



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association
e-ISSN: 2667-8381

Özge ERDOĞAN

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü Veterinerlik Mikrobiyolojisi
Anabilim Dalı, Ankara

ORCID: 0000-0003-1721-1579

***Sorumlu Yazar:** Özge ERDOĞAN
E-Posta: ozgeerdogan21@gmail.com

Geliş Tarihi: 23.11.2022

Kabul Tarihi: 11.08.2023

14 (2): 72-78, 2023

DOI: 10.38137/vftd.1208878

**SALMONELLA CRISPR-Cas SİSTEMİ'NİN TEMEL
ÖZELLİKLERİ**

ÖZET. Son yıllarda keşfedilen CRISPR-Cas sistemi, CRISPR dizileri (düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri) ve Cas (CRISPR ilişkili proteinler) genlerinden oluşmaktadır. 1987 yılında bu tekrar kümeleri ilk olarak *Escherichia coli*'de keşfedilmiş ancak fonksiyonları tanımlanamamıştır. Günümüzde *Salmonella* da dahil olmak üzere bakteri genomlarının yaklaşık % 45'inde bulunan CRISPR-Cas sisteminin bakterilerin nükleik asit tabanlı adaptif bağışıklık sisteminin temel bileşenleri olduğu bilinmektedir. CRISPR-Cas bölgelerinin analizine dayalı çalışmaların son yıllarda oldukça artması, CRISPR tabanlı teknolojilerin ve uygulamaların çoğalması bu alanda yapılan çalışmaların etkinliğini de giderek artırmaktadır. Bu derlemede CRISPR-Cas sistemi ve *Salmonella*'da mevcut olan CRISPR bölge özellikleri ile kullanım alanları hakkında bilgi verilecektir

Anahtar Kelimeler: CRISPR, Moleküler tiplendirme, *Salmonella*.

**KEY FEATURES OF SALMONELLA CRISPR-Cas
SYSTEM**

ABSTRACT. The CRISPR-Cas system, discovered in recent years, consists of CRISPR sequences (clusters of regularly spaced palindromic repeats) and Cas (CRISPR-associated proteins) genes. These repeat clusters were first discovered in *Escherichia coli* in 1987, but their function has not been defined. It is known that the CRISPR-Cas system, which is present in approximately 45% of bacterial genomes, including *Salmonella*, is the essential component of the nucleic acid-based adaptive immune system of bacteria. The increase in studies based on the analysis of CRISPR-Cas regions and the proliferation of CRISPR-based technologies and applications increase the effectiveness of studies in this field. In this review, information will be given about the CRISPR-Cas system and the CRISPR region features and usage areas in *Salmonella*.

Keywords: CRISPR, Molecular typing, *Salmonella*.

Makale atfı

Erdoğan, Ö. (2023). *Salmonella* CRISPR-Cas Sistemi'nin Temel Özellikleri, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 14 (2), 72-78. DOI: 10.38137/vftd.1208878.

GİRİŞ

CRISPR-Cas sistemi son yıllarda keşfedilen, bakteri ve arkeaların kendilerini koruyarak yabancı genetik materyale karşı kazanılmış bağışıklığı sağladığı adaptif immün sistem olarak tanımlanmaktadır.

CRISPR-Cas sistemi; CRISPR dizileri (düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri) ve Cas (CRISPR ilişkili proteinler) genlerinden oluşmaktadır (Grissa ve ark., 2007a). CRISPR dizileri ilk olarak 1987 yılında *Escherichia coli*'de belirlenmiştir ancak o zamanlar ne olduğu anlaşılamamıştır. 2005 yılında üç bağımsız araştırma grubu tarafından bu tekrar kümelerinin arasında kalan DNA dizilerinin bazılarının o canlıyı enfekte eden virüslerin ve plazmidlerin DNA'sının bir kısmı ile benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur. Virüs DNA'sı ile aynı diziyeye sahip olmanın da o virüse karşı bir direnç geliştirdiği gözlenmiştir (Mojica ve ark., 2009). Böylece CRISPR'lerin bakteri ve arkeaların yeni bir savunma sistem biçimi olarak görev yaptığı anlaşılmıştır (Grissa ve ark., 2007a).

Hayvansal orijinli patojenler arasında ilk sıralarda *Salmonella*'lar yer almaktadır. Son yıllarda *Salmonella* da dahil olmak üzere bakteri genomlarının analizine dayalı yenilikçi ve güçlü tiplendirme yöntemleri geliştirilmiştir (Barrangou ve Dudley, 2016). PCR temelli teşhis yöntemlerinin zaman, hassaslık ve kolay uygulanabilirlik açısından avantajlı olması, CRISPR-Cas

bölgelerinin *Salmonella* identifikasyonunda kullanımını artırmıştır (Oliveira ve ark., 2002).

Günümüze kadar birçok *Salmonella* CRISPR lokusu, alt tip protokollerinin geliştirilmesi (Liu ve ark., 2011a; Fabre ve ark., 2012; DiMarzio ve ark., 2013; Shariat ve ark., 2013a) veya *Salmonella* filogenisinin daha iyi anlaşılması (Fricke ve ark., 2011; Pettengill ve ark., 2014) amacıyla analiz edilmiştir.

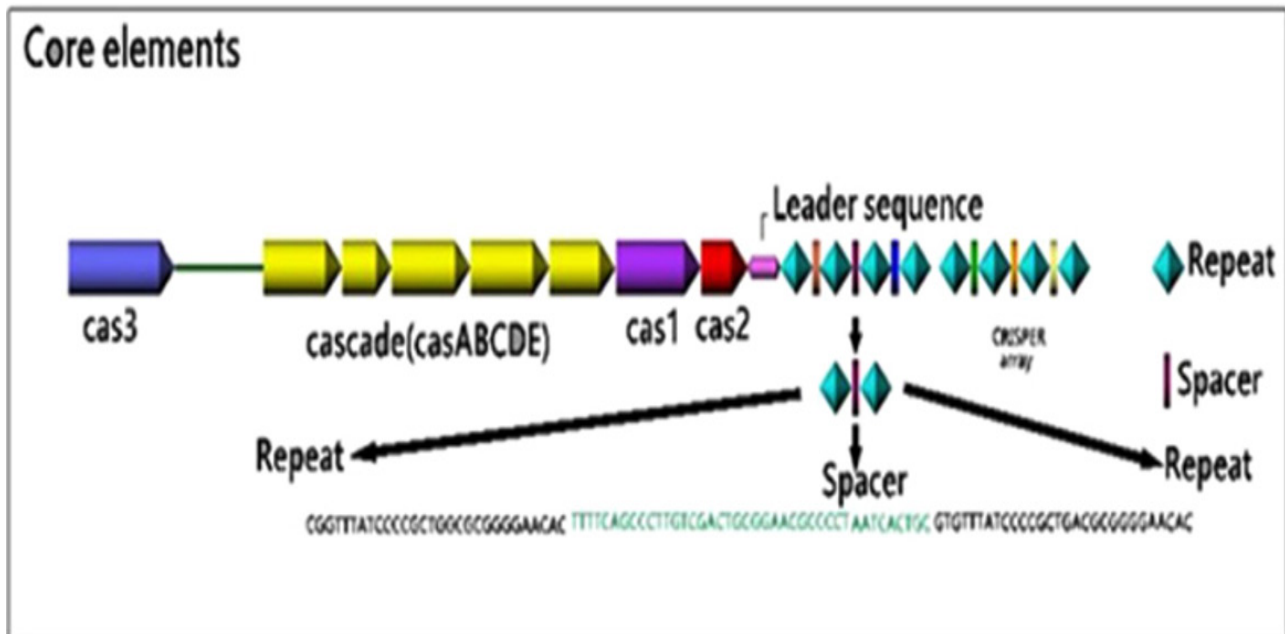
Bu derlemede CRISPR-Cas sistemi hakkında genel bilgiler ile birlikte *Salmonella*'larda ki CRISPR bölge özellikleri ve bu bölgelerin değişkenliği değerlendirilerek moleküler tiplendirmede kullanımıyla ilgili bilgiler verilecektir.

CRISPR-Cas SİSTEMİ

CRISPR-Cas sistemi, bakteri ve arkeaların yabancı genetik materyale karşı kendilerini koruyarak adaptif bağışıklığı sağladığı bir sistemdir (Barrangou ve Marraffini, 2014). Bu sistem Cas gen dizisi, bir lider dizi ve CRISPR dizi genlerinden oluşmaktadır (Shariat ve ark., 2015). Şekil 1'de bir CRISPR lokus örneği gösterilmiştir.

CRISPR dizisi

Bir CRISPR dizisi tekrar (repeat) ve aralık (spacer) bölgelerinden oluşmaktadır. Tekrar bölgeleri 21-48 baz çifti (bp) uzunluğunda iyi korumuş bölgeler olup CRISPR lokuslarında farklı uzunlukta ve sekansta bulunabilmektedir. CRISPR lokuslarında genellikle 2-100



Şekil 1. CRISPR lokusu (Karimi ve ark., 2018).

tekrar bölgesi olduğu gözlenmiştir (Barrangou ve Oost, 2013). Tekrar bölgelerindeki bu farklılıklara rağmen çoğu 3' sonunda, Cas proteinlerinin bağlanma alanı olan korunmuş GAAA(C/G) motifi içermektedir (Kunin ve ark., 2007).

CRISPR bölgesindeki aralık bölgeleri ise 26-72 bp arasında olup kendine özgü nükleotid dizisine sahiptir. CRISPR savunma sisteminin önemli parçalarından olan aralık bölgeleri virüs veya plazmidlerin genetik elementleri olup CRISPR savunma sistemine eklenerek katkıda buldukları saptanmıştır (Fabre ve ark., 2012). Bu aralıklar CRISPR'in genellikte tek tarafından eklenerek bakteriyi enfekte eden virüslerin kronolojik sırasını oluşturmaktadır (Rath ve ark., 2015).

CRISPR lokus sayısı ve her bir lokusun uzunluğu farklılık gösterebildiği gibi genomda bir veya çoklu CRISPR bölgesi de mevcut olabilmektedir (Horvath ve Barrangou, 2010). CRISPR sayısı ve uzunluğu genomun uzunluğu ile ilişkili olmayıp en küçük genoma sahip bakterilerin çoklu CRISPR bölgesi içerebildiği gözlenmiştir (Sorek ve ark., 2013).

Lider Sekans

CRISPR lokuslarında AT (adenin, timin) nükleotitleri yönünden zengin olan, korunmuş sekansların bulunduğu bu bölge genlerin ekspresyonunun kontrolünde görevlidir. Lider sekanslar 100-500 bp uzunluğunda olup tekrar bölgelerinin bitişiğinde bulunmaktadır. CRISPR lokusunun transkripsiyonu için ana promotör bölgelerini taşıyıp ilk tekrarın yakınında veya etrafında bulunan aralık bölgesine yeni aralıkların eklenmesini sağlamaktadır. Genel olarak, lider diziler sadece CRISPR dizisinin yakınında bulunup, genomun başka bir yerinde mevcut değildir (Jansen ve ark., 2002).

Cas genleri

Birbirinden farklı genlerin bir araya gelmesiyle oluşan, CRISPR dizisinin yanına yerleşim gösteren bu bölge Cas gen bölgesi olarak adlandırılmaktadır (Horvath ve Barrangou, 2010). Cas genleri nükleik asitlerle etkileşmektedir. CRISPR I ilişkili csn1-like geninin inaktive edilip faj kökenli aralıkların bulunmasına rağmen faja karşı geliştirilmiş olan direncin kaybedilmiş olmasıyla Cas proteinlerinin CRISPR savunma mekanizmasında görevli oldukları anlaşılmıştır (Barrangou ve ark., 2007). CRISPR içeren genomlarda öncelikle 4 çeşit Cas geni

belirlenmiş ancak yapılan çalışmalar arttıkça 45 civarı farklı gen ailesi varlığı saptanmıştır (Haft ve ark., 2005). Cas genlerinin farklılık göstermesi, CRISPR bölgelerinin çoklu mevcudiyeti ve canlılar arasında geçişlerin oluşu CRISPR-Cas sisteminin sınıflandırılmasını güçleştirmektedir (Rath ve ark., 2015).

CRISPR bölgesinin özelliğine ve Cas protein çeşitliliğine göre CRISPR-Cas sistemleri I, II ve III olmak üzere 3 ana tipe ve IA-F, IIA-C ve IIIA-B olmak üzere 11 alt tipe sınıflandırılmaktadır (Jiang ve Doudna, 2015). CRISPR-Cas sisteminin tek bir organizmada aynı anda farklı tipte bulunması da mümkündür (Rath ve ark., 2015). Tip II sistemi ise en çok kullanılan CRISPR-Cas sistemidir.

CRISPR-Cas bağışıklık sistemi hücre içerisinde immüniteyi; Yabancı DNA'nın adaptasyonu, CRISPR RNA (crRNA) biyosentezi ve hedefleme olmak üzere 3 adımda gerçekleştirilmektedir. İlk aşama olan adaptasyonda, yabancı nükleik asitten gelen aralık kısımlarının CRISPR bölgesine yerleştirildiği gözlenmiştir (Barrangou ve Marraffini, 2014). Bazı CRISPR-Cas sistemlerinde adaptasyon yalnızca istilacı genomdaki protoaralık bitişik motifi (PAM) olarak adlandırılan bölgenin tanınmasıyla ve sonrasında CRISPR lokusuna yerleştirilmesiyle meydana gelmektedir (Deveau ve ark., 2008; Horvath ve ark., 2008). Bu PAM'ların 2-5 nükleotitten oluşan iyi korunmuş bölgeler olduğu belirtilmiştir (Barrangou ve Marraffini, 2014). Plazmid ve fajların genomlarında bulunan PAM sekansına sahip olanların aralık kısmı tekrar genleriyle birlikte CRISPR bölgesine yerleştirilmektedir. PAM dizilerinde meydana gelen değişimler fajın CRISPR bağışıklığından kaçmasına sebep olmaktadır (Jiang ve Doudna, 2015). Sonraki aşama CRISPR lokuslarının crRNA'lara kopyalanıp işlendiği aşama olup bu amaçla istilacı genom'daki hedef sekans öncül CRISPR RNA'lara (pre-crRNA) transkribe edilmektedir. Pre-crRNA'lar daha sonra Cas proteinleri tarafından küçük crRNA'lara dönüştürülmektedir (Barrangou ve Marraffini, 2014; Nishimasu ve ark., 2014; Savic ve Schwank, 2016). Üçüncü ve son aşama hedefleme aşaması olup hedef nükleik asit, crRNA ve Cas proteinlerinin birlikte göreviyle tanınıp yok edilmektedir (Rath ve ark., 2015).

Salmonella' da CRISPR-Cas SİSTEMİ

Salmonella CRISPR I ve CRISPR II olmak üzere 2 adet CRISPR lokusuna sahiptir (Jansen ve ark., 2002; Fricke

ve ark., 2011; Touchon ve Rocha, 2010). Şekil 2'de *Salmonella* CRISPR-Cas lokusu örneği gösterilmektedir.

Tip 1-E CRISPR-Cas sistemini içeren *Salmonella*'da cas3, cse1, cse2, cas7, cas5, cas6, cas1 ile cas2 genleri olmak üzere toplam 8 gen bulunmaktadır (Makarova ve ark., 2006). CRISPR I'deki 8 adet gen gri oklar ile gösterilmiştir. Koyu gri ile de Tip 1 sisteminin belirgin geni olan cas3 belirtilmiştir. Cas1 ve cas2 genleri ise tüm CRISPR-Cas tiplerinde bulunmaktadır (Shairat ve ark., 2015).

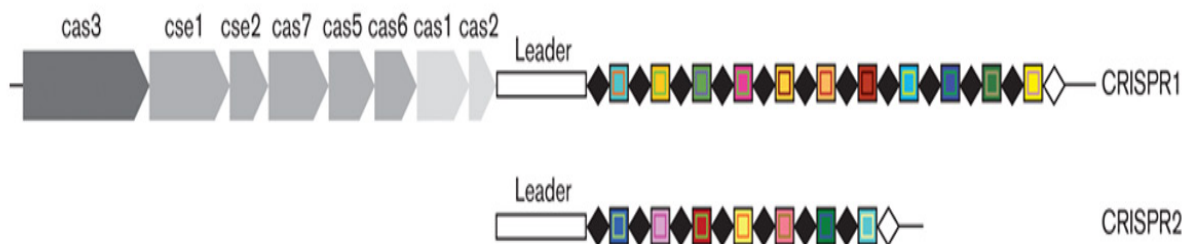
CRISPR I lokusu CRISPR II'ye göre daha iyi korunmakta olup tekrar bölgeleri 24-47 nükleotitten oluşurken, aralık kısımları 21-72 nükleotit uzunluğundadır (Grissa ve ark., 2007; Horvath ve Barrangou, 2010).

Şimdiye kadar analiz edilen 38 *Salmonella* genomunun 35'inde Tip 1-E CRISPR-Cas sistemi mevcut iken *S. Pullorum* S06004, *Javiana* ve *Paratyphi B*'de Cas geni saptanamamıştır (Medina-Aparicio ve ark., 2018).

Fabre ve ark. (2012) tarafından insanlarda *Salmonella* enfeksiyonuna sebep olan toplam 130 serotipin CRISPR dizileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda yaygın serotipler olan *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* gibi suşların CRISPR dizilerinin mikroevrimi sonucu alt tiplerine ayırt edilmesinin kolaylaştığı belirtilmiştir. *S. enterica* ve *S. bongori*'den toplam 39 genomda ise 2 CRISPR lokusunda toplam 705 aralık tespit edilmiş olup CRISPR I'deki aralık sayısı 1 ile 55, CRISPR II'deki aralık sayısını ise 0 ile 52 arasında olduğu gözlenmiştir. CRISPR I ve CRISPR II'nin basit bir PCR uygulaması sonrası agaroz gel elektroforez ve PCR ürünlerinin boyutlandırılmasıyla salgın ile salgın olmayanların ayırımında faydalı bir tarama aracı olduğu belirtilmektedir.

Serovar Enteritidis, Typhimurium, Newport, Heidelberg'den sırasıyla 141, 84, 86 ve 89 olmak üzere toplam 400 *Salmonella* izolatının CRISPR I ve CRISPR II analizi sonucunda 4 serovar arasında sırasıyla CRISPR I ve CRISPR II için 61 ve 68 farklı array bulunmuştur (Shariat ve ark., 2013a; Shariat ve ark., 2013b; Shariat ve ark., 2013c). Serovar Typhimurium'un her iki lokus için en fazla sayıda farklı diziyeye sahip olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada ve diğerlerinde gösterildiği gibi (Liu ve ark., 2011a; Fabre ve ark., 2012; Shariat ve ark., 2013a) *Salmonella* CRISPR dizilerindeki polimorfizmlerin çoğu aralayıcı-tekrar birimlerinin silinmesinin bir sonucu olarak mevcut olsa da çoğunlukla buna aralık kayıplarının sebep olduğu belirtilmiştir.

Xie ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada 1962 ile 2015 yılları arasında farklı bölgelerden toplanan 655 adet *S. Pullorum* suşunun CRISPR sekanslarını analiz etmiştir. WGST ile birlikte CRISPR tiplendirme metodunu kombine ederek yaptıkları çalışma sonucu gösterdi ki CRISPR lokusları alt tiplene ve suşların karşılaştırmalı analizlerini değerlendirmek için faydalı olmaktadır. Bunlara ek olarak, CRISPR'in, WGST analizi tarafından tanımlanan ana soyları tanımlayabildiği belirtilmiştir. Örneğin sekans tipi 10 sadece Çin'in Anhui'dan toplanan 6 suшта saptanırken ve CRISPR I aralıkları yokken, Avrupa ve Güney Amerika'dan toplanan 26 izolatta 8 farklı dizi mevcut olup bunlar Çin'den izole suşlarda bulunmamaktadır. Böylelikle aralıkların farklı bölgeleri karakterize eden DNA parmak izi görevi görebileceği belirtilmiştir. Bu çalışma ile CRISPR lokuslarının sadece izolatlar arasındaki ilişkiyi yansıtmakla kalmayıp suşlar ve çevreleri arasındaki ilişkiyi de yansıttığı saptanmıştır.



Şekil 2. *Salmonella* CRISPR-Cas lokusu (Shairat ve ark., 2015).

Üstelik, WGST ile karşılaştırıldığında, CRISPR ile tiplendirmenin çok daha basit ve daha uygun maliyetli olduğu belirtilmiştir. Tüm bunların sonucunda CRISPR'a dayanan yöntemlerin ümit verici olduğu görülmektedir.

138 *S. Infantis* suşu kullanarak yapılan diğer bir çalışmada 2 adet CRISPR I ile 5 adet CRISPR II alleli tespit edildiği, CRISPR I de olan farklılığın tek bir aralıktan, CRISPR II de olan farklılığın ise kayıp ya da duplike olmuş aralıklardan kaynaklandığı belirtilmiştir. *S. Infantis*'in CRISPR lokuslarındaki allel farklılığının daha önce başka serovarlar ile yapılan çalışmalarda tespit edilene göre az olduğu belirtilmektedir (Richards ve ark., 2020). Örneğin 161 *S. Enteritidis* izolatında yaptıkları çalışmada CRISPR I ve CRISPR II'de 7 allel bulunduğu (Shariat ve ark., 2013a) ve yine başka bir çalışmada 40 *S. Kentucky* izolatında 13 adet CRISPR I ve 7 adet CRISPR II alleli mevcudiyeti belirlenmiştir (Vosik ve ark., 2018).

CRISPR lokusunda değişkenliği değerlendirmek için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Türler göre farklı CRISPR temelli genotiplendirmeler yapılabilmektedir. Farklı suşlardaki CRISPR lokusları aralık dizi kayıpları, tek nükleotid polimorfizmi, bakteriyofaj varlığı, plazmid replikasyonu gibi sebeplerle değişebilmektedir (Barrangou ve ark., 2007).

Sonuç olarak, bakteri suşlarında CRISPR lokuslarının analizi genotiplendirme ve epidemiyolojik çalışmalarda oldukça potansiyele sahiptir (Barrangou ve Marraffini, 2014). Günümüze kadar 64 *Salmonella* serovarının CRISPR-Cas sisteminin değerlendirilmesiyle her iki CRISPR dizisinin uzunluğunda yüksek bir çeşitlilik gösterilmiştir (Pettengill ve ark., 2014). Bu yüksek çeşitlilikteki CRISPR verilerinin değerlendirilmesi için yeni biyoinformatik araçların kullanılması ve bu dizilerin görselleştirilmesi, epidemiyolojik araştırmalara katkı sağlayacaktır. Ayrıca farklı popülasyonlarda CRISPR lokuslarının aralık bölge analizleri epidemiyolojik çalışmalar için kronolojik ve coğrafi olarak bilgi vermekte ve çeşitliliği göstermektedir. CRISPR'lerin *Salmonella* izolatlarının moleküler tiplendirilmesinde ve alt tiplendirilmesinde kullanıma uygun güçlü bir yöntem olduğu yapılan çalışmalar ve ortaya konulan sonuçlarda görülmektedir. Avantajları dikkate alındığında, CRISPR analizlerinin, mevcut altın standart yöntemlere alternatif olduğu anlaşılmıştır. CRISPR ile tiplendirmenin hızı da dikkate alındığında salgın hastalıkların incelenmesine de büyük bir katkısı olduğu görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Barrangou, R. & Dudley, E. G. (2016). CRISPR-based typing and next-generation tracking technologies. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 395–411.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315, 1709–1712.
- Barrangou, R. & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity. *Molecular Cell*, 54, 234- 244.
- Barrangou, R. & van der Oost, J. (2013). CRISPR-Cas systems: RNA-mediated adaptive immunity in bacteria and archaea. Heidelberg, Germany: Springer; 2013. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-34657-6>.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romeo, D. A., Horvath, P. & Moineau, S. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 190 (4), 1390–1400.
- DiMarzio, M. J., Shariat, N., Kariyawasam, S., Barrangou, R. & Dudley, E. G. (2013). Antibiotic resistance in *Salmonella* Typhimurium associates with CRISPR sequence type. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 4282–4289.
- Fabre, L., Zhang, J., Guigon, G., Le Hello, S., Guibert, V., Accou-Demartin, M., de Romans, S., Lim, C., Roux, C., Passet, V., Diancourt, L., Guibourdenche, M., Issenhuth-Jeanjean, S., Achtman, M., Brisse, S., Sola, C. & Weill, F. X. (2012). CRISPR typing and subtyping for Improved Laboratory Surveillance of *Salmonella* Infections. *PLoS One*, 7 (5), e36995.
- Fricke, W. F., Mammel, M. K., McDermott, P. F., Tartera, C., White, D. G., Leclerc, J. E., Ravel, J. & Cebula, T. A. (2011). Comparative genomics of 28 *Salmonella enterica* isolates: evidence for CRISPR-mediated adaptive sublineage evolution. *Journal of Bacteriology*, 193, 3556–3568.
- Grissa, I., Vergnaud, G. & Pourcel, C. (2007). The CRISPRdb database and tools to display

- CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 8, 172.
- Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F. & Nelson, K. E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Computational Biology*, 1, e60.
- Horvath, P. & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327, 167–170.
- Horvath, P., Romero, D. A., Coûté-Monvoisin, A. C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., Boyaval, P., Fremaux, C. & Barrangou, R. (2008). Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 190 (4), 1401–1412.
- Jansen, R., Embden, J. D., Gastra, W. & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43, 1565–1575.
- Jiang, F. & Doudna, J. A. (2015). The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Structural Biology*, 30, 100-111.
- Karimi, Z., Ahmadi, A., Najafi, A. & Ranjbar, R. (2018). Bacterial CRISPR Regions: General Features and their Potential for Epidemiological Molecular Typing Studies. *The Open Microbiology Journal*, 12, 59-70.
- Kunin, V., Sorek, R. & Hugenholtz, P. (2007). Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biology*, 8 (4), R61.
- Liu, F., Barrangou, R., Gerner-Smidt, P., Ribot, E. M., Knabel, S. J. & Dudley, E. G. (2011a). Novel virulence gene and clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) multilocus sequence typing scheme for subtyping of the major serovars of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1946–1956.
- Makarova K. S., Grishin N. V., Shabalala S. A., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of shahypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 1, 7.
- Medina-Aparicio, L., Dávila, S., Rebollar-Flores, J. E., Calva, E. & Hernández-Lucas, I. (2018). The CRISPR-Cas system in Enterobacteriaceae. *Pathogens and Disease*, 76.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155, 733-740.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu P. D., Konermann, S., Dohmae, N., Shehata, S. I., Ishitani, R., Zhang, F. & Nureki, O. (2014). Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*, 156, 935-949.
- Oliveira, S. D., Santos, L. R., Schuch, D. M., Silva, A. B., Salle, C. T. & Canal, C. W. (2002). Detection and identification of *Salmonellas* from poultry related samples by PCR. *Veterinary Microbiology*, 87, 25-35.
- Pettengill, J. B., Timme, R. E., Barrangou, R., Toro, M., Allard, M. W., Strain, E., Musser, S. M. & Brown, E. W. (2014). The evolutionary history and diagnostic utility of the CRISPR-Cas system within *Salmonella enterica* ssp. *enterica*. *Peer J*, 2, e340.
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A. & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119-128.
- Richards, A. K., Hopkins, B. A. & Shariat, N. W. (2020). Conserved CRISPR arrays in *Salmonella enterica* serovar *Infantis* can serve as qPCR targets to detect *Infantis* in mixed serovar populations. *Letters in Applied Microbiology*, 71 (2), 138-145.
- Savic, N. & Schwank, G. (2016). Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Translational Research*, 168, 15-21.
- Shariat, N., DiMarzio, M. J., Yin, S., Dettinger, L., Sandt, C. H., Lute, J. R., Barrangou, R. & Dudley, E. G. (2013a). The combination of CRISPR-MVLST and PFGE provides increased discriminatory power for differentiating human clinical isolates of *Salmonella* 173. *entericasubsp. enterica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1946–1956.
- Shariat, N., Kirchner, M. K., Sandt, C. H., Trees, E., Barrangou, R. & Dudley, E. G. (2013b).

- Subtyping of *Salmonella enterica* serovar Newport outbreak isolates by CRISPR-MVLST and determination of the relationship between CRISPR-MVLST and PFGE results. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 2328-2336.
- Shariat, N., Sandt, C. H., DiMarzio, M. J., Barrangou, R. & Dudley, E. G. (2013c). CRISPR-MVLSTsubtyping of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovars Typhimurium and Heidelberg and application in identifying outbreak isolates. *BMC Microbiology*, 13, 254.
- Shariat, N., Timme, R. E., Pettengill, J. B., Barrangou, R. & Dudley, E. G. (2015). Characterization and evolution of *Salmonella* CRISPR-Cas systems. *Microbiology*, 161, 374-386.
- Sorek, R., Lawrence, C. M. & Wiedenheft, B. (2013). CRISPR mediated adaptive immune systems in Bacteria and Archaea. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 237-66.
- Touchon, M. & Rocha, E. P. (2010). The small, slow and specialized CRISPR and anti-CRISPR of *Escherichia* and *Salmonella*. *PLoS One*, 5, e11126.
- Xie, X., Hu, Y., Xu, Y., Yin, K., Li, Y., Chen, Y., Xia, J., Xu, L., Liu, Z., Geng, S., Li, Q., Jiao, X., Chen, X. & Pan, Z. (2017). Genetic analysis of *Salmonella enterica* Molecular typing and subtyping of *Salmonella* by identification of the variable nucleotide sequences of the CRISPR loci serovar Gallinarum biovar Pullorum based on characterization and evolution of CRISPR sequence. *Veterinary Microbiology*, 203, 81-87.
- Vosik, D., Tewari, D., Dettinger, L., M'ikanatha, N. M. & Shariat, N. W. (2018). CRISPR Typing and Antibiotic Resistance Correlates with Polyphyletic Distribution in Human Isolates of *Salmonella* Kentucky. *Foodborne Pathogenes and Disease*, 15 (2), 101-108.