTGCGCGTGGAAGATGTCTGAACCGGCAAGCGA
ATTGTTCAAACGCTTTGATACCGCGGCGATGTCCATCGGCGCACTGAGCCCG
GAAGCGCATGAGTCGCTGGCAGAGGCGATGAACAGCCTCGGCGGTTTCTCG
AACTCCGGCGAAGGCGGCGAAGATCCGGCGCGTTACGGCACCAATAAAGTG
TCGCGCATTAAGCAGGTCGCCTCCGGCCGCTTCGGCGTGACGCCCGCGTATC
TGGTCAACGCCGATGTGATTCAGATTAAAGTGGCGCAGGGCGCGAAGCCGG
GCGAAGGCGGTCAGTTACCTGGCGACAAAGTGACGCCGTACATCGCGCGTC
TGCGTTATTCGGTGCCGGGCGTGACGCTGATCTCCCCGCCGCCGCACCACGA
CATCTACTCGATTGAAGATCTGGCGCAGCTGATTTTCGACTTAAAACAGGTC
AACCCGAAGGCGATGATCTCCGTGAAGCTGGTGTCTGAGCCGGGC

>gyrB-38

TCGGCGGCGGAAGTTATCATGACCGTGCTGCACGCAGGCGGTAAATTTGAT
GATAACTCCTATAAAGTCTCCGGTGGTCTGCATGGCGTAGGCGTATCCGTGG
TTAACGCCCTGTCCCAGAACTGGAACCTGGTGATTGCGCCGCGAAGGTAAAA
TCCACCAGCAAACCTTATGTGCACGGCGTGCCGCAAGCGCCGCTGGCCGTCA
CCGGCGATACCGATCAGACCGGTACTCAGGTCCGTTTCTGGCCAAGTCTCGA
AACCTTCACCAACGTCACTGAGTTTGAATACGATATTCTGGCGAAGCGCCTG

CGCGAACTCTCGTTCCTGAACTCCGGCGTGTGCGATCCGTCTCGTGGATAAGC
GCGACGGCAAACAGGACCACTTCCACTACGAAGGCGGCATC

>infB-38

GCGTCTGGCGAAGCGGGTGGCATTACCCAGCACATCGGTGCATACCATGTG
CAGACCGATAACGGCATGATCACCTTCCTGGATAACCCGGGGCCACGCCGCG
TTTACCGCGATGCGTGCACGTGGTGCAGGCAACGGACATCGTGGTTCTG
GTGGTTGCGGCGGACGACGGCGTGATGCCTCAGACCATCGAAGCTATCCAG
CACGCGAAAGCGGCGAAAGTGCCGGTTGTCGTTGCGGTGAACAAAATCGAT
AAGCCTGATGCCGATCCGGATCGCGTTAAAAACGAACTGTCTCAGCACGGC
ATCATCCCGGAAGAGTGGGGCGGCGATTGCCAGTTCGTCCACGTTTCTGCG
AAAGCGGGCACCGGTATCGATGAGCTGCTGGACGCTATCCTGCTGCAGTCC
GAAGTTCTGGAAGTGAAGCGGTACGTAAAGGT

>pps-47

CACGGCAAGCAGGTGCGCATCGAAGATGTGCCGCAGGCCGAACGCGACCGT
TTCTGCATCACGCCGAAGAGGTGCAGGAGCTGGCGAAACAGGCCGTACAG
ATTGAGAAACACTATGGCCGCCCCGATGGATATCGAGTGGGCTAAAGATGGC
CACACCGGCAAGCTGTTTATTGTCCAGGCGCGCCCGGAAACCGTGCGTTTCG
CGCGGTCAGGTGATGGAGCGCTACACGCTGCATTTCGAGGGGAAAGTGGTA
GCGGAAGGCCGCGCCATCGGCCACCGCATCGGCGCGGGCACCGTGAAGGTC
ATTCATGACATCAGCGAGATGAACCGTATTCAGCCAGGCGATGTGCTGGTC
ACCGACATGACCGACCCGGACTGGGAACCTATCATGAAAAAAGCAGCGGC
GATTGTCACCAACCGCGGGCGGGCGTACCTGTCACGCGGCGATCATCGCCCG
CGAGCTGGGTATTCCGGCGGTGGTTGGCTGCGGCGAC

ES1:

>atpD-3

GAGCCGCCGGGAAACCGTCTGCGCGTTGCGCTGACCGGCCTGACCATGGCT
GAGAAATTCCGTGACGAAGGTCGTGACGTTCTGCTGTTTCGTGACAACATCT
ACCGTTACACCCTGGCCGGTACTGAAGTATCCGCACTGCTGGGCCGTATGCC

TTCAGCGGTAGGTTACCAGCCGACCCTGGCGGAAGAGATGGGCGTTCTGCA
GGAGCGTATCACCTCCACCAAAACCGGTTCTATCACCTCCGTACAGGCGGT
ATACGTACCGGCGGATGACTTGACTGACCCGTCACCAGCCACCACCTTTGCG
CACCTTGACGCAACCGTGGTACTGAGCCGTCAGATTGCTTCTCTGGGTATCT
ACCCGGCCGTTGACCCGCTGGATTCCACC

>fusA-8

GGTATCCTGGACGACGGTAAAGATACTCCGGCTGAGCGTCACGCTAGCGAT
GAAGAGCCGTTCTCTGCACTGGCGTTCAAAATCGCTACCGACCCGTTTCGTTG
GTAACCTGACGTTCTTCCGCGTGTACTCTGGTGTGGTTAACTCTGGTGATAC
CATCCTGAACTCCGTGAAATCCGCACGTGAGCGTTTCGGTCGTATCGTTCAG
ATGCACGCTAACAAACGTGAAGAGATCAAAGAAGTTCGCGCAGGCGACATC
GCGGCTGCAATCGGTCTGAAAGACGTGACCACTGGTGACACTCTGTGTAAC
CCGGATCACCCGATCATTCTGGAGCGCATGGAGTTCCTGAGCCGGTAATCT
CTATCGCGGTTGAACCGAAAACCAAAGCTGACCAGGAAAAAATGGGTCTGG
CTCTGGGCCGTCTGGCTAAAGAAGAC

>glnS-3

CGCCTGAATCTGGAATATACGGTGATGTCCAAGCGTAAGCTGAACCTGCTG
GTCACCGATAAGCACGTCGAAGGCTGGGACGACCCGCGTATGCCGACGATT
TCCGGCCTGCGCCGCCGCGGTTATACCGCCGCGTCCATCCGTGAATTCTGCA
AGCGTATCGGTGTGACCAAACAGGATAACACCGTGGAATGGCGGCGCTGG
AAGCCTGCATTCGCGAAGATCTCAACGAGAACGCGCCGCGCGCGATGGCGG
TTATCGATCCGGTGAAACTGGTTATCGAAAACCTACCCGCAGGGCCACAGCG
AAATGGTGTCGATGCCTAACCATCCGAACAAACCGGAAATGGGCAACCGCG
ACGTA

>gltB-3

AACCCGCAGGCGGACGCGGTGCGCGTGGAAGATGTCGAACCGGCGAGCGA
GCTGTTCAAACGTTTTGATACCGCGGCGATGTCTATCGGCGCGCTGAGCCCG
GAAGCGCATGAGTCGCTGGCGGAGGCGATGAACAGCCTCGGCGGTTTCTCG
AACTCCGGCGAAGGCGGCGAAGATCCGGCGCGTTACGGCACCAATAAAGTC

TCGCGCATTAAGCAGGTGGCCTCCGGCCGCTTCGGCGTGACGCCCCGCGTATC
TGGTCAACGCCGATGTGATTCAGATTAAAGTGGCGCAGGGCGCGAAACCGG
GCGAAGGCGGCCAGCTGCCTGGCGATAAAGTCACCCCGTACATCGCGCGTC
TGCGTTATTCGGTACCGGGCGTGACGCTGATCTCCCCGCCGCCGACACGA
CATCTACTCGATTGAAGATTTGGCGCAGCTGATTTTCGACTTAAAACAGGTC
AACCCGAAGGCGATGATCTCCGTGAAGCTGGTGTCTGAGCCGGGC

>gyrB-18

TCGGCGGCGGAAGTTATCATGACCGTTCTGCACGCAGGCGGTAAATTCGAT
GATAACTCCTATAAAGTCTCCGGTGGTCTGCATGGCGTAGGCGTATCCGTGG
TTAACGCCCTGTCCCAGAACTGGAGCTGGTGATTGCGCCGCGAAGGTAAAA
TCCACCAGCAGACTTACGTGCACGGCGTGCCGCAAGCGCCGCTGGCCGTCA
CCGGCGATACCGATCAGACCGGTACTCAGGTCCGTTTCTGGCCAAGTCTCGA
AACCTTCACCAACGTCACTGAGTTTGAATACGATATTCTGGCGAAGCGCCTG
CGCGAACTCTCGTTCCTGAACTCCGGCGTGTCGATCCGTCTCGTGGATAAGC
GCGACGGCAAACAGGACCACTTCCACTACGAAGGCGGCATC

>infB-46

GCATCTGGCGAAGCGGGTGGCATTACCCAGCACATCGGTGCATACCATGTG
CAGACCGATAACGGCATGATCACCTTCCTGGATAACCCGGGTACGCCGCG
TTTACCGCGATGCGTGACGTGGTGCGCAGGCAACGGATATCGTGGTTCTG
GTGGTTGCGGCGGACGACGGCGTGATGCCTCAGACCATCGAAGCTATCCAG
CATGCGAAAGCGGCGAAAGTGCCGGTTGTCGTTGCGGTGAACAAAATCGAT
AAGCCTGATGCCGATCCGGATCGCGTTAAAAACGAACTGTCTCAGCACGGC
ATCATCCCGGAAGAGTGGGGCGGCGATTGCCAGTTCGTCCACGTTTCTGCG
AAAGCGGGTACCGGTATCGATGAGCTGCTGGACGCCATCCTGCTGCAGTCC
GAAGTTCTGAACTGAAAGCGGTACGTAAAGGT

>pps-46

CACGGCAAGCAGGTGCGCATCGAAGATGTGCCGCAGGCTGAACGCGACCGT
TTCTGCATCACGCCGAAGAGGTGCAGGAGCTGGCGAAACAGGCCGTACAG
ATTGAGAAACACTATGGCCGCCCGATGGATATCGAGTGGGCTAAAGACGGC

CATACCGGCAAGCTGTTTATCGTGCAGGCGCGCCCGGAAACCGTGCGTTTCG
CGCGGCCAGGTGATGGAGCGCTACACGCTGCATTCCCAGGGGAAAGTGGTA
GCGGAAGGCCGCGCCATCGGCCACCGCATCGGCGCGGGAACCGTGAAGGT
GATCCACGACATCAGCGAGATGAACCGCATTAGCCGGGCGATGTGCTGGT
CACCGACATGACCGACCCGGACTGGGAACCTATCATGAAAAAAGCGGCAGC
GATTGTCACCAACCGCGGGCGGGCGTACCTGTCACGCGGCGATCATCGCCCG
CGAGCTCGGTATTCCGGCGGTGGTTGGCTGCGGCGAC

ES2:

>atpD-1

GAGCCGCCGGGAAACCGTCTGCGCGTTGCGCTGACCGGCCTGACCATGGCT
GAGAAATTCCGTGACGAAGGTCGTGACGTTCTGCTGTTTCGTCGACAACATCT
ACCGTTACACCCTGGCCGGTACTGAAGTATCCGCACTGCTGGGCCGTATGCC
TTCAGCGGTAGGTTACCAGCCGACCCTGGCGGAAGAGATGGGCGTTCTGCA
GGAGCGTATCACCTCCACCAAAACCGGTTCTATCACCTCCGTACAGGCGGT
ATACGTACCGGCGGATGACTTGACTGACCCGTCACCAGCCACCACCTTTGCG
CACCTTGACGCAACCGTGGTACTGAGCCGTCAGATTGCCTCTCTGGGTATCT
ACCCGGCCGTTGACCCGCTGGATTCCACC

>fusA-1

GGTATCCTGGACGACGGTAAAGATACTCCGGCTGAGCGTCACGCTAGCGAT
GAAGAGCCGTTCTCTGCACTGGCGTTCAAAATCGCTACCGACCCGTTTCGTTG
GTAACCTGACGTTCTTCCGCGTGTACTCTGGTGTGGTTAACTCTGGTGATAC
CATCCTGAACTCCGTGAAATCCGCACGTGAGCGTTTCGGTCGTATCGTACAG
ATGCACGCTAACAAACGTGAAGAGATCAAAGAAGTTCGCGCAGGCGACATC
GCGGCTGCTATCGGTCTGAAAGACGTGACTACTGGTGACACCCTGTGTAAC
CCGGATCACCCGATCATTCTGGAGCGCATGGAGTTCCCAGAGCCGGTAATC
TCTATCGCGGTTGAACCGAAAACCAAAGCTGACCAGGAAAAAATGGGTCTG
GCTCTGGGCCGTCTGGCTAAAGAAGAC

>glnS-1

CGCCTGAATCTGGAATATACGGTGATGTCCAAGCGTAAGCTGAACCTGCTG
GTCACCGATAAGCACGTCGAAGGCTGGGACGACCCGCGTATGCCGACGATT
TCCGGCCTGCGCCGCCGCGGTTATACCGCCGCGTCCATCCGTGAATTCTGCA
AGCGTATCGGTGTGACCAAGCAGGATAACACCGTGGAATGGCGGGCGCTGG
AAGCCTGCATTCGCGAAGATCTCAACGAGAACGCGCCGCGCGCGATGGCGG
TTATCGATCCGGTGAAACTGGTTATCGAAAACCTACCCGCAAGGCCACAGCG
AAATGGTGTTCGATGCCTAACCATCCGAACAAACCGGAAATGGGCAACCGCG
ACGTA

>gltB-1

AACCCGCAGGCGGACGCGGTGCGCGTGGAAGATGTCTGAACCGGCGAGCGA
GCTGTTCAAACGTTTTGATACCGCGGCGATGTCTATCGGCGCGCTGAGCCCG
GAAGCGCATGAGTCGCTGGCGGAGGCGATGAACAGCCTCGGCGGATTCTCA
AACTCCGGCGAAGGCGGCGAAGATCCGGCGCGTTACGGCACCAATAAAGTG
TCGCGCATTAAGCAGGTGGCCTCCGGCCGCTTCGGCGTGACGCCC GCGTATC
TGGTCAACGCCGATGTGATTCAGATTAAAGTGGCGCAGGGCGCGAAACCGG
GTGAAGGCGGTCAGCTGCCTGGCGATAAAGTCACCCCGTACATCGCGCGTC
TGCGTTATTTCGGTGCCGGGCGTGACGCTGATCTCCCCGCCGCCGCACCACGA
CATCTACTCGATTGAAGATCTGGCGCAGCTGATTTTCGACTTAAAACAGGTC
AACCCGAAGGCGATGATCTCCGTGAAGCTGGTGTCTGAGCCGGGC

>gyrB-1

TCGGCGGCGGAAGTTATCATGACCGTTCTGCACGCAGGCGGTAAATTCGAT
GATAACTCCTATAAAGTCTCCGGTGGTCTGCATGGCGTAGGCGTATCCGTGG
TTAACGCCCTGTCCCAGAACTGGAGCTGGTGATTGCGCCGCGAAGGTAAAA
TCCACCAGCAAACCTTACGTGCACGGCGTGCCGCAAGCGCCGCTGGCTGTAA
CCGGCGACACCGATCAGACCGGTACTCAGGTCCGTTTCTGGCCAAGTCTCG
AAACCTTCACCAACGTCACTGAGTTTGAATACGATATTCTGGCGAAGCGCCT
GCGCGAACTCTCGTTCCTGAACTCCGGCGTGTCGATCCGTCTCGTGGATAAG
CGCGACGGCAAGCAGGACCACTTCCATTACGAAGGCGGCATC

>infB-1

GCATCTGGCGAAGCGGGCGGCATTACCCAGCACATCGGTGCATACCATGTG
CAGACCGATAACGGCATGATCACCTTCCTGGATAACCCGGGTACGCCGCG
TTTACCGCGATGCGTGCACGTGGTGCGCAGGCAACGGATATCGTGGTTCTG
GTGGTTGCGGCGGACGACGGCGTGATGCCTCAGACCATCGAAGCTATCCAG
CATGCGAAAGCGGCGAAAGTGCCGGTTGTCGTTGCGGTGAACAAAATCGAT
AAGCCTGATGCCGATCCGGATCGTGTTAAAAACGAACTGTCTCAGCACGGC
ATCATCCCGGAAGAGTGGGGCGGCGATTGCCAGTTCGTCCACGTTTCTGCG
AAAGCGGGCACCGGTATCGATGAGCTGCTGGACGCCATCCTGCTGCAGTCC
GAAGTTCTGGAAGTGAAGCGGTACGTAAAGGT

>pps-1

CACGGCAAACAGGTGCGCATCGAAGATGTGCCGCAGGCCGAACGCGACCGT
TTCTGCATCACGCCGGAAGAGGTGCAGGAGCTGGCGAAACAGGCCGTACAG
ATTGAGAAACACTATGGCCGCCCCGATGGATATCGAGTGGGCTAAAGATGGC
CACACCGGCAAGCTGTTTATTGTCCAGGCGCGCCCCGGAAACCGTGCGCTCG
CGCGGTCAGGTGATGGAGCGCTACACGCTGCATTCCCAGGGGAAAGTGGTA
GCGGAAGGCCGCGCCATCGGCCACCGCATCGGCGCGGGCACCGTGAAGGTG
ATCCACGACATCAGCGAGATGAACCGTATTCAGCCAGGCGATGTGCTGGTC
ACCGACATGACCGACCCGGACTGGGAACCTATCATGAAAAAAGCGGCGGC
GATTGTCACCAACCGCGGGCGGGCGTACCTGCCACGCGGCGATCATCGCCCG
CGAGCTCGGTATTCCGGCGGTGGTTGGCTGCGGGCGAC

HS1:

>atpD-15

GAGCCGCCGGGAAACCGTCTGCGCGTTGCGCTGACCGGCCTGACCATGGCT
GAGAAATTCCGTGACGAAGGTCGTGACGTTCTGCTGTTTCGTGACAACATCT
ACCGTTACACCCTGGCCGGTACTGAAGTATCCGCACTGCTGGGCCGTATGCC
TTCAGCGGTAGGTTACCAGCCGACCCTGGCGGAAGAGATGGGCGTTCTGCA
GGAGCGTATCACCTCCACCAAAACCGGTTCTATCACCTCCGTACAGGCGGT
ATACGTACCGGCGGATGACTTGACTGACCCGTCACCAGCCACCACCTTTGCG

CACCTTGACGCAACCGTGGTACTGAGCCGTCAGATTGCTTCTCTGGGTATCT
ACCCGGCTGTTGACCCGCTGGATTCCACC

>fusA-14

GGTATCCTGGACGACGGTAAAGATACTCCGGCTGAGCGTCACGCTAGCGAT
GAAGAGCCGTTCTCTGCACTGGCGTTCAAAATCGCTACCGACCCGTTTCGTTG
GTAACCTGACGTTCTTCCGCGTGTACTCTGGTGTGGTTAACTCTGGTGATAC
CATCCTGAACTCCGTGAAATCCGCACGTGAGCGTTTCGGTCGTATCGTACAG
ATGCACGCTAACAAACGTGAAGAGATCAAAGAAGTTCGCGCAGGCGACATC
GCGGCTGCAATCGGTCTGAAAGACGTGACCACTGGTGACACCCTGTGTAAC
CCGGATCACCCGATCATTCTGGAGCGCATGGAGTTCCTGAGCCGGTAATCT
CTATCGCGGTTGAACCGAAAACCAAAGCTGACCAGGAAAAAATGGGTCTGG
CTCTGGGCCGTCTGGCTAAAGAAGAC

>glnS-15

CGCTGAATCTGGAATATACGGTGATGTCCAAGCGTAAGCTGAACCTGCTG
GTCACCGATAAGCACGTCGAAGGCTGGGACGACCCGCGTATGCCGACGATT
TCTGGCCTGCGCCGCCGCGGTTATACCGCCGCGTCCATCCGTGAATTCTGCA
AGCGTATCGGTGTGACCAAACAGGATAACACCGTGGAATGGCGGCGCTGG
AAGCCTGCATTCGCGAAGATCTCAATGAGAACGCGCCGCGCGCGATGGCGG
TTATCGATCCGGTGAAACTGGTTATCGAAAACCTACCCGCAAGGCCACAGCG
AAATGGTGTCGATGCCTAACCATCCGAACAAACCGGAAATGGGTAACCGCG
ACGTA

>gltB-13

AACCCGCAAGGCGGACGCGGTGCGCGTGGAAGATGTCGAACCGGCGAGCGA
GCTGTTCAAACGTTTTGATACCGCGGCGATGTCTATCGGCGCGCTGAGCCCG
GAAGCGCATGAGTCGCTGGCGGAGGCGATGAACAGCCTCGGCGGTTTCTCG
AACTCCGGCGAAGGCGGCGAAGATCCGGCGCGTTACGGCACCAATAAAGTC
TCGCGCATTAAGCAGGTGGCCTCCGGCCGCTTCGGCGTGACGCCCGCGTAC
CTGGTTAACGCCGATGTGATTCAGATTAAAGTGGCGCAGGGCGCGAAACCG
GGCGAAGGCGGCCAGCTGCCTGGCGATAAAGTCACCCCGTACATCGCGCGT

CTGCGTTATTCGGTGCCGGGCGTGACGCTGATCTCTCCGCCGCCGCACCACG
ACATCTACTCGATTGAAGATCTGGCGCAGCTGATTTTCGACTTAAACAGGT
CAACCCGAAGGCGATGATCTCCGTGAAGCTGGTGTCTGAGCCGGGC

>gyrB-22

TCGGCGGCGGAAGTTATCATGACCGTGCTGCACGCAGGCGGTAAATTTGAT
GATAACTCCTATAAAGTCTCCGGTGGTCTGCACGGCGTGGGCGTATCCGTGG
TTAACGCCCTGTCCCAGAACTGGAGCTGGTGATTCCGCCGGAAGGTAAAA
TCCACCAGCAAACCTTACGTGCACGGCGTGCCGCAAGCGCCGCTGGCCGTAA
CCGGCGACACCGATCAGACCGGTACTCAGGTCCGTTTCTGGCCGAGCCTTG
AAACCTTCACCAACGTCACTGAGTTTGAATACGATATTCTGGCGAAGCGCCT
GCGCGAACTCTCGTTCCTGAACTCCGGCGTGTCGATTCTGCTCGTGGATAAG
CGCGACGGCAAGCAGGACCACTTCCATTACGAAGGCGGTATC

>infB-5

GCATCTGGCGAAGCGGGTGGCATTACCCAGCACATCGGTGCATACCATGTG
CAGACCGATAACGGCATGATCACCTTCCTGGATAACCCGGGTACGCTGCG
TTTACCGCGATGCGTGACGTGGTGCGCAGGCAACGGATATCGTGGTTCTG
GTGGTTGCGGCGGACGACGGCGTGATGCCTCAGACCATCGAAGCTATCCAG
CACGCGAAAGCGGCGAAAGTGCCGGTTGTCGTTGCGGTGAACAAAATCGAT
AAGCCTGATGCCGATCCGGATCGTGTTAAAAACGAACTGTCTCAGCACGGC
ATCATCCCGGAAGAGTGGGGCGGCGATTGCCAGTTCGTCCACGTTTCTGCG
AAAGCGGGTACCGGTATCGATGAGCTGCTGGACGCCATCCTGCTGCAGTCC
GAAGTTCTGGAAGTGAAGCGGTACGTAAAGGT

>pps-16

CACGGCAAGCAGGTGCGCATCGAAGATGTGCCGCAGGCCGAACGCGACCGT
TTCTGCATCACGCCGGAAGAGGTGCAGGAGCTGGCGAAACAGGCTGTACAG
ATTGAGAAACACTATGGCCGCCCCGATGGATATCGAGTGGGCTAAAGATGGC
CACACCGGCAAGCTGTTTATTGTCCAGGCGCGCCCGGAAACCGTGCGCTCG
CGCGGTCAGGTGATGGAGCGCTACACGCTGCATTCCCAGGGGAAAGTGGTA
GCGGAAGGCCGCGCCATCGGCCATCGCATTGGCGCGGGCACCGTGAAGGTC

ATTCATGACATCAGCGAGATGAACCGTATTCAGCCAGGCGATGTGCTGGTC
ACCGACATGACCGACCCGGACTGGGAACCTATCATGAAAAAGCGGCGGC
GATTGTCACCAACCGCGGCGGGCGTACCTGTCACGCGGCGATCATCGCCCG
CGAGCTGGGTATTCCGGCGGTGGTTGGCTGCGGCGAC

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esin ÇETİNKAYA

Doğum Yeri : Şişli

Doğum Tarihi : 17/04/1986

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Edremit Anadolu Lisesi 1997 - 2004

Lisans : Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü 2004 - 2009

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü 2009 - 2011

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl

BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung - Risk Değerlendirme Federal Enstitüsü) ERASMUS Staj Hareketliliği Programı (BERLIN/ALMANYA) 2007

Türk Standartları Enstitüsü, Gıda Laboratuvarı (ANKARA) 2008

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Su Kimyası Laboratuvarı ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı (ANKARA) 2008

Nottingham Trent University, School of Science and Technology (NOTTINGHAM/ İNGİLTERE) 2010

Yayınları (SCI ve diğer):

1-Joseph, S., **Çetinkaya, E.**, Drahovska, H., Levican, A., Figueras, M. and Forsythe, S., 2011. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat and *Cronobacter universalis* sp. nov., a novel species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from water, and food ingredients. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (In Press)

2-**Çetinkaya, E.** ve Ayhan, K. 2011. Gıdalardan izole edilen *Enterobacter* sp. ve *Cronobacter sakazakii* suşlarının moleküler tanımlama yöntemleri. Yüksek Lisans Semineri. Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü. Ankara. 29 sayfa.

3-**Çetinkaya, E.**, Altuntaş E., Alkeskas, A., Joseph, S., Forsythe, S. and Ayhan, K. 2011. The identification of *Cronobacter sakazakii* isolated from various foods in Ankara-TURKEY. *Proceedings of The International Food Congress Novel Approaches In Food Industry*. Sayfa 39 International Food Congress: Novel Approaches in Food Industry 26-29 Mayıs 2011. İzmir.

4-**Çetinkaya, E.**, Güneş-Altuntaş, E., Abdulla, H., Joseph, S., Gillett, M., Forsythe, S.J. and Ayhan, K. 2010. The Identification of *Enterobacter* sp. Isolated from Various Foods in Ankara-Turkey. *Proceedings of 1st International Congress on Food Technology*. Sayfa 225. 1st International Congress on Food Technology 3-6 Kasım 2010. Antalya.