

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİNDİLERDE SALMONELLA TANISINDA
KÜLTÜR VE REAL-TİME PCR KULLANIMI**

Zafer ATA

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. K. Serdar DİKER**

2011- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Doktora Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: / / 2011

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
Grafikler	xi
Resimler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Salmonella</i> 'ların Klasifikasyonu	3
1.2. <i>Salmonella</i> Nomenklatürü	4
1.3. Etiyoloji	6
1.3.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	6
1.3.2. Üreme İhtiyaçları	7
1.3.3. Koloni Morfolojileri	7
1.3.4. Biyokimyasal Özellikleri	8
1.3.5. Antijenik Yapı	8
1.3.6. Kimyasal ve Fiziksel Ajanlara Duyarlılığı	10
1.3.7. <i>Salmonella</i> 'ların Antibiyotik Dirençliliği	11
1.4. Salmonellozis'in Epidemiyolojisi	12
1.4.1. Konakçıları	12
1.4.2. Dağılım ve İnsidansı	13
1.4.3. Bulaşma	13
1.5. <i>Salmonella</i> 'ların Gıdalarda Bulunuşu	14
1.6. Salmonellozis'in Klinik Bulguları	15
1.7. Salmonellozis'in Patolojisi	16
1.8. Salmonellozis'in Patogenesi	17
1.8.1 Patojenite Adaları	18
1.8.2 Virulans Faktörler	24

1.8.2.1. Virulans Plazmidler	24
1.8.2.2. Toksinleri	25
1.8.2.3. Fimbria	26
1.8.2.4. Flagella	26
1.9. Etken İzolasyon ve İdentifikasyonu	27
1.9.1. <i>Salmonella</i> Saptanmasında Standart Kültür Metotları	27
1.9.2. Besi Yerleri	28
1.9.3. Serotip ve Genus Belirlenmesi	29
1.9.4. İmmunolojik Tanı	30
1.9.5. Moleküler Tanı	31
1.10. Koruma ve Kontrol	34
2. GEREÇ VE YÖNTEM	36
2.1. Gereç	36
2.1.1. <i>Salmonella</i> İzolasyonu için Örnekler	36
2.1.2. Besiyerleri ve Tampon Solüsyonlar	36
2.1.3. Kullanılan Cihaz ve Gereçler	37
2.1.4. Standart Suş	37
2.1.5. Antiserum	38
2.1.6. Real Time PCR'da Kullanılan Buffer, Solüsyon, Primer, Enzimler ve Malzemeler	38
2.1.7. 16S rDNA <i>Salmonella</i> İdentifikasyonunda Kullanılan Buffer, Solüsyon, Primer, Enzimler ve Malzemeler	38
2.2. Yöntem	39
2.2.1. <i>Salmonella</i> İzolasyon ve İdentifikasyonu	39
2.2.1.1. Hindi karkaslarında Ön Zenginleştirme	39
2.2.1.2. Selektif Zenginleştirme	39
2.2.1.3. Selektif- Diferansiyel Besiyerlerine Ekim	39
2.2.1.4. <i>Salmonella</i> İdentifikasyonu	40
2.2.1.5. <i>Salmonella</i> Suşlarının Hareket Muayenesi	40
2.2.2. Aglütinasyon Testleri	41
2.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	42

2.2.4. Real-Time PCR	43
2.2.4.1. Real-Time PCR Analizleri ile TPS'den <i>Salmonella</i> Belirlenmesi	43
2.2.4.2. <i>Salmonella</i> DNA İzolasyonu	43
2.2.4.3. Primerler ve Problar	44
2.2.4.4. PCR Karışımı	44
2.2.4.5. Amplifikasyon Koşulları	44
2.2.4.6. Sonuçların Değerlendirilmesi	44
2.2.5. <i>Salmonella</i> 16S rDNA İdentifikasyonu	45
2.2.5.1. <i>Salmonella</i> DNA İzolasyonu	45
2.2.5.2. PCR	45
2.2.5.3. Amplifikasyon Koşulları	46
2.2.5.4. DNA Agaroz Jel Elektroforezi	46
2.2.5.5. Örneklerin Görüntülenmesi	46
2.2.5.6. DNA Dizi Analizi için PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	46
2.2.5.7. DNA Dizi Analizi	47
2.2.5.8. Amplifikasyon Koşulları	47
2.2.5.9. Ekstensiyon Ürünlerinin Saflaştırılması	47
2.2.5.10. Ekstensiyon Ürünlerinin Dizi Analizi ve Elektroforezi	47
3. BULGULAR	48
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	48
3.2. Serogruplandırma Bulguları	50
3.3. Real-Time PCR Bulguları	51
3.4. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	53
3.5. DNA Dizi Analizi Sonuçları	53
4. TARTIŞMA	60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
ÖZET	70

SUMMARY	71
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	84

ÖNSÖZ

Doğada çok yaygın olarak bulunan *Salmonella* etkenleri, insan ve hayvanlarda infeksiyonlara neden olabildikleri gibi gıda zehirlenmelerinin ve özel bazı lokal infeksiyonların sorumlusu olarak da bilinmektedir. *Salmonella* etkenleri tarafından meydana getirilen enterik infeksiyonların, hayvanlar arasında bulaşma eğiliminin hızlı olması nedeniyle ekonomik önemleri fazladır

Salmonella türlerinin konvansiyonel tekniklerle teşhisi etkenin besiyerlerinde üretilmesi, biyokimyasal ve serolojik testlere dayanmaktadır. Bu işlemlerin tamamlanması en az bir haftalık bir süre almaktadır. Etkenin saptanması amacıyla floresan antikor tekniği (FAT), aglutinasyon ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemlerinden de yararlanılmaktadır. Ancak, bu testlerin spesifiteleri aynı antijenik determinanta sahip olan diğer bakterilerin de saptanabilmeleri gibi nedenlerle sınırlıdır ve bu yüzden hatalı pozitif reaksiyonlar da görülebilir. Bu nedenle, işlemlerin uzun süre alması ve fazla sayıda manipülasyon içermesi alternatif metotların ve özellikle de moleküler tekniklerin kullanımını arttırmıştır.

Hayvansal kaynaklı materyallerden, *Salmonella* etkenlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile tanısı, hem rutin teşhiste hem de araştırma amaçlı çalışmalarda yoğun olarak kullanıma girmiştir. Bu çalışmada, *Salmonella* tanısında kültür ve Real-Time PCR'in kullanımı ile tespit edilmesi ve *Salmonella* suşlarının moleküler yöntemlerle tiplendirilebileceği ortaya konulmuştur.

Tez konunun belirlenmesinde ve yürütülmesindeki katkılarından dolayı danışman hocam Prof. Dr. K. Serdar DİKER başta olmak üzere her konuda yardımlarını esirgemeyen öğretim üyeleri; Prof. Dr. Müjgan İZGÜR, Prof. Dr. Hakan YARDIMCI, Prof. Dr. Ömer M. ESENDAL, Prof. Dr. Mehmet AKAN ve Doç. Dr. Barış SAREYÜPOĞLU, Araş. Gör. Bülent BAŞ, diğer doktora öğrencisi arkadaşlarıma, Anabilim Dalı personeline, moral desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ailem ve eşim Gökçen ATA ve kızım Zeynep ATA'ya teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APHA	American Public Health Association
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CE	Competitive Exclusion
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FDA	U.S.Food and Drug Administration
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
H ₂ S	Hidrojen Sülfür
HPB	Health Protection Branch-Canada
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
IL	Interleukin
IMS	Immunomanyetik Separasyon
IMVIC	İndol, Metil Red, Voges-Proskauer, Sitrat
ISO	The International Organization for Standardization
KCN	Potasyum Siyanür
LIA	Lysine Iron Agar
MR	Multiple-antimicrobial-resistance
NAS	National Academy of Sciences
PCR	Polymerase Chain Reaction
RCF	Relative Centrifugal Field
RPM	Revolutions Per Minute
TPS	Tamponlanmış Peptonlu Su
TSB	Trypticase Soy Broth
TSIA	Triple Sugar Iron Agar
TTB	Tetrathionate Broth
USDA	United States Department of Agriculture
VP	Voges-Proskauer
WHO	World Health Organisation
XLD	Xylose-Lysine-Desoxycholate

ŞEKİLLER

Şekil 1.1	Salmonella'ların intestinal mukozaya invazyonu	18
Şekil 1.2.	<i>S. enterica'nın</i> virulans lokuslarının genetik haritası.	20
Şekil 1.3.	Virulans genlerin genetik organizasyonu	22
Şekil 1.4.	Konak epitel hücrelerine Salmonella'ların invazyon mekanizması	23
Şekil 2.1	<i>Salmonella</i> Latex Test aşamaları	41

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Salmonella'ların kültürel ve biyokimyasal özellikleri	4
Çizelge 1.2.	<i>Salmonella</i> türlerinin ve alttürlerinin klasifikasyonu	4
Çizelge 1.3.	<i>Salmonella</i> türleri ve alttürlerinin ayırıcı özellikleri	5
Çizelge 1.4.	CDC'de kullanılan <i>Salmonella</i> Nomenklatürü	6
Çizelge 1.5.	<i>Salmonella</i> gen adaları, profaj ve virulans plazmid	21
Çizelge 2.1.	İncelenen hindi karkaslarının illere göre dağılımı	36
Çizelge 3.1.	İzole edilen <i>Salmonella</i> spp.'nin özellikleri	48
Çizelge 3.2.	İzole Edilen <i>Salmonella</i> 'ların Serogruplandırma Sonuçlarının Dağılımı	51
Çizelge 3.3.	Kültür ve/veya Real-time PCR Pozitif Örneklerin Dağılımı	52
Çizelge 3.4.	Real-time PCR tekniği ile doğrulanan 50 <i>Salmonella</i> izolatının antibiyotik dirençlilik tablosu	53
Çizelge 3.5.	DNA dizi analizi sonuçları	55
Çizelge 3.6.	<i>Salmonella</i> suşlarının 16S rDNA Kısmi DNA Dizileri	55

GRAFİKLER

Grafik 3.1.	<i>Salmonella</i> Real Time PCR'daki görüntüsü	52
Grafik 3.2.	Sekans analizinde sequeance scanner v 1.0 programı kullanılarak elde edilen ham verilere ait örnek	59

RESİMLER

Resim 2.1.	Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik disklerinin etrafındaki zon oluşumu.	43
Resim 3.1.	XLD agarda <i>Salmonella</i> kolonilerinin görünümü	49
Resim 3.2.	MSRV agarda hareketli <i>Salmonella</i> kolonilerinin görünümü	49
Resim 3.3.	TSIA ve LIA agarda <i>Salmonella</i> kolonilerinin görünümü	50
Resim 3.4.	16S rRNA geninin amplifikasyon ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezindeki görüntüsü.	59

1 .GİRİŞ

Salmonella'lar, dünyada ve Türkiye'de insan ve hayvan sağlığı açısından önemli bakteriyel patojenler arasındadır (arlı ve ark., 2001; Gast, 2003). *Salmonella* infeksiyonlarını önlemek gıda endüstrisi, hayvan sağlığı ve dolayısıyla insan sağlığı açısından önemlidir. Kanatlı ve gıda sektöründe bu infeksiyondan korunma ancak iyi gözlem ve kontrol programları ile başarılabilir (Humbert ve ark., 1997).

Kanatlı hayvanlar, gıda zinciri vasıtasıyla insanlara bulaşabilen *Salmonella*'ların en önemli rezervuarlarından birisi olduğundan (Stone ve ark., 1994; Gast, 2003), resmi yetkililerce önlenmesi zorunlu olarak kabul edilen kanatlı Salmonellozis'i, gıda kaynaklı hastalığın engellenmesinde kanatlı üreticileri için öncelikli hastalık olarak kabul edilmektedir (Oliveira ve ark., 2002). Türkiye'de kanatlı eti tüketiminde piliç eti büyük bir paya sahip olmasına rağmen, hindi eti geleneksel tüketimden bağımsız olarak sofralarda yeni yer almaya başlamıştır. Aile tipi üretime ve entegrasyona elverişli olmasının yanı sıra, hindi etinin içerdiği yüksek düzeyde protein, düşük seviyedeki kolesterol ve kalori düzeyi ile alternatif bir hayvansal gıda olarak kabul edilmesi hindi yetiştiriciliğine olan eğilimi arttırmıştır (Anon, 2001).

Hindi, tavuk etleri ve sakatatları sıklıkla değişik *Salmonella* serovarları ile kontamine olmaktadır. Kontaminasyon özellikle kesim işlemine bağlı olarak, kloakal bölge, ayaklar ve tüylerdeki fekal materyalin çapraz bulaşmasından kaynaklanmaktadır. Kesim işlemi sırasında özellikle tüy yolma ile iç organ çıkarma aşamalarında oluşan çapraz kontaminasyonun, karkas ve iç organların bulaşmasında önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Barrow ve ark., 1988; Uyttendaele ve ark., 1998).

Kanatlılarda salmonellozis, üç farklı hastalığı tanımlar. Bunlar S. Pullorum'un neden olduğu "pullorum hastalığı", S. Gallinarum'un neden

olduğu "tavuk tifosu" (Gast, 2003; Shivaprasad, 2003) ve insanlarda gıda kaynaklı hastalıklarla ilişkili olan farklı grupların serovarları tarafından oluşturulan "paratifo infeksiyonu"dur (İzgür, 2002; Oliveira ve ark., 2002). Tüm dünya genelinde bir değerlendirme yapılacak olursa, kanatlı ürünlerine bulaşan ve insanlarda gıda zehirlenmesi vakalarından en çok izole edilen serovarlar *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis*'dir (Oliveira ve ark., 2002).

1940'lı yıllardan beri, insan ve hayvanlardan spesifik konakçısı olmayan *Salmonella* serovarlarının izolasyonunda hızlı bir artış bulunmaktadır ve bu serovarlar genç kanatlılarda önemli kayıplara neden olmaya devam etmektedir (Oliveira ve ark., 2002). Dünya çapında, paratifo grubu salmonellalar gıda kaynaklı hastalık ajanlarının en yaygın olanları arasındadır ve World Health Organisation (WHO)'nun raporuna göre, Amerika, Avrupa ve Afrika sağlık ajansları yumurta ve tavuk tüketimiyle ilgili olan bu tür hastalıklarda benzer bir artış olduğunu bildirmişlerdir (Rodrigue ve ark., 1990). Ayrıca, geçtiğimiz 20 yılda *S. Enteritidis* Avrupa'nın bir çok ülkesinde (Rabsch ve ark., 2001) ve Amerika'da (Medici ve ark., 2003) gıda kaynaklı bakteriyel zehirlenmelerin en yaygın sebeplerinden biridir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde insanlarda her yıl ortalama 1,4 milyon salmonellozis vakası görülmekle birlikte bunlardan 17,000'i hastanede tedavi edilmekte olup 585'inde ölüm oluşmaktadır. Bu ülkede gıda kaynaklı patojenlerden kaynaklanan infeksiyonların % 26'sından *Salmonella* sorumlu tutulmaktadır (Mead ve ark., 1999).

Salmonella serovarlarını standart laboratuvar metotları ile izole ve tanımlamak oldukça fazla iş gücü ve zaman kaybına neden olmaktadır (Stone ve ark., 1994; Medici ve ark., 1998; Meer ve Park, 1995; Wawerla ve ark., 1999). "Polymerase chain reaction" (PCR) teşhis yöntemi olarak spesifikite, hız ve sensitivitesinin yüksek olması nedeniyle büyük bir avantaj sunmaktadır ve birçok klinik örnek ile yiyecek materyallerinden bakteriyel tanımlama için gittikçe artan bir şekilde kullanılmaktadır (Stone ve ark., 1994; Oliveira ve ark., 2003; Tuchili ve ark., 1995). PCR'in diğer bir avantajı ise, antijenlerin

ekspresyonuna veya bir substratın kullanımına bağımlı olmamasıdır ve antijenlerin biyokimyasal ve fenotipik varyasyonlarına rağmen mikroorganizmaları teşhis edebilmesidir (Hoorfar ve ark., 1999). *Salmonella* deteksiyonunda PCR öncesi bakterinin selektif veya selektif olmayan şekilde zenginleştirilmesi PCR için inhibitör maddelerin azaltılması ve templeyt miktarının arttırılması sonucu duyarlılığın fazlalaşmasına yol açmaktadır. (Candrian, 1995; Schrank ve ark., 2001; Fluit ve ark., 1993).

1.1. ***Salmonella*'ların** Klasifikasyonu

Salmonella ABD'li mikrobiyolog D. E. Salmon tarafından isimlendirildikten sonra tüm türleri tek bir genus adı altında toplanmıştır. *Salmonella*'lar, lipopolisakkarid yapısında somatik (O) antijenine ve protein yapısında olan flagellar (H) antijenine sahiptirler. *S. Typhi* aynı zamanda virulens (Vi) veya kapsüller bir antijene sahiptir. Biyokimyasal olarak genellikle hepsinde laktoz ve sükroz negatiftir (Koneman ve ark., 2006). *Salmonella*'lara ait olan özellikler Çizelge 1.1.'de verilmiştir.

Salmonella cinsi bakteriler ilk kez 1884'de Gaffky (*Bacterium typhosum*) tarafından izole edilmiştir ve 1886'da Salmon ve Smith'in (*Salmonella Choleraesuis*) bu bakterileri bildirmesinden sonra *Salmonella* nomenklatürü oldukça karmaşık ve tartışmalı bir mesele haline almıştır. Kauffman-White şemasına göre 2541 serovarı bulunmaktadır (Popoff ve ark., 2004). *Salmonella*'ların 1 Temmuz 1983'den önce üç türü bulunduğu kabul edilmekteydi ve bunlar: *S. Choleraesuis*, *S. Typhi* ve çoğu serotipin ait olduğu *S. Enteritidis* idi. Günümüzde *Arizona*, *Salmonella* altgrupları ve bütün önceki türler aynı tür olarak düşünülmektedir ve altı farklı altgrupun bulunduğu yedi bölüme ayrılır. Eskiden altgrup V olarak bilinen *S. Bongori*'nin, DNA-DNA hibridizasyon yöntemi ile farklı bir tür olduğu kabul edilmiştir (Reeves ve ark., 1989). Bu nedenle *S. Enterica* alttöre ayrılma ile birlikte artık *Salmonella*'nın iki türü bulunmaktadır (Çizelge 1.2.).

Salmonella türlerinin ve alttürlerinin farklı özellikleri Çizelge 1.3. de verilmiştir (Koneman ve ark., 2006).

Çizelge 1.1 *Salmonella*'ların kültürel ve biyokimyasal özellikleri (Koneman ve ark., 2006)

Salmonella	a, K	Z ā	S ₂ H	r	p	d	ti	a	e r	a	s y	Arj	Orn	Onpg
Cins: Salmonella	Alk/A	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+/-	+	-
Kia, Kligler's iron agar, H ₂ S, hidrojen sülfür, mr,metil red, vp, voges preskauver, ind, indol, sıt,sitrat, pad, fenilalendeaminaz, üre, üreaz, har, hareket, lys, liysin, arj, arjinin, org, ornitin, onpg, o-nitrofenil-P-D-galactopyranoside														

Çizelge 1.2. *Salmonella* türlerinin ve alttürlerinin klasifikasyonu (Koneman ve ark., 2006)

Salmonella enterica

- S. ***enterica*** subsp. ***Enterica*** (I) :
- S. ***enterica*** subsp. ***Salamae*** (II)
- S. ***enterica*** subsp. ***Arizonae*** (III)
- S. ***enterica*** subsp. ***Diarizonae*** (IV)
- S. ***enterica*** subsp. ***Houtenae*** (V)
- S. ***enterica*** subsp. ***Indica*** (VI)

Salmonella bongori (eskiden alttür V olarak bilinirdi)

Salmonellaların iki türü bulunmaktadır :Altı alttüre sahip S. *enterica* ve S. *bongori*

1.2. ***Salmonella*** Nomenklatürü

1966 yılının başlarında WHO sadece alttür I'deki serotipleri adlandırmaya başlamıştır ve diğer tüm alttürlerdeki serotip adlarından vazgeçmiştir. CDC (Center for Disease Control and Prevention) bu pratiği uygulamış ve alttür I de ki serotip isimlerini, 1966'dan sonra tanımlanmış alttür II, IV, V ve S. Bongori'nin adlandırılmamış serotipleri için antijenik formüllerini kullanmıştır.

Çizelge 1.3. *Salmonella* türleri ve alttürlerinin ayırıcı özellikleri (Koneman ve ark., 2006)

Türler	S. Enterica						S. Bongori
	I Enterica	II Salamae	IIIA Arizonae	IIIB Diarizonae	IV Houtenae	V Indica	
Alttürler ^^^Biyokimyasal özellikleri							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG(2sa)	-	-	+	+	-	d	+
Malonat	-	+	+	+	-	-	-
Jelatinaz	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+		-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+
D-Tartrate	+	-	-	-	-	-	-
Galakturoneyt	-	+	-	+	+	+	+
â-Glukoronidaz (MUG)	D	D	-	+	-	D	-
Mukat	+	+	+	-(%70)	-	+	+
Şalisin	-	-	-	-	+	-	-
Laktoz	-	-	-(%75)	+(%75)	-	D	-

(+), %90 veya çoğu suşta pozitif; (-), %90 veya çoğu suşta negatif; D, farklı suşlar tarafından farklı reaksiyon

İlk olarak bir serotipin cins ismi daha sonra serotip kelimesinin kısaltılmışı "ser" yazılır. Ondan sonra da serotip adı yazılır (*Salmonella* serotip veya ser Typhimurium veya *S. Typhimurium*) (Çizelge 1.4.). (Koneman ve ark., 2006)

İnsan ve hayvanlardan izole edilen *Salmonella*'ların birçoğu *S. enterica* subsp. *enterica* (I) alt grubuna dahil olup bu grup bir serovar veya serotip içermektedir. Genellikle, ilk izole edildikleri şehrin ya da ilk izole edildikleri canlı türünün adını alırlar. Örneğin *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin, ya da *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum denildiğinde Dublin serovarı ilk kez Dublin'de, *Typhi* serovarı tifoid ateş belirtisiyle seyreden bir hastalıktan ve Gallinarum serovarı ise tavuktan izole edildikleri

Çizelge 1.4. CDC'de kullanılan *Salmonella* Nomenklatürü (Brenner ve ark., 2000)

Taksonomik durum	Güncel Nomenklatür
Cins (İtalik).....	<i>Salmonella</i>
Tür (İtalik).....	<ul style="list-style-type: none"> • <i>enterica</i> (I, II, IIIa, IIIb, IV ve VI) • <i>bongori</i> (önceleri alttür V olarak bilinirdi)
Serotip (İlk harf büyük , italik değil)	<ul style="list-style-type: none"> • Serotip metinde ilk kez kullanıldığında; serotip adı 'serotip'ya da 'ser.' kısaltmasından sonra yazılır. • Alttür I'e ait serotipler adları ile; alttür II, III, IV, VI ve <i>S. bongori</i>ye ait serotipler antijenik formülleri ile tanımlanır.(Örnek, <i>Salmonella</i> serotip (ser.) Typhimurium, <i>Salmonella</i> II 50:b:z₆, <i>Salmonella</i> IIIb 60:k:z) • Alttür II, IV, VI ve <i>S. bongori</i>'ye ait serotiplerden 1966'dan önce adlandırılanlar varsa adları da yazılır. (Örnek, <i>Salmonella</i> ser. Marina (IV 48:g:z₉;-).

için bu şekilde isimlendirilmişlerdir. Ancak çoğu kitap ve yayında bunlar kısaca *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Gallinarum diye adlandırılırlar ve tür isimleri de serotipi belirtmek için büyük harfle yazılır (İzgür, 2006).

1.3. Etiyoloji

1.3.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Salmonellalar *Enterobacteriaceae* familyasının bir üyesi olup (Barrow, 2000) Gram negatif boyanan, sporsuz, kapsülsüz çomakçıklardır (Bilgehan, 2004). Boyutları 0.7-1.5x2.0-5.0 µm'dir (İzgür, 2006; Gast, 2003). Paratifoid suşların çoğu peritrik flagellaları vasıtasıyla hareketli olmasına karşın, (Barrow, 2000) Pullorum hastalığının etkeni olan, *S. Pullorum* ve Tavuk Tifosunun etkeni olan *S. Gallinarum* hareketsizdir (İzgür, 2002; Li ve ark., 1993). *Salmonellalar* Gram negatif olmalarına rağmen metilen mavisi ve karbol fuksin boyaları ile boyanabilirler (Gast, 2003).

1.3.2. Üreme İhtiyaçları

Salmonellalar fakültatif anaerobiktirler ve hem anaerobik hem de aerobik koşullar altında iyi üreme özelliğine sahiptirler. Üremeleri için gerekli olan ısı derecesi 37°C'dir, ancak bazıları yaklaşık 5-45°C de üreyebilirler. Salmonellalar yaklaşık pH 4-9.0 aralığında üreyebilmelerine rağmen optimum pH'ları 7.0'dır. Uygun olmayan pH koşullarında üreyen etkenler flagella ve fimbriya gibi bazı özelliklerini kaybederler. Salmonellaların besin ihtiyaçları oldukça basittir ve üremelerini destekleyen karbon ve nitrojen ihtiva eden çoğu besiyerinde üreyebilirler (Gast, 2003). *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* nutrient agar veya buyyonda kolayca ürerler. Bu organizmalar selektif zenginleştirme besiyeri olan Selenite-F ve Tetrathionat buyyonda diferansiyel besiyeri olan Brilliant Green, Bismuth Sülfite ve MacConkey agarda üreyebilirler (Shivaprasad, 2000; Shivaprasad, 2003).

Tetrathionatı buyyon, içerdiği pepton ve safra gibi maddelerle salmonellaların üremesini sağlarken, yine içerdiği kalsiyum karbonat, sodyum tiyosülfat, iyot ve potasyum iyodür ile özellikle dışkıda bulunan *Escherichia col*/'lerin üremesini inhibe eder (İzgür, 2006).

1.3.3. Koloni Morfolojileri

Salmonella kolonileri agardaki tipik olarak yaklaşık 2-4 mm çapında, küçük, yuvarlak, S-tipli ve parlak özellik gösterirler (Gast, 2003; İzgür, 2006). *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum*'un kolonileri bu özelliklere ek olarak nutrient agar üzerinde mavi-gri ile grimsi-beyaz renkte, homojen, 3-4 mm veya daha büyük çapa sahiptirler (Shivaprasad, 2003).

1.3.4. Biyokimyasal Özellikleri

Tipik paratifo etkeni olan *Salmonella*'lar mannitol, maltoz, dulcitolu fermente ederken, glikozdan da hem asit hem de gaz oluştururlar. Malonat, sükröz, salisin ve laktozu ise fermente edemezler. H₂S, lizin ve ornitin dekarboksilat pozitifdir, nitratı nitrite indirgerler ve sitratı kullanırlar. Paratifo etkeni olan *Salmonella*'lar üreyi ve jelatini hidrolize edemezler, indol ise negatifdir (Holt ve ark., 1994). Ayrıca Metil-Red pozitif ve Voges-Proskauer negatifdir (Barrow, 2000). *S. Gallinarum*'un dulcitolü fermente etmesine karşılık *S. Pullorum*'un fermente edememesi bu iki mikroorganizma arasındaki en önemli biyokimyasal farklılıktır. Aynı zamanda *S. Pullorum*, genellikle, maltozu da fermente edemez. Bu mikroorganizmalar arasındaki en büyük farklılık *S. Pullorum*'un ornitini hızlı bir şekilde dekarboksile etmesine karşılık, *S. Gallinarum* dekarboksile edemez. Bu biyokimyasal farklılıkları nedeniyle bu iki suş birbirinin biovaryantı olarak tanımlanmaktadır (Shivaprasad, 2003).

1.3.5. Antijenik Yapı

Salmonellalarda önem taşıyan dominant üç çeşit antijen bulunmaktadır. Bunlar; Somatik "O" antijenleri, Flagellar "H" antijenleri ve yüzeysel antijenlerdir. *Salmonella*'lar O antijenleri ile gruplara, H antijenleriyle de serovarlara ayrılır. O somatik antijenleri, bakterilerin hücre duvarındaki lipopolisakkarit katmanın polisakkarit biriminden ibarettir. Isıya, alkole (%96'lık alkole 4 saat) ve asite dirençlidirler. Formol etkisi ile aktiviteleri kaybolur veya çok azalır. Hareketli olsun veya olmasın tüm salmonellalarda en az bir, çoğu kez birden çok sayıda O antijeni bulunur. *Salmonella* cinsi bakterilerde saptanmış 60'dan çok ve değişik yapıda O antijenik grup vardır. *Salmonella*'lardaki O antijenlerinin bazıları *Escherichia*, *Citrobacter*, *Shigella* ve *Proteus* spp. gibi başka bakterilerde de bulunabilirler (Bilgehan, 2004).

Somatik "O" antijenik yapısı, *Salmonella*'ların 60'dan fazla serogruba ayrılmasını sağlayan değişik faktörler içermektedir. Bu faktörler; 1, 2, 3, 4, 5, gibi sayılarla ifade edilmekte ve ortak antijenik faktörleri içeren *Salmonella*'lar aynı grup içerisinde toplanarak grup adları alfabetik harflerle (A, B, Z) isimlendirilmektedir. Şimdiye kadar 67 grup ortaya konmuş olup harfler yeterli gelmediğinden harf + rakamla belirtilmiştir. Örneğin "O" somatik antijenin 9 ve 12 faktörlerini ortak içeren *S. Typhi*, *S. Enteritidis*, *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* bu gruplandırmada D1 serogrubunda yer almışlardır (İzgür, 2006).

"H" flagellar antijenleri protein yapısındadır. 60°C'nin üzerinde ısıtılmakla, alkol, asit ve proteolitik fermentlerin etkisi ile harap olurlar. Formole dirençlidirler. "H" antijenleri birbirlerinden ayrı yapı ve karakterde değişik komponentlerden yapılmışlardır. Bu antijenlerin bir kısmı *Salmonella*'lar için özgüdür ve değişmezler. Bunlara spesifik faz veya Faz: 1 antijenleri adı verilir (Bilgehan, 2004). Bu antijenik faktörler a, b, c, z'ye kadar küçük harflerle ve alfabe harfleri yeterli olmadığından z₁, z₂, olarak adlandırılmışlardır (İzgür, 2006). H antijenlerinden diğer bir kısmı ise kültürlerde üreme esnasında değişerek yerlerine yeni yapıda antijenler belirir. Bu sonuncular birçok *Salmonella*'da rastlanabildiklerinden bunlara da non-spesifik veya Faz-2 antijenleri adı verilir. Bunlar sayılarla (1, 2, 3,) ve bazen harflerle gösterilirler (n, x gibi antijenler hem birinci hem de ikinci safhada bulunurlar) (Bilgehan, 2004). *Salmonella*'ların "H" antijen grubundan sadece bir çeşit Faz antijen faktörlerini içerenler monofazik; hem Faz-1 ve hem de Faz-2 antijenlerini birlikte taşıyanlar ise difazik bakteriler olarak adlandırılmaktadır (İzgür, 2006).

Salmonella'larda bulunan "V_i" antijeni, Somatik O antijeninin en dışında glikolipid yapısında yüzeysel bir antijendir. Tüm *Salmonella*'larda bulunmaz. Bulunması halinde bakterilerin anti-O bağışık serumları ile aglütinasyonunu önler. 60 °C'de bir saat ısıtılan bakterilerden ayrılarak etkinliğini kaybeder. *Salmonella*'ların yüzeysel antijenlerinden polisakkarit

yapıda olan M antijeni nadir olarak, mukoid koloni oluşturan *S. Schotmuelleri* kökenlerinde görülebilir. Bu "O" antijenini maskeleyerek aglütinasyonunu önler (Bilgehan, 2004).

Pilus antijenleri (özellikle "Tip-1 Fimbria" antijenleri) bazı *Salmonella* türlerinde bulunmaktadır (İzgür, 2006). *Salmonella*'lardaki yüzeysel fimbriya antijenlerinin önemi, bu antijenlere karşı antikor içeren aglütinan serumlarla, bakterilerin aglütine olmaları, bu suretle O, H ve Vi antijenlerinin araştırılmasını engellemeleri yönündedir (Bilgehan, 2004).

İzole edilen *Salmonella*'ların serotiplendirilmesi bulundukları O ve H antijenlerinin belirlenmesi ile olur (Gast, 2003). İdentifikasyonda öncelikle "O" grubu antiserumların karışımı kabul edilen *Salmonella* polivalan antiserumu ile yapılan aglütinasyon testinde pozitif sonuç elde edilir ise, incelenen etkenin *Salmonella* spp. olduğu kabul edilip, daha sonra "O" spesifik grup antiserumları (A, B, C, D, ...) ile bu etken tekrar aglütinasyona tabi tutulur. Hareketli *Salmonella* etkenlerinde, bu testlere ilaveten Faz-1 ve Faz-2'ye ait antiserumlar da kullanılarak izole edilen etken serotip düzeyinde identifiye edilir (İzgür, 2006).

1.3.6. Kimyasal ve Fiziksel Ajanlara Duyarlılığı

Genel olarak, *S. Pullorum*, *S. Gallinarum* ve paratifoid etkenlerin dış etkenlere karşı duyarlılıkları aynıdır. *Salmonella*'lar uygun çevre koşullarında birkaç yıl canlılığını sürdürürler, ancak *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* müsait olmayan çevre koşullarına, kimyasallara ve sıcaklığa paratifo etkenlerine göre daha az dayanıklıdır. Örnek olarak *S. Gallinarum* 60°C de 10 dakikada, direkt güneş ışığına maruz kalması durumunda birkaç dk, 1: 1000'lik fenol de, %1'lik potasyum permanganat da 3 dk ve %2'lik formalin de 1 dk içerisinde canlılığını yitirir (Shivaprasad, 2003).

Agarda üreyen *S. Gallinarum* kültürleri çok hızlı bir şekilde virülansını kaybedebilir. *S. Gallinarum* tavukların dışkılarında kapalı kümeslerde, 10 gün; açık kümeslerde 2 günden daha az canlılığını sürdürebilmektedir (Shivaprasad, 2003). Bu bakteriler dış etkenlere karşı oldukça dayanıklı olmasından dolayı, kanatlı işletmelerinde sürekli tekrarlayan *Salmonella* durumlarında su aktivitesinin araştırılması önem taşımaktadır (Oparo ve ark., 1992). Bunlara ek olarak hem *S. Enteritidis* hem de *S. Typhimurium*'un havada birkaç saat canlı kaldığı da bildirilmiştir (McDermid ve Lever, 1996).

1.3.7. *Salmonella*'ların Antibiyotik Dirençliliği

Çiftlik hayvanlarında tedavi, profilaktik veya büyütme faktörü amacıyla düzenli olarak, düşük konsantrasyonlarda antibiyotik kullanımının antibiyotiklere dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında en önemli faktörlerden biri olduğu bildirilmektedir (Tollefson ve ark., 1997). *Salmonella* ve diğer gıda kaynaklı bakteriyel patojenlerde meydana gelen antibiyotik dirençliliği, plazmidler, transpozonlar ve integronlar vasıtasıyla konak hücre bölünmesi sırasında vertikal olarak geçtiği gibi, aynı veya farklı tür ve soylardaki bakteriler arasında transdüksiyon, konjugasyon ve transformasyon vasıtasıyla horizontal olarak da geçmektedir (Holmberg ve ark., 1984).

Antimikrobiyellere dirençli *Salmonella*'lar tarafından oluşturulan infeksiyonların çoğu kontamine hayvansal gıdaların tüketilmesiyle meydana gelmektedir (Tollefson ve ark., 1997).

Multiple-antimicrobial-resistance (MR) *Salmonella* Typhimurium DT104'ün birçok izolatu ampisiline, kloramfenikole, florfenikole, streptomisine, spektinomisine, sulfonamidlere ve tetrasiklinlere karşı dirençli olduğu gösterilmiştir ancak, rutin bir şekilde florfenikol ve spektinomisin direnci gösterilmediği için sıklıkla pentarezistans (beşli dirençlilik) olarak

tanımlanmaktadır. DT104 suşlarının çoğunluğunda bulunan çoklu ilaç dirençliliği streptomisin ve spektinomisin, sulfonamid, ampicilin, kloramfenikol ve florfenikol, tetrasiklin ve (3-laktam antibiyotiklere dirençliliği sırasıyla beş genin varlığında; *aadA2*, *sull*, *floR*, *tetA(G)* ve *blaPI* (varyant formları *blaPSE-1* veya *blaCARB-2*) oluşmaktadır (Boyd ve ark., 2001; Briggs ve Fratamico, 1999).

1.4. Salmonellozis'in Epidemiyolojisi

1.4.1. Konakçıları

S. Pullorum ve *S. Gallinarum*'un doğal konakçıları tavuklardır. Tavuklardan başka hindilerde, bıldırcınlarda, güvercin serçe ve papağanlarda da bu hastalıklar görülmektedir (Pennycott ve Duncan, 1999; Shivaprasad, 2000). Ayrıca *Pullorum* infeksiyonlarının kanaryalarda, kanatlı tifosunun da devekuşlarında görüldüğü bildirilmiştir. Ördeklerin bu patojenlere karşı dirençli olduğu ortaya konulmuştur (Barrow ve ark., 1999; Buchholz ve Fairbrother, 1992).

Konakçı spesifik serovarların (*S. Pullorum*, *S. Gallinarum*) tersine, konakçı spesifik olmayanların (paratifoid serovarların) epidemiyolojileri komplekstir. Bu nedenle de konak canlıda konakçı spesifik olmayan serovarlar hiçbir hastalık belirtisi göstermeksizin çok sayıda mikroorganizmanın sindirim kanalı vasıtasıyla etrafa saçılmasına yol açarlar. Kanatlılar için bulaşma kaynakları kendileri, yem ve çevre olarak sınırlandırılabilir. Ancak infeksiyon kaynağı gene de çok fazladır (Barrow, 2000).

Kanatlılarda paratifo infeksiyonuna neden olan serotipler, aynı zamanda insanlarda görülen non-tifoid *Salmonella* infeksiyonlarına neden

olurlar. CDC'ye göre 2001 yılında *Salmonella*'ların en çok izole edilen 3 serotipi tüm izolatların %50'sini oluşturmuş ve sırasıyla *S. Typhimurium*'un %22, *S. Enteritidis*'in %18 ve *S. Newport*'un %10 olarak tespit edildiği bildirilmiştir (Koneman ve ark., 2006).

1.4.2. Dağılım ve İnsidansı

S. Pullorum ve *S. Gallinarum* dünya çapında sporadik bir dağılıma sahiptir (Barrow, 1992; Mayahi ve ark., 1995; Mdegela ve ark., 2000; Sato ve ark., 1997). İdentifiye edilmiş olan *Salmonella* serotiplerinin %10 kadarı kanatlılardan izole edilmiştir (Gast, 2003).

USDA (United State Department of Agriculture) Ulusal Veteriner Laboratuvarı'nın Temmuz 1998- Temmuz 1999 arasında klinik ve çevre örneklerinden en çok identifiye ettiği paratifo *Salmonella* serovarları, *S. Heidelberg*, *S. Kentucky*, *S. Senftenberg*, *S. Enteritidis*; tavuklardan, *S. Thompson*; hindilerden ise *S. Senftenberg*, *S. Heidelberg*, *S. Hadar*, *S. Muenster* ve *S. Typhimurium*'dur. CDC 1998 de ABD'de insanlardan en çok izole edilen 10 serotip içinde (*S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis*) 7'sinin tavuk ve hindilerden izole edilenlerle aynı olduğunu bildirmiştir. Bu sonuçlar da *Salmonella*'nın insan ve kanatlı rezervuarları arasında önemli bir epidemiyolojik bağlantısının olduğunu işaretlerinden biri olarak gösterilebilir (Gast, 2003).

1.4.3. Bulaşma

Tavuklarda *Salmonella* türleri çok farklı kaynaklardan bulaşabilirler. Özellikle, hayvansal protein içeren kontamine yemler *Salmonella*'nın bulaşmasında önemlidir (Davies ve ark., 1997).

Horizontal bulaşmaya kanatlılar arası direkt temas; (infekte tavuklar arası kanibalismus ve infekte derideki yaralarla temas) kontamine dışkı ve su aracılık eder (Gast, 2003). *Salmonella*'lar, dışkı ve kirli alanların üzerinde uzun süre canlı kalabilmektedirler. Aynı zamanda kanatlı hayvan dışkılarında 28 ay kadar canlılıklarını koruyabilmektedirler (Ward ve ark., 2003).

Kümes çalışanları ve ziyaretçiler korunma önlemleri alınmadığı takdirde, çizmeleri, elleri ve üzerindeki kıyafetler vasıtasıyla etkenleri bir kümesten diğerine hatta bir işletmeden diğerine, bulaştırabilirler. Benzer olarak işletmelere girip çıkan araçlar, vahşi kuşlar, memeliler ve insektler infeksiyonun taşınmasına yol açarlar (Gast, 2003).

Vertikal bulaşma şekli, özellikle, *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* infeksiyonlarında önem taşımakta ve sadece infekte olan kanatlılar değil aynı zamanda sonraki generasyonların da infekte olmasına neden olmaktadır. Vertikal bulaşma mikroorganizmaların ovuma yerleşmesi ve yerleşme sonrası oluşan ovulasyonda yumurtayı infekte etmesi ile oluşabilir. Yumurta bulaşmasında yumurta sarısında bulunan antikor seviyesi bulaşmayı etkilemektedir (Shivaprasad, 2003).

İnsanlardaki nontifoid infeksiyonlarının yaklaşık yarısının sebebinin kontamine tavuk ve ürünlerinin olduğu bildirilmiştir. Bu da insanlara nontifoid etkenlerin bulaşmasında tavukların önemli bir rolünün olduğunu göstermektedir (Shivaprasad, 2003).

1.5. ***Salmonella*'ların** Gıdalarda Bulunuşu

Hayvansal gıdalar içerisinde başta kontamine kanatlı hayvan etleri ve yumurta ile bunlardan yapılan ürünler, kırmızı et ve et ürünleri, kontamine süt, pastacılık ürünleri, krema, dondurma ve soslar ile kabuklu deniz ürünleri,

çoğu insan infeksiyonlarına neden olan en önemli kaynakları oluştururlar (Erol, 2007).

Tavuk, hindi, kaz ve ördek etleri, intestinal sistem veya tüy ve ayaklardaki fekal materyallerden dolayı sıklıkla *Salmonella* ile kontamine olabilmektedir. Çapraz kontaminasyon özellikle tüy yolma, iç organ çıkarma ve soğutma gibi kritik aşamalarda önem taşımaktadır. Ayrıca işçi elleri, alet ve ekipmanlarla da çapraz kontaminasyonun şekillendiği bildirilmektedir (ICMSF, 1996).

1.6. Salmonellozis'in Klinik Bulguları

Kanatlılardaki paratifo infeksiyonu, genellikle, genç hayvanlarla ilgilidir. *Salmonella*'ların yumurtayı infekte etmesi yüksek embriyonik ölümlere yol açar ve yumurtadan yeni çıkan civcivlerde klinik sinyaller oluşmaksızın hızlı bir şekilde ölümler gözlenir. Civciv yaşamının ilk iki haftalık döneminde mortalite ve morbiditenin yüksek olması nedeniyle gelişme geriliği dışında klinik bulgulara nadiren rastlanır. Genç kanatlılarda görülen paratifo infeksiyonların belirtileri, akut septisemiye neden olan diğer bakteri infeksiyonları ile kanatlı *Salmonella* infeksiyonlarına (Pullorum hastalığı ve kanatlı tifosu) büyük bir benzerlik göstermektedir. Paratifo infeksiyonlarındaki klinik belirtiler, genelde, ergin kanatlılarda görülmemesine rağmen, bazı *S. Enteritidis* suşları iştahsızlık, diyare ve yumurta veriminde düşme gibi belirtilere neden olurlar (Gast ve Beard, 1990; Shivaprasad ve ark., 1990).

Paratifo infeksiyonlarındaki belirtiler iştahsızlık ve bunun sonucu zayıflık, körlük, halsizlik, karışmış tüyler, titreme, ısı kaynağına yakın bir arada toplanma, diyare nedeniyle dehidrasyon ve topallıktır (Gast, 2003).

S. Gallinarum veya S. Pullorum ile infekte yumurtalarda kabuk altı ölümler gözlenir. Cıvcıvlerde gelişme geriliği görülür, kloakaları beyaz tebeşir renginde materyalle kaplıdır ve ölümler ikinci veya üçüncü haftada pik seviyeye ulaşır. Pullorum hastalığında güç soluk alma görülebilir. Hayatta kalanlarda gelişme geriliği gözlenir, taşıyıcı olarak kalırlar ve hastalığın bulaşma kaynağını oluştururlar (Shivaprasad, 2003). Tavuklarda görülen S. Pullorum infeksiyonlarında körlük ve tibiotarsal, humeroradial ve ulnar eklemlerde bir şişlik bulunduğu bildirilmiştir (Johnson ve ark., 1992; Mayahi ve ark., 1995).

Akut kanatlı tifosunda, yem tüketiminde ani azalma, halsizlik ve tüylerde karışıklık gözlenebilir. Hastalığın ciddiyetine bağlı olarak, hem pullorum hem de tifo infeksiyonlarında yumurta verimi, fertilitite ve çıkım oranında azalma meydana gelebilir. İnfeksiyonun başlamasından sonra ölümler 4 gün içinde veya 5-10 gün arasında ortaya çıkabilir. Erginlerdeki en önemli semptomlar sırasıyla iştahsızlık, diyare, depresyon ve dehidrasyondur (Shivaprasad, 2003).

S. Pullorum'un oluşturduğu hastalıkta mortalite %0'dan %100'e kadar değişen oranlarda görülmesine karşılık, kanatlı tifosunda bu oran %10 ile %93 arasında kalmaktadır (Shivaprasad, 2003).

1.7. Salmonellozis'in Patolojisi

Ciddi paratifo infeksiyonlarında, hızlı gelişen septisemi nedeniyle yumurta çıkımında, hiçbir lezyona rastlanmaksızın yüksek mortalite oranı ile ölümler meydana gelir. Hastalığın uzun sürmesi durumunda ince bağırsak mukozasında fokal nekrotik lezyonlar ve önemli enteritidis tablosu görülür. Sekum da peynirimsi odaklar gözlenir. Dalak, karaciğer ve böbrek

konjesyone olmuş ve büyümüştür. Fibrino-prulent perihepatitis ve perikarditis vardır (Gast, 2003).

Genç hayvanlarda pullorum ve tifo infeksiyonlarında, perakut vakalarda, hiçbir ciddi lezyon görülmezsizin ani ölümler meydana gelir. Akut vakalarda paratifo infeksiyonlarındaki gibi karaciğer, dalak ve böbrekler büyümüş ve konjesyon bulunur. Genellikle, solunum sistemi belirtileri olan hayvanlarda kalp kasında ve akciğerlerde Marek hastalığındaki tümörlere benzeyen beyaz nodüller bulunabilir (Shivaprasad, 2003).

Ergin hayvanlarda en sık görülen lezyonlar şunlardır: perikarditis, pankreasta ve testislerde görülen beyaz nodüller, ovaryumlardaki patolojik bozukluklar ve son olarak akciğer ile hava keselerinde bulunabilen kazeöz granülomlardır (Shivaprasad, 2003).

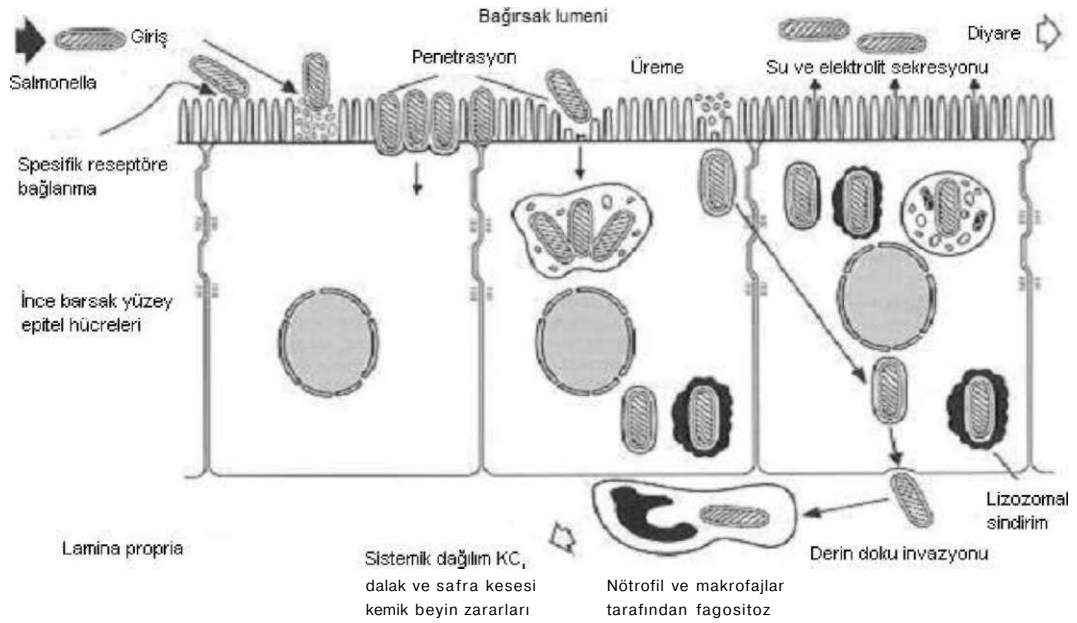
1.8. Salmonellozis'in Patogenesi

S. Pullorum ve S. Gallinarum dahil olmak üzere, *Salmonella* cinsi bakterilerin, konak canlıının iç organlarında (özellikle dalak ve karaciğer) hayatta kalma yetenekleri arasındaki farklılık mononukleer fagositik sistemdeki bilinmeyen bir mekanizmaya bağlanmaktadır (Shivaprasad, 2003).

S. Gallinarum infeksiyonunun tavuklarda IL-6'da değişiklik yapmaksızın IL-1beta'da azalmaya neden olduğu bir çalışmada gösterilmiştir. IL-1beta'daki azalma S. Gallinarum'un sistemik infeksiyonuyla sonuçlanan inflamasyon cevabındaki bir eksiklik olarak yorumlanmaktadır. Başka bir çalışmada S. Pullorum'un bağırsaklarda inflamasyona neden olmadan önce bursa Fabricius'u hedef aldığı gösterilmiştir. Tavuklarda S. Gallinarum infeksiyonunun üçüncü gününde leukositozise neden olduğu ve leukopeninin

ise takip eden yedi gün sonra bittiği bildirilmiştir. Ayrıca *S. Gallinarum* kanda sialik asitte bir artışa ve anemiye sebep olabilir (Shivaprasad, 2003).

Paratifo etkeni olan *Salmonella*'lar, özellikle, iliosekal kavşak noktasına affinite gösterirler ve bütün bağırsak kanalı boyunca epitelyum hücrelerini istila ederler (Gast, 2003). *Salmonella*'ların bağırsak epitelyum hücrelerine invazyonu, sıvı ve elektrolit regülasyonunu etkileyen bir seri patolojik değişikliğe yol açar (şekil 1.1.). Bunun sonucu olarak, diyare ve hücre ölümü gelişir (Henderson ve ark., 1999; Porter ve Holt, 1993). *Salmonella*'ların epitel hücrelerine invazyonu makrofajların bakterileri lamina propria tabakasına geçirmesine yol açabilir (Gast, 2003).



Şekil 1.1. *Salmonella*'ların intestinal mukozaya invazyonu (Giannella, 2006)

1.8.1. Patojenite Adaları

Salmonella'ların virulans genlerinin çoğunluğu *Salmonella* patojenite adaları (SPA) olarak adlandırılan kromozomun üzerindeki bölgelere dağılmış olarak bulunmaktadır (Groisman ve Ochman, 1996; Marcus ve ark., 2000). Bu gen

topluluklarının horizontal gen transferi vasıtasıyla *Salmonella* cinsi olmayan diğer cinslerden edinilmiş olduğu düşünülmektedir. Bu hipotez sıklıkla patojenite adalarının uçlarındaki transpozon insersiyon sekansların veya bakteriyofaj kalıntıları gibi rezidüel genomların bu adalarda bulunan farklı GC içeriği ile karışması esasına dayanmaktadır (Groisman ve Ochman, 1996).

E. coli ve *Salmonella* arasındaki genlerin karşılaştırılmasında birçok farklılık bulunmaktadır. Bu farklılıklardan biri, *Salmonella* spesifik genlerin kromozom üzerinde dağılmış olarak bulunmamasıdır. Bu genler, "adalar" olarak adlandırılan bakteriyel kromozom içinde özel bir bölümde toplanmıştır (Şekil 1.2.). Bu gen adalarının büyüklükleri genel olarak değişmektedir ve yaklaşık tRNA gen haritasına benzemektedir (D'aoust ve Maurer 2007).

Salmonella enterica'da bulunan gen adalarının çoğu patojenite için esansiyel olan önemli fonksiyonları kodlar ve bu lokuslar tür ve cinslerde tanımlanmıştır (Çizelge 1.5.) (D'aoust ve Maurer 2007). Günümüze kadar *Salmonella*'ların kromozomları üzerinde beş *Salmonella* patojenite adası (*salmonella* patojenite adası-1,..., *salmonella* patojenite adası-5 olarak isimlendirilen) tanımlanmıştır (Şekil 1.3.). Bu patojenite adaları sırasıyla sentizom 63, 31, 82, 92 ve 25'de lokalize olmuşlardır (Marcus ve ark., 2000). *Salmonella* patojenite adası-1 üzerinde tip III sekresyon sistemini kodlayan DNA'nın 40 kilobase (kb)'lik bölgesi bulunmaktadır. Tip III bakteriyel transport sistemi; hücreler tarafından bakterilerin içeri alınmasına yol açan hedef hücre aktinine bağlanan SopE ve SptP bakteriyel proteinleri kodlamaktadır (Hayward ve Koronakis, 2002).

Salmonella'lar konak epitel hücrelerinde kolonizasyonu flagellalarının sağladığı hareket yeteneğiyle ve invazyon proteinleri sayesinde gerçekleştirirler. *Salmonella*'larda *inv* ("invazyon") lokusunun rolü invazyon mekanizmasında özel bir öneme sahip olmasıdır. Bu proteinler M hücrelerinin ve enterositlerin Ca^{+2} içeri almalarına ve sitoplazmalarında değişikliğe yol

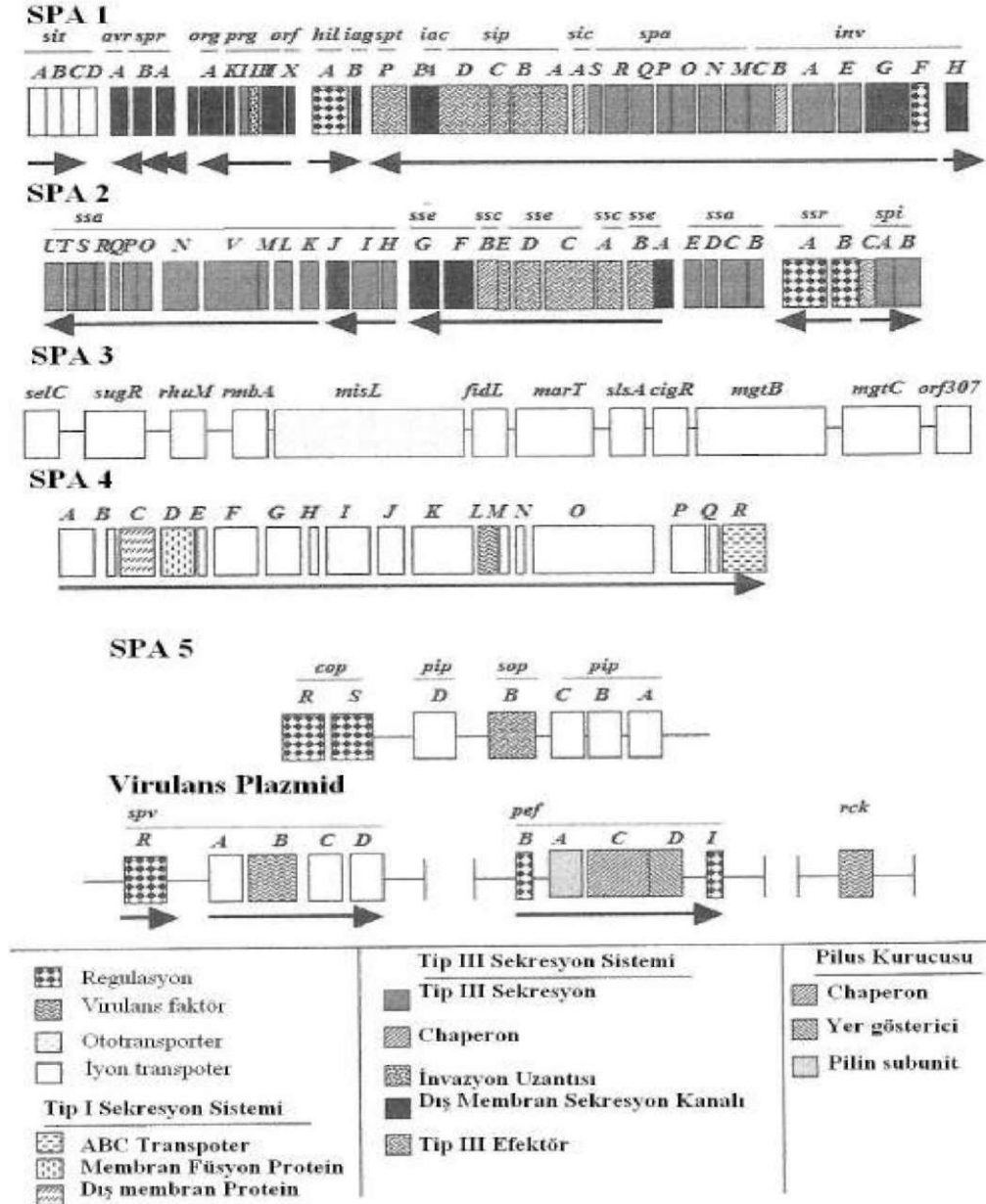
Çizelge 1.5. *Salmonella* gen adaları, profaj ve virulans plazmid (D'aoust ve Maurer 2007).

Lokus	Regülasyon	Fonksiyon(lar)	Dağılım
<i>rfa/waa</i>	<i>waaH</i>	Distal uçta LPS sentezi; serumda canlı kalma	<i>S. enterica</i> ; <i>S. bongori</i>
<i>rfb/wba</i>		O-antijeni biyosentezi; serumda canlı kalma	<i>S. enterica</i> ^a ; <i>S. bongori</i> ^b
SPA1	<i>phoP/Q</i> ; <i>ompR/envZ</i> ; <i>sirA</i>	Hücre invazyonu (enteritis)	<i>S. enterica</i> ^o ; <i>S. bongori</i>
SPA2	<i>phoP/Q</i> ; <i>ompR/envZ</i> ; <i>rpoS</i>	Makrofajlarda canlı kalma; hücre invazyonu	<i>S. enterica</i>
SPA3		Makrofajlarda canlı kalma	<i>S. enterica</i> ^b ; <i>S. bongori</i>
SPA4	<i>waaH?</i> ; <i>sirA</i>	Makrofajlarda canlı kalma?; memelilerde kolonizasyon	
SPA5	<i>sirA</i>	Akışkan sekresyon (enteritis)	<i>S. enterica</i> ^b ; <i>S. bongori</i>
SPA6		Fimbrial operonlar <i>safA-D</i> , <i>tcsA-R</i>	<i>S. enterica</i> "enterik ateş" serovars ^c
SPA7		Vi antijeni; Tip IV pili	<i>S. enterica</i> "enterik ateş" serovars ^d
SPA8		Bakteriosin immunité	<i>S. enterica</i> "enterik ateş" serovars
SPA9		Tip I sekresyon; RTX homologu	<i>S. enterica</i> "enterik ateş" serovars
SPA10		Fimbrial operon <i>sefA-R</i>	<i>S. enterica</i> "enterik ateş" serovars
SGA1		DT104 MDR lokus	<i>S. enterica</i> serovars ^c
Virulans Plazmid	<i>rpoS</i>	Retiküloendotelial sistem içerisinde proliferasyon	<i>S. enterica</i> serovars ^e

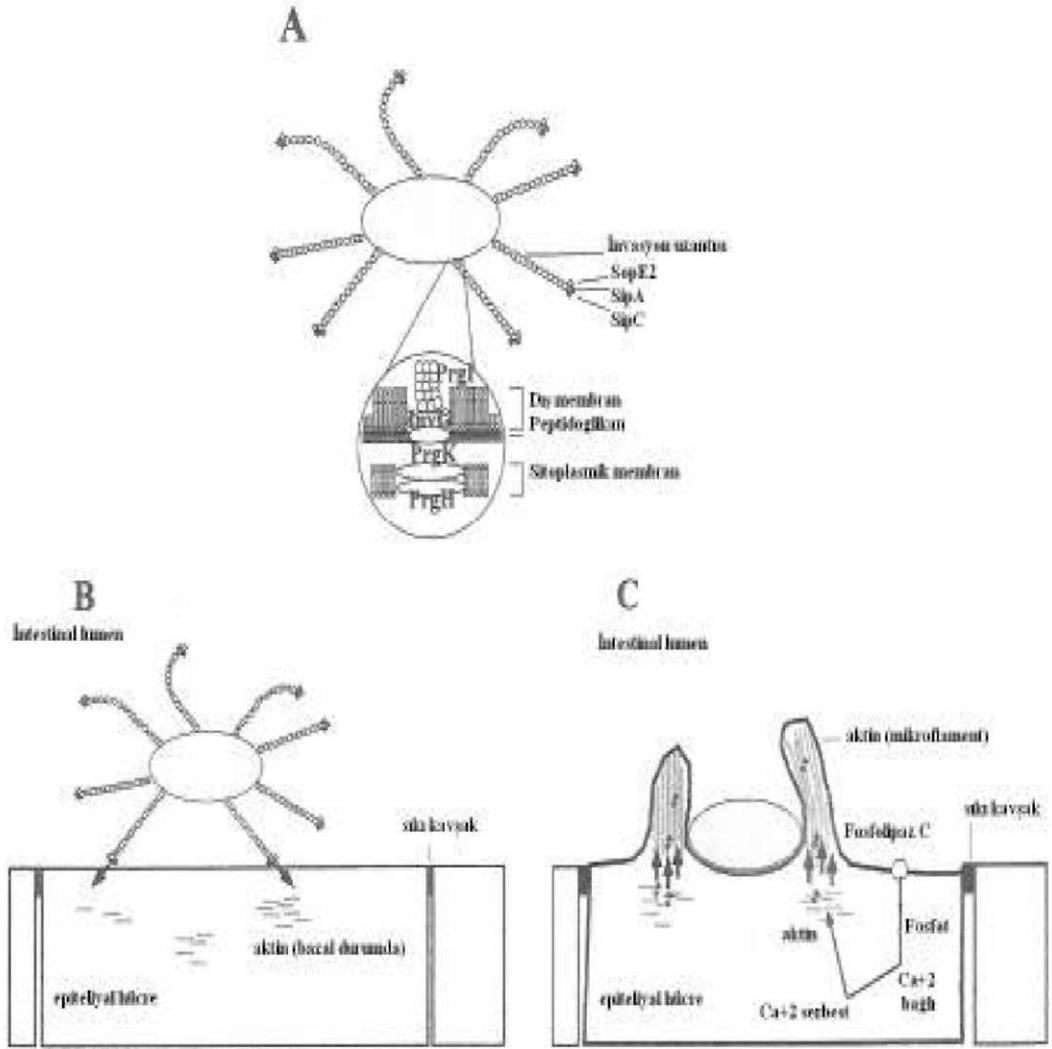
Operonların genetik kompozisyonunda dağılımı
Salmonella serovarları arasındaki lokus içerisinde genetik çeşitlilik
S. enterica serovar Choleraesuis de bulunma
S. enterica serovar Typhi, Paratyphi ve Dublin de bulunma
Salmonella serovarları arasında değişken dağılım

açarak, anatomik yapının bozulmasını neden olurlar. Adheze *Salmonella*'lar aktin polimerizasyonunu etkileyen önemli bir sinyal ile memeli hücreleri içine luminal Ca²⁺ alınmasını gerçekleştirir. *Salmonella*'lar ökaryotik hücrelere Sip

A, Sip B, Sip C, Spt P, Sop E2 ve Sop B invazyon proteinlerini gönderir. Bu proteinler istilacı patojenlerin etrafında mikrofilamentlerin içinde konak hücre aktininin polimerizasyonuna dolayısıyla bakteriyel istilaya sebep olurlar (Şekil 1.4.) (D'aoust ve Maurer 2007).



Şekil 1.3. Virulans genlerin genetik organizasyonu SPA1-5 ve virulans plazmidini kapsar bir şekilde sunulmuştur. Operonlar içinde organizasyonları ve bu genlerin transkripsiyon yönleriyle operonlarını ayıran oklarla birlikte gösterilmiştir. Genlerin bilinen fonksiyonları şeklin altındaki anahtarlar tarif edilmiş olan şablonlar ve gölgelendirmeler ile bu tabloda açıklanmıştır. Bu genlerin bilinmeyen fonksiyonları beyaz kutularda belirtilmiştir. Tip III efektörler tip III sekresyon sistemi yoluyla konak hücre sitoplazması içine giren bakteriyel proteinlerdir (D'aoust ve Maurer 2007).



Şekil 1.4. Konak epitel hücrelerine *Salmonella*'ların invazyon mekanizması (D'aoust ve Maurer 2007).

İkinci tip III sekresyon sistemini 40 kb'lik salmonella patojenite adası-2'deki lokus kodlamakta ve hem epitelyum hücrelerinde hem de makrofajların içinde bakterilerin canlı kalması için *Salmonella*'lar bu sisteme gereksinim duymaktadır. 17kb'lik bölgede aralarında *mgt C* geninin ve 10 okunan sekansın var olduğu salmonella patojenite adası-3 bulunmaktadır. (Alphons ve Jaap, 2005).

Salmonella patojenite adası-4 makrofajlar içinde canlı kalmayı sağlar, 25 kb'lik bölgede bulunur ve toksin sekresyonunu gerçekleştiren tip-I sekresyon sistemini desteklediği varsayılmaktadır (Wong ve ark., 1998).

Salmonella patojenite adası-5'in diareye sebep olan patojenite yeteneğinden sorumlu olduğu ortaya konulmuştur. Bu lokus *Salmonella*'lar arasında oldukça iyi muhafaza edilmiştir. Bakterinin sistemik infeksiyona sebep olması için gerekli olmayan ancak, inflamasyonel yanıt ve intestinal sekresyona neden olması için esansiyel olan *pip A*, *-B*, *-C*, *-D* ve *sop B'* içeren bir çok gen identifiye edilmiştir (D'aoust ve Maurer 2007).

1.8.2. Virulans Faktörler

1.8.2.1. Virulans Plazmidler

Salmonella'nın en az altı serotipinde (serotip Abortusovis, Choleraesuis, Dublin, Enteritidis, Gallinarum/Pullorum ve Typhimurium) bir virulans plazmid bulunduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak, bu serotiplerin tüm izolatları virulans plazmidleri taşımaktadır (Chiu ve Ou, 1996; Rotger ve Casadesus, 1999).

Salmonella'nın bütün plazmidleri 7.8 kb *spv* (salmonella plasmid virulence) lokusunda bulunmaktadır. Bu lokus da *spv RABCD* olarak adlandırılan beş gen bulunmaktadır. *Spv* genlerinin ekspresyonu intraselüler *Salmonellae'nin* artmasında önemli bir rol oynamaktadır (Rotger ve Casadesus, 1999). *Spv R* geninin ekspre ettiği protein, diğer *spv* genlerinin ekspresyonu için pozitif regülatör esansiyel bir proteindir. *Spv B* ADP-riboz-aktin proteinini oluşturmakta, bu yolla ökaryot hücrelerin anatomisinde bozukluğa yol açabilmektedir. (Alphons ve Jaap, 2005).

1.8.2.2. Toksinleri

Salmonella'lar endotoksin, enterotoksin ve sitotoksin olmak üzere üç ayrı toksin sentezlemektedirler (İzgür, 2006). Sentezledikleri bu üç toksin *Salmonella*'ların patojenitelerinde önemli rol oynamaktadır (Gast, 2003).

Endotoksin *Salmonella*'ların lipopolisakkarid hücre duvarında bulunan lipid-A kısmı ile ilgilidir. Bakteri hücrelerinin lize olması durumunda açığa çıkan endotoksin kan dolaşımına karışır ise, ateşe neden olur. *S. Enteritidis*'den elde edilmiş endotoksinin 2 haftalık civcivlere intravenöz olarak verilmesi durumunda dalak ve karaciğerde lezyonlar oluşur (Gast, 2003). Lipopolisakkarid, aynı zamanda bakteri hücrelerini konak savunma sistemindeki fagositler tarafından fagosite edilmelerine karşı korumaktadır (Craven, 1994).

Salmonella'ların sentezlediği enterotoksinler bağırsak epitel hücrelerinden aşırı sıvı salgılamasına sebep olmakta, bu da bağırsak lümeninde sıvı birikimi dolayısıyla diareye neden olmaktadır (Koupal ve Deibel, 1975). Hayvanlardan izole edilen 123 *S. Typhimurium* suşunun %44'ünde enterotoksin belirlenmiştir (McDonough ve ark., 1989). Enterotoksin sentezlemeyen mutant suşlar hücre kültürlerinde daha az mukozal hasara neden olurken, farelerde de daha düşük mortalite oluşturmuştur (Chen ve ark., 1998). *Salmonella*'ların sitotoksinleri protein sentezini inhibe ederek bağırsak epitel hücrelerinde yapısal hasarlara neden olur (Gast, 2003).

Salmonella'nın toksinleri üzerinde yapılan en iyi çalışmalar, (Chary ve ark., 1993; Prager ve ark., 1995) *stn* geni tarafından kodlanan ısı-labil salmonella enterotoksininin (*Stn*) üzerinedir. *Salmonella Typhimurium*'un *stn* geni 749 bp'den oluşur. Bu *stn* geni PCR (Polymerase Chain Reaction) ve Southern blotting teknikleriyle tekrar isimlendirilen *Salmonella Typhi* ve

Salmonella Enteritidis'in de içinde bulunduğu *S. enterica*'nın 14 serovarını kapsayan, 84 suşta var olduğu saptanmıştır (Prager ve ark., 1995).

1.8.2.3. Fimbria

Fimbria (aynı zamanda pilus olarak da isimlendirilir) 2-8 nm genişliğinde ve 0.5-10 uzunluğunda temel olarak fibrin olarak adlandırılan proteinlerin tekrarlayan helikal bir şekilde düzenlenmesiyle oluşan filamentöz yüzeysel yapılardır (Collinson ve ark., 1996). Derleyici, toparlayıcı, yapısal ve biyosentezi de kapsayan proteinleri kodlayan 8-11 gen, genel olarak, 7-9 kb genişliğinde toplanır (Fernandez ve Berenuer, 2000).

Salmonellaların fimbrialarının hedef hücrelere kolonizasyona neden olduğu gösterilmiş olmasına rağmen (Collinson ve ark., 1996), *Salmonella* patogenezinde fimbria'nın rolü henüz anlaşılamamıştır (Van Der Velden ve ark.,1998).

1.8.2.4. Flagella

Birçok *Salmonella*'da motiliteyi kazandıran bir organel olan flagella bulunmaktadır. *Salmonella*'nın flagellar gen sistemi tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Flagellasız serotiplerin flagellasının ve hareketinin bulunmayışının sebebini genetik bilgiyle kavramak mümkündür. Flagellaya sahip olmayan, hareketsiz serotiplerle ilgili yapılan en iyi çalışmalar *Salmonella* Gallinarum/Pullorum üzerinedir (Alphons ve Jaap, 2005). *Salmonella* Gallinarum/Pullorum serotiplerinin her ikisinin genomik yapılarının üzerinde faz 1 flagellin proteinini kodlayan gen olan *fli* C'nin bulunduğu gösterilmiş olmasına karşın, faz 2 flagellin proteinini ekspre eden gen olan *fli* B saptanamamıştır (Dauga ve ark., 1998).

Flagellaya sahip olan *Salmonella*'ların çoğunun faydalandığı flagellin varyasyonu, konakçı savunma sisteminden kaçmayla ilgidir (Alphons ve Jaap, 2005). *Salmonella* kaynaklı infeksiyonlarda, flagellanın rotasyon yönüyle ve flagella vasıtasıyla sağlanan hareketteki flagellanın rolü, *Salmonella*'ların patogeneğinde, ökaryotik hücrelere invazyonunda ve onların adhezyonunda varsayılan rolleri hakkında, birçok çalışma bulunmaktadır (Dibb-Fuller ve ark., 1999; Lockman ve Curtiss 1992).

1.9. Etken İzolasyon ve İdentifikasyonu

Günümüzde gıdalardan *Salmonella*'ların izolasyon ve identifikasyonu için; klasik kültür tekniği, immunolojik yöntemler, impedans, DNA-DNA hibridizasyon, DNA amplifikasyon, IMS (Immunomayetik Separasyon), enzime bağlı antikor-hidrofobik grid membran filtre (Enzyme Linked Antibody Hydrophobic Grid Membrane Filter) gibi farklı analiz metodlarından yararlanılmaktadır (Flowers ve ark., 1992).

1.9.1. *Salmonella* Saptanmasında Standart Kültür Metodları

Salmonella izolasyonu ve identifikasyonu için çok farklı kültür metotları önerilmesine rağmen, çoğu standart metot başlıca dört safhayı gerektiren genel bir planı takip eder. Birinci safha; selektif olmayan ön zenginleştirme, zarar görmüş *Salmonella* hücrelerinin kendilerini yenilemesini ve sayıca az ise üreyerek sayılarının artırması için kullanılır. İkinci safha; selektif zenginleştirme, diğer bakterilerin üremesini baskılarken, *Salmonella* popülasyonunun artmasını sağlar. Üçüncü safha; differansiyel agara ekim, her biri tek bir bakteri hücrelerinden köken alan izole kolonileri elde etmek için kullanılır (Gast, 2003). İç organlardan selektif olmayan agarlara kanlı agar, MacConkey agar v.b. yapılan ekimler de izolasyonda yarar sağlayabilir (İzgür, 2002). Dördüncü safhada; karakteristik *Salmonella* kolonisi

görünüşüne sahip olan kolonilerin serotip ve genus identifikasyonu için serolojik ve biyokimyasal testler yapılır. Aslında, son iki aşama bütün metotlarda ihtiyaç gösterir ancak, zenginleştirme gereksinimi örneklerin niteliğine göre değişir (Gast, 2003).

Gıdalardan *Salmonella*'ların belirlenmesi için ISO (The International Organization for Standardization), AOAC (Association of Official Analytical Chemists), APHA (American Public Health Association), FDA (U.S. Food and Drug Administration), HPB (Health Protection Branch-Canada), ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), NAS (National Academy of Sciences), USDA (U.S. Department of Agriculture) gibi çeşitli kuruluşlar tarafından hazırlanan standartlar bildirilmekte ve bu amaçla kullanılan zenginleştirme sıvı ve katı besi yerleri de farklılıklar göstermektedir (Tietjen ve Fung, 1995).

1.9.2. Besiyerleri

Besiyerleri genel olarak 37°C'de 24 saat inkübe edilir. *Salmonella*'ların izolasyonu ve identifikasyonu için birbirinden farklı besiyerleri geliştirilmiştir. Selektif olmayan ön zenginleştirme besiyerleri için tamponlanmış peptonlu su ve trypticase soy buyyon önerilmektedir (Gast, 2003).

Selektif zenginleştirme için son yıllarda en çok kullanılan besiyerleri tetrathionate ve Rappaport-Vassiliadis buyyonlardır. Tetrahionate buyyon ve Rappaport-Vassiliadis buyyon; klokal svap, intestinal doku, yumurta içeriği ve kanatlı yemlerini de kapsayan farklı tipteki örneklerde, *Salmonella* belirlenmesi bakımından daha hassas bulunmuştur. Rappaport-Vassiliadis buyyon çiğ kanatlı eti ve yumurta içeriğinden *Salmonella* izole etmek için etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Gast, 2003).

Kullanılan çeşitli diferansiyel besiyerleri arasında daha çok tercih edilenler; brilliant green agar, XLD agar, XLT4 agar, bizmut sulfite agar ve Hektoen enteric agar'dır (Gast, 1993). XLT4 agar drag svaplardan ve kümes içi materyalden *Salmonella* izolasyonunda başarıyla tatbik edilmektedir (Miller ve ark.,1991). XLT4 agar ile Hektoen enteric agarın dışkıdan *Salmonella* izolasyonu bakımından karşılaştırılmasında %100'e yakın ölçüde spesifite tespit edilmiş ve XLT4 agar Hektoen enteric agara alternatif olarak düşünülmüştür (Dusch ve Altwegg, 1995).

XLT4 agar, XLD agardan farklı olarak içinde sodyum dezoksilat yerine iyonik olmayan surfaktan bir madde olan tergitol-4 bulunan selektif bir agardır. Bu agar Gram-negatif birçok bakteriyi (*Proteus*, *Providencia* ve *Pseudomonas* dahil), mantarı ve Gram pozitif bakterilerin tamamının üremesini inhibe eder. Buna ek olarak *Citrobacter* türlerinin bir kısmının üremesini engellerken, diğer kısmının nadiren siyah merkezli koloniler oluşturmasına izin verir. H₂S-pozitif *Salmonella* kolonileri 18-24 saatlik inkübasyondan sonra siyah veya siyah merkezli periferi sarı renkli koloniler tarzındadır. İnkübasyona devam edilirse, tamamen siyah veya periferi pembeden kırmızıya değişen siyah merkezli koloniler oluşur. H₂S üretmeyen nadir *Salmonella* suşu pembemsi sarıdan pembeye değişen renkte koloniler meydana getirirler. *Salmonella* olmayan bakteriler bu besiyerinde sarı renkte koloniler oluşturması ile ayrılırlar (Koneman ve ark., 2006).

1.9.3. Serotip ve Genus Belirlenmesi

Selektif agarlarda karakteristik görünümleri ile üreyen *Salmonella* şüpheli kolonilerin serotiplerinin belirlenmesi ve cins identifikasyonunun doğrulanması için başka testler de yapılmaktadır. Bunlar Triple Sugar Iron Agar ve Lysine iron agarın kullanımı ile kombine edilen, muhtemel *Salmonella*'ları ortaya koyan testlerdir (Gast, 2003). Bu besiyerlerinde 37°C'de 24 saat'lik inkübasyondan sonra tipik koloni gösteren *Salmonella*

kolonilerini tanımlamak için biyokimyasal ve diğer testler yapılır (Quinn ve ark. 2004; Anonim, 1998; Shivaprasad 2003).

Salmonella'ların biyokimyasal özelliklerini gösteren, örneklerden elde edilen izolatlar, bütün altgrupların antikorlarını bulunduran polivalan antiserum kullanılarak *Salmonella* olduğu doğrulanır (Koneman ve ark., 2006). Serotiplendirme, spesifik "O" antijenine karşı monovalan antiserumlar ile lam aglütinasyon ve flagellar "H" antijenine karşı tüp aglütinasyon testleri yapılarak tamamlanır (Gast, 2003; Bilgehan, 2004).

Saf kültürden Gram boyama, hareket muayenesi (Bilgehan, 2004; İzgür, 2002) ve bazı biyokimyasal testler yapılır: Bunlar, dekstroz, laktoz, sukroz, mannitol, maltoz, dulcitol, malonat, gelatin, üre, sitrat, ornithine dekarboksilaz, Metil-Red ve Voges-Proskauer, KCN, O-nitrophenyl-beta-D-galaktopyranside (ONPG), indol, hidrojen sulfid testleridir (Anonim, 1998).

1.9.4. İmmunolojik Tanı

Salmonella'ların immünolojik tabanlı testlerle tanısı için kullanılan en önemli metot enzimle bağlantılı immünosorbent assay (ELISA)'dir (Blais ve ark., 1998). Otomatize edilmiş ELISA temelli hızlı test sistemlerinin, çok sayıda örneğin bir arada sonuçlandırabilmesi ve daha az laboratuvar yoğunluğu gibi avantajlarının bulunduğu bildirilmektedir. Ticari olarak günümüzde kullanılan ELISA tabanlı sistemlere örnek olarak EIAFoss (Foss Electronics, Hillerød, Denmark) ve VIDAS (Biomérieux) verilebilir, bu sistemler kanatlı endüstrisinde ve kanatlı etlerinde bakteriyel kontaminasyon varlığını araştırmak için kullanılmaktadır (Keith, 1997; Masso ve Oliva, 1997; Uyttendaele ve ark., 2003).

Salmonella belirlenmesinde antikorları kullanan diğer bir uygulama, immunomanyetik seperasyon (IMS) dur (Shaw ve ark.,1998). Selektif agara ekimden önce IMS kullanımı, yem, kloakal svap, yumurta kabuğu, kanatlı eti ve doku örneklerindeki *Salmonella* kontaminasyonunu geleneksel selektif zenginleştirmeden daha yüksek bir hassasiyetle belirlemektedir (Cudjoe ve Krona, 1997). IMS aynı zamanda hem kültür hem de ELISA vasıtasıyla yumurta içeriğindeki küçük derecede *S. Enteritidis* kontaminasyonunu belirlemek için kullanılmaktadır (Cudjoe ve ark., 1994).

1.9.5. Moleküler Tanı Teknikleri

Konvansiyonel kültür teknikleri ile negatif sonuçların alınması çoğu örnek için birkaç güne ihtiyaç gösterirken, pozitif sonuçların doğrulanması ise daha da uzun sürmektedir. Günümüzde geliştirilen birçok hızlı teknik bulunmaktadır, ancak bunlar *Salmonella* tanısı için geniş ölçüde kullanılmamaktadır. Hızlı tekniklerin çoğu bir gün veya biraz daha fazla zamanda sonuçlandığı için tanı zamanını kısaltmakta ve bir dereceye kadar otomasyona adapte edilebilmektedir (Gast, 2003).

Kanatlılarda *Salmonella* hızlı tespiti için diğer bir yaklaşım da cins ve türe özgü özel DNA sekans problarının kullanılması ile yapılmaktadır. Örneklerden ekstrakte edilen DNA ile probun hibridizasyonu ile pozitif sonuçlar gösterilir. DNA probları yüksek spesifitede olup kümes içi örneklerden ve kanatlı dışkılarından *Salmonella* belirlenmesinde kullanılmaktadır (Cotter ve ark., 1995).

Polymerase chain reaction (PCR) tekniğinin gelişmesi hedef DNA segmentlerinin spesifik amplifikasyonuna izin vermektedir. Bu teknik ile çok yüksek hassaslıkta su, (Feder ve ark., 2001) dışkı, drag svap (Oliveria ve ark., 2002) ve yumurta (Burkhalter ve ark., 1995; Woodward ve Kirwan,

1996) gibi çok farklı örneklerden *Salmonella* tespiti mümkün olmaktadır (Cohen ve ark., 1994).

Dikkatli bir şekilde seçilen DNA problemleri; yüzeysel yapılardan fimbria (Woodward ve Kirwan, 1996), biyokimyasal veya virülans özellikleri taşıyan genler gibi spesifik karakterlere sahip *Salmonella*'ların belirlenmesi için PCR ile birlikte kullanılabilir (Gast, 2003). Gıda orijinli patojenlerin spesifik olarak saptanmasında, Real-time PCR gıda üretim zincirinin her safasında kontamine olan ürünlerin kontrolü için güvenilir, hızlı bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Real-time PCR'ın hızlı sonuç vermesi gibi avantajlarının yanında, konvansiyonel PCR'la karşılaştırıldığında, kross kontaminasyon oranının düşük ve otomasyona yönelik olması ile rutin laboratuvarlar için uygun bir metod özelliğinde olduğu bildirilmektedir (Seo ve ark., 2004).

1980'lerin başında bakterilerin identifikasyon için yeni bir standart geliştirilmeye başlanmıştır. Bakterilerin genetik kodlarının mutasyona en az uğrayan bir parçasının karşılaştırılmasıyla aralarındaki filogenetik ilişkinin gösterilebileceği ortaya konmuştur (Woese ve ark., 1985; Woese, 1987). Bakteri genetik bölgesinde bunun için aday genler 5S, 16S ve 23S rRNA ve bu genlerin arasındaki bölgeleri kapsamaktadır. Günümüzde bakteri taksonomisi amacıyla en yaygın olarak kullanılan DNA bölümü 16S rRNA genidir (Bottger, 1989; Kolbert ve Persing, 1999; Palys ve ark., 1997; Tortoli, 2003).

16S rRNA bakteri hücresi fonksiyonlarında kritik bir komponent olması nedeniyle, önemli ölçüde korunma düzeyine sahiptir. Bu olay, enzim yapmaya ihtiyacı olan genlerde tam tersidir. Bu tür genlerdeki mutasyon genellikle tolere edilebilir, çünkü diğer genler rRNA kadar hücre yapısı için esansiyel (eğer bir bakteri laktozu kullanmak için ihtiyaç duyduğu enzime sahip değilse alternatif şeker ve proteinleri enerji kaynağı olarak kullanabilir) değildirler. Yukarıda açıklanan sebeplerden dolayı çok az sayıda gen 16S

rRNA geni kadar yüksek derecede korunmuştur. 16S rRNA gen dizisindeki absolut değişim oranının bilinmemesine rağmen, bu oran organizmaların ilişkisi ve uzaklığındaki evrimsel gelişim ile gösterilebilir (Kimura, 1980; Pace, 1997; Thorne ve ark., 1998).

16S rRNA gen sekansı yaklaşık 1550 bp uzunluktadır. Bu gen bakteriler arasında farklılığa neden olan değişken ve korunmuş bölgelerden oluşur. Bu genin uzunluğu interspesifik polimorfizm için istatistiksel olarak geçerli ölçümleri ve ayırımı yapmayı sağlayacak kadar yeterlidir. Üniversal primerler, korunmuş ve değişken bölgelere yönelik olarak ya tüm sekansı (yaklaşık 1550 bp'lik bölge) ya da 540 bp'lik alanı amplifiye etmek için komplementer olarak seçilir. Gen üzerinde bulunan değişken bölgeler karşılaştırmalı taksonomi için kullanılır (Chen ve ark., 1989; Relman, 1999). 500 ve 1500 bp kıyaslama ve dizi uzunluğu açısından yaygın olarak kullanılmasına rağmen, dizi analizinde kullanılan sekans bilgisi için farklı uzunluklar seçilebilir (Clarridge, 2004).

16S rRNA gen sekansı çok sayıda bakteri suşunu belirleyebilmektedir. Nükleotid sekansların en geniş bilgi bankası olan Genbank, 90000'nin üzerinde 16S rRNA genine sahip olan 20 milyonun üzerinde sekans bilgisini barındırmaktadır. Bu daha önce sekans bilgisi bulunan ile bilinmeyen bakteri suşunun sekansını karşılaştırılması anlamına gelmektedir (Clarridge, 2004).

Bakteriler arasındaki filogenetik ilişki, farklı gen bölgeleri esas alınarak, gösterilmeye çalışılmıştır. Bu yöntemlerden tüm genom analizine dayalı olarak oluşturulan filogenetik ilişki ortaya koymak oldukça zordur. Bunun sebebi; bakterilerin farklı gen uzunluklarına sahip olması, genetik materyalde değişikliğe yol açan gen dublikasyonları, transferleri, delesyonları, kaynaşmaları ve bölünmelerinin bakteriler arasında oldukça sık görülmesidir. Yukarıda sıralanan nedenlerden dolayı, günümüzde yüzden daha az bakterinin tüm genom karşılaştırılması yapılmıştır (Bansal ve Meyer 2002;

Woese ve ark., 2000). Diğer yöntemlerden biride, 16S rRNA geni analizi dayalı metottur ve tüm gen analiziyle oluşturulan filogenetik ağaçlar ile 16S rRNA geni analiziyle oluşturulan filogenetik ağaçlar bir birinin aynıdır (Bansal ve Meyer 2002).

Daha önce hakkında hiçbir bilimsel veri bulunmayan bir bakterinin identifikasyonu için en çok tercih edilen metot 16S rRNA geni analizidir. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de geniş olarak kullanılan ve otoritelerce bakteri taksonomisi için referans gösterilen en önemli yöntem de 16S rRNA gen analizidir (Garrity ve Holt 2001). Bakterilerde 16S rRNA geni ünersaldır, bu nedenle bütün bakteriler arasındaki genomik ilişki ölçülebilir (Woese ve ark., 1985; Woese, 1987).

1.10. Koruma ve Kontrol

Koruma ve kontrol programlarının etkin olarak yürütülebilmesi için, çok değişik yaklaşımların birlikte organize edilmesi gerekir (Gast, 2003). Yumurta, civciv veya tavuklar sadece *Salmonella* ari damızlık kümeslerden alınmalıdır. Kuluçkalık yumurtalar tam olarak dezenfekte edilmeli ve sanitasyon standartlarına göre kuluçkaya konmalıdır. Kümesler tamamıyla önerilen şekilde temizlenmeli ve dezenfekte edilmelidir. Rodent ve insekt kontrolleri düzenli olarak yapılmalıdır. Biyogüvenlik tam olarak uygulanmalı, kümesler arası ve dışarıdan *Salmonella*'ların girişi engellenmelidir (İzgür, 2002).

Damızlık hayvanlara sadece peletlenmiş ve hayvansal protein kaynağı içermeyen yemler verilmelidir. *Salmonella* infeksiyonlarıyla mücadelede sağaltıma ek olarak yarışla dışlama (competitive exclusion; CE) kültürleri veya aşı uygulanabilir. Bu şekilde uygulanan koruma ve kontrol programlarının hem tavuklarda hem de hindilerde başarıya ulaştığı

bildirilmiştir. Kanatlı tifosu ve paratifo infeksiyonları için aşı geliştirme çalışmaları hızla devam etmektedir. Son yıllarda kanatlı tifosu için *S. Gallinarum* suşunun virulens plasmidinin çıkarılması sonucu oluşturulan mutant suşun infeksiyona karşı korumada ümit verici sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Canlı ve inaktif aşılar paratifo infeksiyonları için koruma sağlasalar da tam bir korumadan söz etmek mümkün değildir (İzgür, 2002).

Bu çalışmada, Marmara, Ege ve İç Anadolu bölgesindeki kesimhanelerden temin edilen hindi karkaslarında *Salmonella*'ların varlığının araştırılması, *Salmonella* tanısında kültür ve Real-Time PCR'ın kullanımı ile identifiye edilmesi ve *Salmonella* suşlarının sekans analizine tabi tutularak tiplendirilmesinin yapılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. *Salmonella* İzolasyonu için Örnekler

Bu çalışmada *Salmonella* izolasyonu amacıyla; Ocak 2008-Ocak 2010 tarihleri arasında soğuk zincirde 4'ncü Kolordu A tipi Gıda Kontrol Müfreze Komutanlığı'na ait Mikrobiyoloji laboratuvarına Eskişehir, Bolu, Bandırma ve İstanbul'da yer alan farklı kesimhanelerden gelen toplam 721 hindi karkası konvansiyonel metotlarla *Salmonella* yönünden incelendi.

Çizelge 2.1. İncelenen hindi karkaslarının illere göre dağılımı

Hindi karkası orijini	Materyalin sayısı
Eskişehir	537
Bandırma	55
İstanbul	121
Bolu	8
Toplam	721

2.1.2. Besiyerleri ve Tampon Solüsyonlar

Çalışmada, aşağıda sıralanan besiyerleri ve tampon solüsyonlar kullanıldı.

- Tamponlanmış Peptonlu Su (MERCK, 107228)
- RVS Broth (MERCK, 107700)
- XLD Agar Base (MERCK, 105287)
- BPLS Agar Base (MERCK, 107237)
- Triple Sugar Iron Agar (MERCK, 103915)

- f. Lysine Iron Agar (OXOID, CM0381)
- g. Trypticase Soy Broth (MERCK, 100525)
- h. Nutrient Agar (MERCK, 105450)
- ı. Gliserin (MERCK, 104093)
- i. Mueller-Hinton Agar (Oxoid, CM0337)
- j. (MSRV) Medium (Merck, 109878)
- k. Agaroz (Prona, EU)

2.1.3. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

- a. Real time PCR sistemi (ABI 7500, ABD)
- b. Kuru ısıtıcı blok (Barnstead/Labline, ABD)
- c. UV transillüminatörlü bilgisayarlı jel dokümantasyon sistemi (Gene, Genius, Bio Imaging, system İngiltere)
- d. Santrifüj (Hettich, Almanya)
- e. Vortex (Biosan, Litvanya)
- f. Hassas terazi (Precisa 220 M SCS, İsviçre)
- g. Klas II güvenlik kabini (Esco , Singapur)
- h. Isıtmalı karıştırıcı cihaz (Velp scientifica, İtalya)
- ı. DNA Thermal Cyclers (Biyometra, Almanya)
- i. Elektroforez tankı ve güç kaynağı (Wealtec elite 3000 plus Amerika)
- j. UV transillüminatörlü bilgisayarlı jel dokümantasyon sistemi (Gene, Genius, Bio Imaging, system İngiltere)
- k. GeneAmp PCR System 3130

2.1.4. Standart Suş

İzolasyon, identifikasyon ve PCR çalışmaları aşamalarında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür

koleksiyonundan sağlanan *Salmonella* suşları (S. Typhimurium, S. Enteritidis, S. Gallinarum, S. Pullorum) kontrol suşu olarak kullanıldı.

2.1.5. Antiserum

İzole edilen etkenlerin cins düzeyinde doğrulanmasında *Salmonella* Latex Aglütinasyon Test (Oxoid, FT0203A) kullanıldı. Ayrıca B ve D1 gruplandırması için *Salmonella* antisera 04 ve 09 Test (DENKA SEIKEN UK.) kullanıldı.

2.1.6. Real Time PCR'da Kullanılan Buffer, Solüsyon, Primer, Enzimler ve Malzemeler

İzole edilen *Salmonellaların* Real Time PCR temelli tekniklerle identifikasyonu ve tiplendirilmesi amacıyla, TaqMan *Salmonella* enterica Detection Kit, (ABI PN 4366104, ABD), MicroAmp™ Optical Adhesive Covers and MicroAmp™ 96-Well Optical reaction Plate with Barcode (PN 4314320, ABD), PrepSEQ™ Rapid Spin Sample Preparation Kit (ABI 4407760, ABD) kullanıldı.

2.1.7. 16S rDNA **Salmonella** İdentifikasyonunda Kullanılan Buffer, Solüsyon, Primer, Enzimler ve Malzemeler

MicroSeq® 500 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (4348228, ABD), MicroSeq® 500 16S rDNA Bacterial Identification Sequencing Kit (4346479, ABD), DNA Extraction PrepMan™ UltraSample Preparation Reagent, ExoSAP-IT® (USB PN 78200, ABD), Montage PCR Filter Unit (Millipore PN UFC7 PCR50, ABD), Microcentrifuge tubes DyeEx® 2.0 Spin Kit (Qiagen PN

63204, Germany), 96-well plates DyeEx 96 Kit (Qiagen PN 63181, Germany), ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer (ABD) kullanıldı.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. *Salmonella* İzolasyon ve İdentifikasyonu

2.2.1.1. Hindi karkaslarında Ön Zenginleştirme

Hindi karkası steril koşullarda homojenize edildikten sonra 25 g alınıp 225 ml TPS bulunan steril stomacher poşetlerine aktarıldı. Hindi karkas örneği TPS'lerde 37°C'de 24 saat inkubasyona bırakılarak ön zenginleştirme işlemi yapıldı (Van Schothorst ve Renaud, 1983).

2.2.1.2. Selektif Zenginleştirme

Ön zenginleştirmeye tabi tutulduktan sonra vortekslenen ekim yapılmış TPS'lardan 1'er ml alınarak selektif zenginleştirme amacıyla 1:10 oranlarında RVS'ye ekimler yapıldı. RVS'ler 42°C'ye kaldırılarak 24 saat inkübe edildi (Van Schothorst ve Renaud, 1983).

2.2.1.3. Selektif- Diferansiyel Besiyerlerine Ekim

RVS'lerden bir öze ile alınarak XLD ve BPLS agara tek koloni düşürecek tarzda ekimler yapıldı. Petriler 37°C'de 24 saatlik inkubasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası XLD agarda üreyen H₂S pozitif siyah veya periferi besiyerinin kendi renginde pembeden kırmızıya değişen siyah merkezli koloniler *Salmonella* şüpheli olarak değerlendirildi. BPLS agarda inkübasyon sonucunda besiyerinin renginin kırmızıya döndüğü ve pembe renkte, oval, şeffaf kolonilerin oluştuğu görüldü (Taylor, 1965; Anon, 1993).

2.2.1.4. *Salmonella* İdentifikasyonu

Oluşan kolonilerden hazırlanan preparatlar Gram boyama yöntemi ile boyanarak mikroskopta incelendi. (Arda ve ark, 1995).

Selektif agarlarda karakteristik görünümleri ile üreyen *Salmonella* şüpheli koloniler cins identifikasyonunun doğrulanması için Triple Sugar Iron Agar ve Lysine iron agara ekimler yapıldı (Gast, 2003). Bu besiyerleri 37°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. TSI agar da üstte kırmızı renk dipte sarı renk ve siyahlaşma gösteren suşlar ile LI agarda dip ve yatıkta mor renk oluşturarak üreyen suşlar *Salmonella* pozitif olarak kabul edildi (Quinn ve ark. 2004; Anonim, 1998; Gast, 2003; Bilgehan, 2004). Her ikisi negatif ise *Salmonella* olumsuz ve biri negatif diğeri pozitif ise diğer biyokimyasal testler yapıldı (Anonim, 1998).

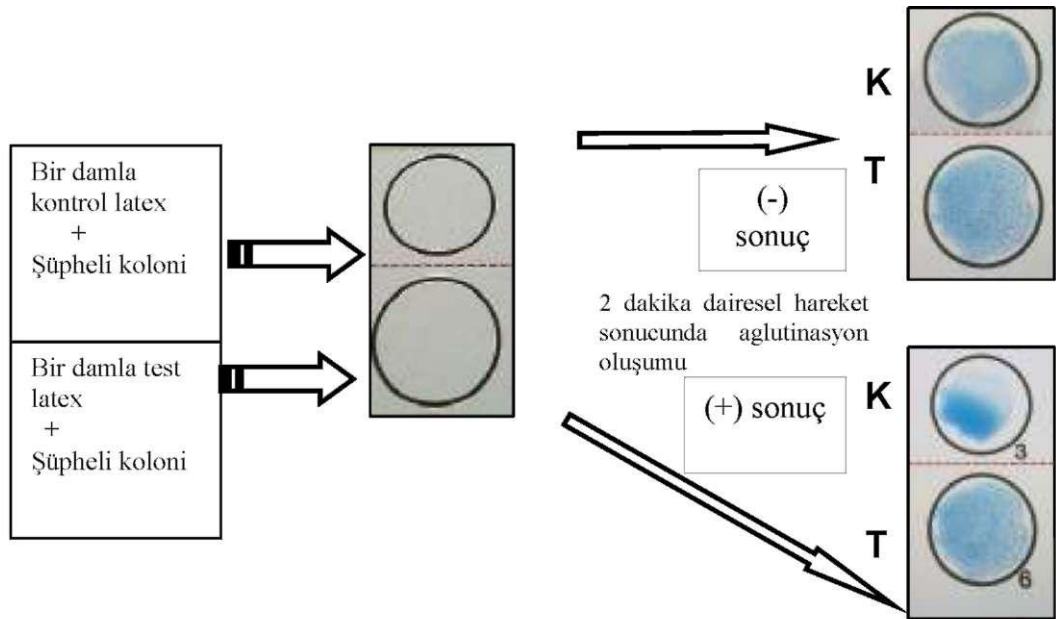
2.2.1.5. *Salmonella* Suşlarının Hareket Muayenesi

TSB'lerde saf olarak üretilmiş *Salmonella* suşlarının kültürlerinden 0,1 ml alınarak MRSV agarın farklı üç noktasına damlatılarak 42°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası inokulasyon yapılan yerde görülen ve 20 mm den büyük olan beyazlaşmış haleler etkenin hareketli olduğunu gösterdi (Desmedt ve ark. 1986).

2.2.2. Aglütinasyon Testleri

Biyokimyasal testlerle *Salmonella* şüpheli olarak kabul edilen koloniler, *Salmonella* Polivalan "O" Antiserumu ile aglütinasyon testine tabi tutuldu (Bilgehan, 2004; Koneman ve ark., 2006). Bu amaçla *Salmonella* Latex Aglütinasyon test kiti içinde bulunan 1 adet Test Latex ve 1 adet Kontrol Latex oda sıcaklığına getirilerek kuvvetlice çalkalandı.

BPLS veya XLD Agar'da üretilen kolonilerden Nutrient agara geçildi. 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra Nutrient agarda üreyen saf koloniler aglütinasyon testi için kullanıldı. *Salmonella* Latex Aglütinasyon test kiti içinde bulunan reaksiyon kartındaki gözlerden birine bir damla kontrol süspansiyonu, diğerine ise yine bir damla test süspansiyonu kondu. Daha önce saf olarak üreyen kolonilerden alınarak test süspansiyonunun üzerine konup, 2 dakika boyunca yuvarlak uçlu öze yardımıyla karıştırıldı. Süre sonunda kontrol süspansiyonu damlatılan gözde aglütinasyon olmaması; buna karşılık test süspansiyonu damlatılan gözde aglütinasyon gözlenmesi *Salmonella* pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 2004; Koneman ve ark., 2006).(Şekil 2.1.).



Şekil 2.1: *Salmonella* Latex Test aşamaları

Ayrıca Grup B ve Grup D₁ serotiplendirmesi için O4 ve O9 antiserumları kullanılarak bu grublara ait olan *Salmonella*'lar tespit edildi.

2.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Hindi karkaslarından izole edilmiş 50 adet *Salmonella* susunun antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk Diffüzyon yöntemine göre yapıldı. Antibiyogram sonucu oluşan zonlar CLSI'e standartlarına göre kıyaslandı (Anon, 2006).

Mueller-Hinton besiyeri petrilere 4 mm kalınlığında olacak şekilde döküldükten sonra soğumaya bırakıldı. Agar plak üzerinden alınan koloniler, içerisinde 4-5 ml Tryptone Soya Buyyon bulunan tüplere transfer edilerek, buyyon kültürü 37°C'de, turbiditesi 0.5 McFarland standardına gelinceye kadar (genellikle 2-6 saat) inkübe edildi. İnoküle edilen süspansiyonun turbiditesi ayarlandıktan sonra, steril bir pipet yardımıyla 0,1 ml alınarak, hazırlanan Mueller-Hinton besiyerine kondu ve steril bir drigalski çubuğu yardımıyla, petrilere homojen bir şekilde yayılması sağlandı (Anon, 2006).

Bir dispenser yardımıyla Polimiksin B (300 IU) (Oxoid, CT 044 B), Metisilin (5 ug) (Oxoid, CT 029 B), Amoksisilin/Klavulanik asit (30 ug) (Oxoid, CT 223 B), Ampisilin (10 ug) (Oxoid, CT 003 B), Tetrasiklin (10 ug) (Oxoid, CT 053 B), Sülfametoksazol/Trimetoprim (25 ug) (Oxoid, CT 052 B), Novobiosin (5 ug) (Oxoid, CT 037 B), Gentamisin (10 ug) (Oxoid, CT 024 B), Mezlosillin (30 ug) (Oxoid, CT0174B) ve Vankomisin (30 ug) (Oxoid, CT 058 B) diskleri her bir petriye 10 adet disk ve aralarında da en az 2,4 cm olacak şekilde eşit olarak yerleştirilerek 15 dakika içerisinde 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan 16-18 saat sonra diskler etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapı CLSI'e standartlarına göre değerlendirildi (Resim 2.1.).



Resim 2.1: Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik disklerinin etrafındaki zon oluşumu.

2.2.4. Real-Time PCR

2.2.4.1. Real-Time PCR Analizleri ile TPS'den **Salmonella** Belirlenmesi

2.2.4.2. **Salmonella** DNA İzolasyonu

Real-time PCR analizleri ile *Salmonella* tespit edebilmek için Applied Biosystems'in kit ve sistemleri kullanılmıştır. İnkübasyon sonrası PCR için alınmış olan 100 adet 750 ul TPS kültürleri içlerine kolon yerleştirilmiş DNase free ependorf tüplerine alınarak 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonlar atıldıktan sonra süpernatant atılarak pelet üzerine 50 u Lysis Buffer ile eklendi ve pipetaj ve vorteks yapılarak homojen halde

karışmaları sağlandı. Kuru Isıtıcı Bloкта (Barnstead/Labline, ABD) 95°'de 10 dakika süre ısıtıldı ve süre bitiminde örnekler 2 dakika süre oda ısısında bekletildi. 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant başka bir DNase free ependorf tüpe alındı ve üzerine 250 ul distile su ile eklendi. 14000 rpm'de 1 dakika tekrar santrifüj edildi Supernatantın 15 ul'si PCR'de template DNA olarak kullanıldı.

2.2.4.3. Primerler ve Problar

InvA geninin spesifik segmentini amplifiye eden primerler ile Taqman problar kullanılmıştır.

2.2.4.4. PCR Karışımı

PCR 30 ul'lik karışım haciminde, 15 ul 2* master mix, 3 ul 10x Assay master mix, 12 ul template DNA, şekilde eklenerek PCR karışımı hazırlandı (ABI 4407760, ABD).

2.2.4.5. Amplifikasyon Koşulları

PCR amplifikasyonu, 95°C'de 15 saniye denaturasyon, 60°C'de 1 dakika primer bağlanması ve ekstensiyon aşamasını içeren 45 siklustan oluşmuştur.

2.2.4.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

Örnekler real-time (eş zamanlı) olarak bilgisayar ekranında Rapid Finder Software programı yardımıyla değerlendirilmiştir.

2.2.5. **Salmonella** 16S rDNA İdentifikasyonu

Salmonella rDNA identifikasyonu için Applied Biosystems'in Microseq 500 identifikasyon kit ve sistemleri kullanılmıştır.

2.2.5.1. **Salmonella** DNA İzolasyonu

İnkübasyon sonrası PCR için alınmış olan 20 adet *Salmonella* suşuna ait Nutrient Agar kültürlerinden 2-3 mm büyüklüğünde koloniler seçilerek 100 ul PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (PN 4322547, ABD) içlerine koyuldu ve vortekslenerek karıştırıldı. Vorteksleme sonrası Kuru Isıtıcı Bloкта (Barnstead/Labline, ABD) 95°C'de 10 dakika süre ısıtıldı ve süre bitiminde örnekler 2 dakika süre oda ısısında bekletildi. 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant 5 ul alınarak DNase free ependorf 500 ul distile su ile dilüe edildi. Karışım başka bir tüpe alındı ve üzerine 250 ul distile su ile eklendi. 14000 rpm'de 1 dakika tekrar santrifüj edildi. Supernatantın 15 ul'si PCR'de template DNA olarak kullanıldı.

2.2.5.2. PCR

16S rRNA geninin 500 baz çiftinin ampfilikasyonu GeneAmp PCR System 9700 de aşağıda açıklanan prosedüre göre gerçekleştirildi.

PCR 30 ul'lik karışım haciminde her bir örnek için; 15 ul master mix, 15 ul template DNA; negatif kontrol amaçlı, 15 ul master mix, 15 ul DNase free distile su pozitif kontrol amaçlı; 15 ul master mix, 15 ul *E. coli* pozitif kontrol DNA karışımları hazırlanarak PCR tüplerine koyuldu.

2.2.5.3. Amplifikasyon Koşulları

Başlangıçta DNA polimerazın aktivasyonu için 95°C'de 10 dakika ısıtma aşaması ardından, 95°C 30 saniye denaturasyon, 60°C'de 30 saniye primer bağlanması ve 72°C'de 45 saniye ekstensiyon aşamasını içeren 30 siklustan ve son olarak 72°C'de 10 dakika final ekstensiyonundan oluştu.

2.2.5.4. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

Örneklerdeki PCR ürünlerinin varlığının belirlenmesi için 20 cm'lik %2'lik agaroz (Prona, EU) jelde, 180 Volt'ta 60 dakika elektroforez edildi.

2.2.5.5. Örneklerin Görüntülenmesi

Jeldeki örnekler biyo-görüntüleme sisteminde görüntülendi ve fotoğrafları çekilerek termal printer (Sony, Japan)'dan kopyaları alındı.

2.2.5.6. DNA Dizi Analizi için PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünlerinin görüntülenerek varlığı ortaya konduktan sonra sekanslama işlemine başlamadan önce PCR ürününün içinde bulunan kullanılmamış olan primerleri ve dNTP'leri uzaklaştırılması işlemi yapıldı. Bunun için ExoSAP-IT® (USB PN 78200, ABD), Montage PCR Filter Unit (Millipore PN UFC7 PCR50, Almanya) kullanıldı.

2.2.5.7. DNA Dizi Analizi

Safılaştırılmış her bir PCR ürününden 7 ul alındı ve üzerine sekanslama için hazırlanmış olan master mix'den 13 ul eklendi.

2.2.5.8. Amplifikasyon Koşulları

Hazırlanan PCR karışımı, 96°C 10 saniye denaturasyon, 50°C'de 5 saniye primer bağlanması ve 60°C'de 4 dakika ekstensiyon aşamasını içeren 25 siklustan oluştu.

2.2.5.9. Ekstensiyon Ürünlerinin Safılaştırılması

Sekanslama için yapılan PCR işleminden sonra kullanılmamış olan terminatör boylarının ve primerlerin uzaklaştırılması amacıyla DyeEx® 2.0 Spin Kit (Qiagen PN 63204, Almanya) ve 96-well plates DyeEx 96 Kit (Qiagen PN 63181, Almanya) ürünleri kullanıldı.

2.2.5.10. Ekstensiyon Ürünlerinin Dizi Analizi ve Elektroforezi

Ekstensiyon ürünleri sekanslarını belirlemek için genetik analiz cihazına ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer (ABD) yüklendi ve ęıkan sonuçlar PubMed Blast sisteminde Nükleotide Blast da (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) değerlendirilerek sonuçlandırıldı.

3. BULGULAR

Bu çalışmada, Ocak 2008-Ocak 2010 tarihleri arasında soğuk zincirde 4'ncü Kolordu A tipi Gıda Kontrol Müfreze Komutanlığı'na ait Mikrobiyoloji laboratuvarına Eskişehir, Bolu, Bandırma ve İstanbul'da yer alan farklı kesimhanelerden soğuk zincir bozulmadan gelen, 721 hindi karkas örneğinde *Salmonella*'ların varlığı, standart kültür ve Real-time PCR teknikleri kullanılarak araştırıldı. İzolatlar *invA* gen sekansı esas alınıp real-time PCR ile doğrulanarak, 10 farklı antibiyotiğe karşı dirençliliği belirlendi. İzole edilen 50 *Salmonella* suşu Grup B ve Grup D₁ antiserumları ile serogruplandırıldı. Bununla birlikte, 5 adet B Grubuna, 5 adet D₁Grubuna ait olan ve 10 adet B ve D₁ Grubuna ait olmayan *Salmonella* suşları DNA dizi analizine tabi tutulup tiplendirilmeye çalışıldı.

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Çalışma sonucunda toplam 721 hindi karkas örneği üzerinde yapılan analizler sonucunda, toplam 50 örneğin (%6.9) *Salmonella* içerdiği saptandı. İzole edilen *Salmonella* suşları hareketli olup aynı biyokimyasal özellikleri gösterdikleri belirlendi. İzole edilen *Salmonella* suşlarının XLD agarda görünümü Resim 3.1., MSR₂ agarda hareketli *Salmonella* kolonilerinin görünümü Resim 3.2., TSIA ve LIA agarda *Salmonella* kolonilerinin görünümü Resim 3.3.ve biyokimyasal özellikleri Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. İzole edilen *Salmonella* spp.'nin özellikleri

Test	Özellik
Gram Boyama	Gram negatif
Hareket	+
Laktoz	-
Sukroz	-
Glukoz	+
H ₂ S	+
Gaz	+



Resim 3.1. XLD agarda *Salmonella* kolonilerinin görünümü



Resim 3.2. MSRV agarda hareketli *Salmonella* kolonilerinin görünümü



Resim 3.3. TSIA ve LIA agarda *Salmonella* kolonilerinin görünümü

3.2. Serogruplandırma Bulguları

Salmonella oldukları belirlenen bütün suşlar, Grup B ve Grup D₁ ticari O4 ve O9 (DENKA SEIKEN, UK) antiserumları kullanılarak Grup B ve Grup D₁ açısından test edildi. 50 *Salmonella* suşundan 13 adedi B grubuna, 21 adedinin ise D₁ grubuna ait olduğu tespit edilirken; 16 *Salmonella* suşunun B ve D₁ grubunda olmadığı tespit edildi (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. İzole Edilen Salmonella'ların Serogruplandırma Sonuçlarının Dağılımı

Orijin		B grubuna ait Salmonella	D ₁ grubuna ait Salmonella	B ve D ₁ grubuna ait olmayan Salmonella
Eskişehir	n/N %	12/40 %30	18/40 %45	10/40 %25
Bandırma	n/N %	1/2 %50	0/2 %0	1/2 %50
İstanbul	n/N %	0/8 %0	3/8 %37.5	5/8 %62.5
Bolu	n/N %	0/0 %0	0/0 %0	0/0 %0
Toplam	n/N %	13/50 %26	21/50 %42	16/50 %32

n/N (n: Ait olduğu serogrup yönünden pozitif örnek sayısı bulunan örnek sayısı; N: Orijin aldığı bölgeden İzole edilen örnek sayısı;)
% (pozitif bulunan örneklerin yüzde oranı)

3.3. Real-Time PCR Bulguları

Çalışma sonunda; standart kültür ve Real-time teknikleri ile *Salmonella* olarak belirlenen izolatların, *invA* gen sekansının bir bölgesine yönelik oluşturulan primer çiftleriyle amplifiye edilen ürüne spesifik bir TaqMan probu kullanılarak yapılan Real-time PCR analizinde, incelenen 50 izolatın 50'sinde (%100) *Salmonella* DNA'sı saptandı. Standart kültür ile izole edilen *Salmonella* suşların tamamı Real-time PCR ile de *Salmonella* olarak doğrulandı. Real-time PCR amplifikasyon ürünleri bilgisayar monitöründe izlenmiş olup bir izolata ait Real-time PCR grafiği Grafik 3.1.'de gösterilmiştir. Kültür ve Real-time pcr pozitif örneklerin illere göre dağılımı Çizelge 3.3.'dedir.



Grafik 3.1. *Salmonella* Real Time PCR'daki görüntüsü.

Çizelge 3.3. Kültür ve/veya Real-time PCR Pozitif Örneklerin Dağılımı

Orijin		Konvansiyonel Yöntemle İzole edilen suş sayısı ve yüzde oranı	Real-time PCR ile Pozitif Belirlenen Örnek Sayısı ve yüzde oranı
Eskişehir	n/N	40/537	40/537
	%	%7.4	%7,4
Bandırma	n/N	2/55	2/55
	%	%3.6	%3.6
İstanbul	n/N	8/121	8/121
	%	%6.6	%6.6
Bolu	n/N	0/8	0/8
	%	%0	%0
Toplam	n/N	50/721	50/721
	%	%6.9	%6.9

n/N (n:pozitif bulunan örnek sayısı; N: analiz edilen örnek sayısı)

% (pozitif bulunan örneklerin yüzde oranı)

3.4. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

PCR ile doğrulanan 50 izolatın 10 farklı antibiyotiğe karşı dirençlilikleri Çizelge 3.4.'de verilmiştir. İzolatlar arasında en fazla dirençlilik %100 ile vankomisin, metisilin, novobiosin'e karşı olduğu belirlenirken, diğer antibiyotiklere dirençlilik oranları %34 ile gentamisine, %30 ile tetrasikline, %10 ile polimiksine ve ampisiline, %8 ile Amoksisilin+Klavunik asite, %4 ile Sülfametoksazol-Trimetoprim olarak saptandı. İzolatların hiçbirinde Mezlosillin direnci izlenmedi.

Çizelge 3.4. Real-time PCR tekniği ile doğrulanan 50 *Salmonella* izolatının antibiyotik dirençlilik tablosu

Antibiyotikler	Dirençli n (%)	Orta derecede dirençli n (%)	Duyarlı n (%)
Tetrasiklin	15 (% 30)	4(%8)	31(% 62)
Polimiksin	5(%10)	1(%2)	44(%88)
Ampisilin	5(%10)	2(%4)	43(%86)
Mezlosillin	0(% 0)	0(% 0)	50(% 100)
Metisilin	50(% 100)	0(% 0)	0(% 0)
Novobiosin	50(% 100)	0(% 0)	0(% 0)
Vankomisin	50(% 100)	0(% 0)	0(% 0)
Amoksisilin+Klavunik asit	4(% 8)	3(%6)	43(%86)
Gentamisin	17(% 34)	8(%16)	25(% 50)
Sülfametoksazol / Trimetoprim	2(%4)	3(%6)	45(%90)

n: izolat sayısı

3.5. DNA Dizi Analizi Sonuçları

DNA dizi analizi için Real-time PCR ile doğrulanan toplam 50 izolatın içinden 20 adet *Salmonella* suşu seçildi. Bu 20 *Salmonella* izolatından; B

serogrubuna (B serogrubuna ait olan *Salmonella* suşu toplam 13 adet) ait olan *Salmonella* suşlarından 5 adet, D₁ serogrubuna (D₁ serogrubuna ait olan *Salmonella* suşu toplam 21 adet) ait olan *Salmonella* suşlarından yine 5 adet ve ne B ne de D₁ serogrubuna (B ve D₁ serogrubundan olmayan toplam 16 adet) ait olmayan *Salmonella* suşlarından 10 adet seçildi.

B serogrubuna ait olan 5 *Salmonella* suşundan beşi de *Salmonella* Typhimurium olarak; D₁ serogrubuna ait olan 5 *Salmonella* suşundan dördü *Salmonella* Enteritidis ve biri *Salmonella* Agona olarak; B ve D₁ serogrubuna ait olmayan 10 *Salmonella* suşu ise *Salmonella enterica* partial 16S rRNA geni olarak tanımlandı (Çizelge 3.5.). *Salmonella* suşlarının 16S rDNA Kısmi DNA Dizi bilgileri Çizelge 3.6.'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. DNA dizi analizi sonuçları

Orijin	5 / B grubuna ait <i>Salmonella</i>	5 / D ₁ grubuna ait <i>Salmonella</i>	10 / B ve D ₁ grubuna ait olmayan <i>Salmonella</i>
Eskişehir	(4 örnek) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	(3 örnek) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	(7 örnek) <i>Salmonella enterica</i> partial 16S rRNA geni
Bandırma	(1 örnek) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	-	(1 örnek) <i>Salmonella enterica</i> partial 16S rRNA geni
İstanbul	-	(1 örnek) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis (1 örnek) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Agona	(2 örnek) <i>Salmonella enterica</i> partial 16S rRNA geni
Bolu	-	-	-

n/N (n: 16s rRNA *Salmonella* identifikasyonu sekans analizinde kullanılan örnek sayısı; N: Grup spesifik ve grup spesifik olmayan *Salmonella* suşu)

Çizelge 3.6. *Salmonella* suşlarının 16S rDNA Kısmi DNA Dizileri*

Suş Nu:	Sekans
1	AACACATGCAATTCGAACGGTAACAGGAAGCAGmGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGC
2	TGCAATTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGTCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATAC
3	GCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGTCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAA
4	ACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCT
5	CTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGmGCTGmTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGT
6	GTCGAACGGTAACAGGAAGCAGmGCTGmTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCAT
7	GCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACC
8	GCCTAACACATGCAAGTCGAAGCAGCTTGTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCG
9	GGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGACTTGTCTGCGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGT
10	GGCCTAACACATGCAAGTCGAAGCAGmGCTGmTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACC
11	TAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGG
12	GTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAA
13	CGGCAGGCCTAACACATGCAATTCGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGmGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTG
14	AACACATGCAATTCGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGmGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCC
15	GCCTAACACATGCAAGTCGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAAC
16	AGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGmGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAA
17	GTCGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGG
18	CAAGTCGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAG
19	AGGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGmGCTGCTnTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGG
20	TGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGA

*1,2,3,4,5 numaralı suşlar *S. Typhimurium*; 6,7,8,10 *S. Enteritidis*; 9 *S. Agona*; diğerleri ise *Salmonella enterica* 'dır.

Çizelge 3.6. Salmonella suşlarının 16S rDNA Kısmi DNA Dizileri Devam

Suş Nu:	Sekans
1	TAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACmCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAG
2	CGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACGGTC
3	ACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTrTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACG
4	AATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTmGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC
5	GCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTmGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCT
6	AACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACmCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTrTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA
7	GCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACmCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTrTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
8	CATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTmGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTG
9	GGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACmCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTGGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCC
10	GCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTmGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
11	AAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACmCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGC
12	ACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACmCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTA
13	GGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACmCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA
14	TGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTTGGT
15	TGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGT
16	ACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTA
17	GATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
18	GGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC
19	ATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
20	TAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACmCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC

Çizelge 3.6. Salmonella suşlarının 16S rDNA Kısmi DNA Dizileri Devam

Suş Nu:	Sekans
1	CTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTAT
2	CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGG
3	ATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCC
4	TGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAGGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT
5	A GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT
6	GGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCT
7	GAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAG
8	AGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGG
9	TAGTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTG
10	GAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAG
11	TAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTT
12	GTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGC
13	GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
14	GAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATG
15	TGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCAC
16	GTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGC
17	TCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCT
18	GGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAG
19	CACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTG
20	ACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTGA

Çizelge 3.6. Salmonella suşlarının 16S rDNA Kısmi DNA Dizileri Devam

Suş Nu:	Sekans
1	GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTAmTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG
2	TGTTGTGGTTAATAACRCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCSGT
3	GCGTGTATGAAGAAGGcmCGGGTTGTAAGTACTTTACAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC
4	
5	ATGAAGAAGGcmCGGGTTGTAAGTACTTTACAGCGGGGAGGAAGGTGTTGCGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGC
6	TCGGGTTGTAAGTACTTTACAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCA
7	GcmCGGGTTGTAAGTACTTTACAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCA
8	CCTTCGGGTTGTAAGTACTTTACAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGTGTTAAATA
9	TATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTAmTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA
10	GcmCGGGTTGTAAGTACTTTACAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCA
11	GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTAmTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCCAGCAATTGACGTTACCCG
12	ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGcmCGGGTTGTAAGTACTTTACAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCCAGCAATTGA
13	TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGcmCGGGTTGTAAGTACTTTACAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCCAGCAATTGACGTT
14	GGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGcmCGGGTTGTAAGTACTTTACAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCCAGCAATTGACGTTACCCG
15	AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGcmCGTAAGTACTTTACAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC
16	ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTAmTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCCAGCAATTGACGTTACCCGAGCA
17	GATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTACAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCCAGCAATTGACGTTACCCG
18	CCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGcmCGGGTTGTAAGTACTTTACAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCCAGCAATTGACGTTACCCGCA
19	ATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGcmCGGGTTGTAAGTACTTTACAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCCAGCAATTGACGTTACCCGCAG
20	TGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGcmCGGGTTGTAAGTACTTTACAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCT

4. TARTIŞMA

Salmonellozis insanlarda ve hayvanlarda enterik ve bazende sistemik olan hastalık durumlarına sebep olan önemli bir bakteriyel infeksiyondur (Koneman ve ark., 2006). Dünya'da ve Türkiye'de paratifoid *Salmonella* etkenleri uzun süredir insanlarda ve kanatlı hayvanlarda önemli sağlık sorunlarına ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu çalışmada, çeşitli illerden temin edilen hindi karkaslarında *Salmonella* etkenlerinin konvansiyonel metotla izolasyonu, Real-Time PCR ile hızlı tanısı ve tespit edilen *Salmonella* suşlarının tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

Kanatlı hayvanların ve insanların zaman zaman sağlığını tehdit eden *Salmonella*'ların bakteriyolojik tanı süreleri oldukça uzun sürmektedir. Bu nedenle de ABD ve bazı Avrupa ülkelerinde optimize edilmiş bir bakteriyolojik sistem kadar güvenilir, fakat daha kısa sürede sonuç alınan yöntemler, geliştirilmeye ve kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemlerden biri PCR-tabanlı testlerdir. Bu testlerde temel olarak *Salmonella*'ların spesifik DNA segmenti aranmaktadır (Bäumler ve ark., 1997; Çarlı ve ark., 2001; Feder ve ark., 2001; Cotter ve ark., 1995; Woodward ve Kirwan, 1996; Oliveria ve ark., 2002; Oliveria ve ark., 2003).

Bu çalışma kapsamında, iki yıllık periyot içerisinde Eskişehir, Bolu, Bandırma ve İstanbul'da yer alan farklı kesimhanelerden gelen toplam 721 hindi karkası örneğinin 50 (%6.9)'sinden *Salmonella* izole ve identifiye edildi. İzolasyon çalışmaları ile ilgili diğer araştırmacıların bulguları farklılık göstermektedir.

Fakhr ve ark. (2006), tarafından Amerika'da satışa sunulan hindi etleri üzerinde yaptıkları çalışmada, 99 hindi eti örneğinden 49'unda *Salmonella* varlığını tespit etmişlerdir. Lammerding ve ark. (1988) 1983-1984 yılları arasında Kanada'da yaptıkları bir çalışmada 230 hindi karkasının 159

(%69,1)'undan *Salmonella* saptadıklarını bildirilmişlerdir. Yine hindi etleri üzerine Arnavutluk'ta yapılan bir çalışmada 134 hindi eti örneğinin 11'inden (%8,2) *Salmonella* izole edildiği ortaya koyulmuş olup; elde edilen izolatların 4'ü *S. Enteritidis*, 3'ü *S. Agona* diğerlerinin de *S. Saint-Paul*, *S. Reading* ve *S. Blockley* ait serovarları kapsadığı ve bir izolatın da tiplendirilemediği belirtilmiştir (Beli ve ark., 2001). Telo ve ark. (1998), kanatlı etlerinden oluşan 80 örnekte *Salmonella* varlığının araştırılması amacıyla yaptıkları çalışmada 7'si tavuk, 2'si hindi eti ve 1'i de hindi karaciğeri olmak üzere toplam 10 örnekten *Salmonella* izole etmişlerdir. Yine bu çalışmada, *S. Enteritidis*'in en sıklıkla saptanan serovar olduğunu bildirmişlerdir. ABD'de 1999-2000 yılları arasında Zhao ve ark. (2001) inceledikleri 194 hindi göğüs eti örneğinden 5'inde (%2,6) *Salmonella* tespit etmişlerdir. Antunes ve ark. (2003)'ünün 1999 yılında Portekiz'de satışa sunulan kanatlı karkaslarından yapmış oldukları bir çalışmada 6 hindi karkasından 4 (%66)'ünün *Salmonella* yönünden pozitif olduğunu göstermişlerdir. Rall ve ark. (2005) 100 kanatlı karkası örneği üzerinde yaptığı çalışmada, örneklerden 29'unu *Salmonella* yönünden pozitif bulmuşlardır.

İzolasyon çalışmaları ile ilgili diğer araştırmacıların bulguları arasındaki farklılığın çeşitli nedenleri vardır. Bu nedenler arasında; kanatlı hayvanların kesiminde haşlama, tüy yolma, iç organ çıkarma ve soğutma aşamalarında bağırsaklarda ruptura bağlı olarak oluşan çapraz kontaminasyonun et ve yenilebilir organların kontaminasyonuna maruz kalmasının işletmeler arasında farklı olmasından dolayı olduğu sayılabilir. Buna ek olarak; soğuk zincirin korunamaması, kesimhane hijyeni, örneklerin işleme prosedürleri, ürünlerdeki bakteri yükü, karkasların paketlenmesi, nakli ve muhafazası arasındaki farklılıklar ile personel ve alet-ekipman hijyeni eksikliğinden doğan kontaminasyonların da bulgular arasında farklılığa etki ettiği düşünülmektedir (Erol, 2007). Ayrıca kümeslerdeki popülasyonun fazla olduğu durumlarda veya taşıma esnasında oluşan strese bağlı olarak, fekal içerikteki patojen yükün artabileceği ve sonuçta da karkaslar arasında çapraz kontaminasyonun şekillenmesiyle son ürünün kontaminasyon düzeyinin

değişebileceği değerlendirilmektedir (Izat ve ark., 1989). İzolasyon bulgularındaki farklılığın diğer bir nedeni de işletmelerde alınan biyogüvenlik önlemlerinin farklı olmasıdır.

Konvansiyonel yöntemlerle *Salmonella* olarak belirlenen 50 izolatin 50 (%100)'si de Real-time PCR ile *Salmonella* olarak saptandı. *InvA* geninin spesifik segmentini amplifiye eden primerler ve Taqman probolar kullanılarak yapılan diğer çalışmalarda da *Salmonella*'lar yüksek duyarlılıkta saptanmıştır (Malorny ve ark., 2007, Eyigör ve ark., 2002).

Malorny ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada tavuk karkaslarından konvansiyonel yöntemlerle izole ettikleri 5 *Salmonella* suşunun beşinde Real-time PCR ile pozitif sonuç verdiğini, bununla birlikte konvansiyonel yöntemle 20 negatif sonucun yine Real-time PCR ile negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da izolasyon sonuçlarının Real-time PCR sonuçları ile tam bir uyum içinde olduğu belirlenmiştir. Chantal ve ark. (2008), 138 hindi eti üzerinde *Salmonella* teşhisindeki konvansiyonel yöntemle Real-time PCR arasında duyarlılığı ölçmek için yaptıkları çalışmada, Real-time PCR'ın *Salmonella* monitörizasyonundan daha kullanışlı bir metot olduğunu bildirmişlerdir. Yine 99 hindi etinden 49'unda *Salmonella* tespit edildiği bir çalışmada, *Salmonella* tanısında klasik kültür metodu ile 11 yanlış pozitif sonuç elde edildiği, Real-time PCR'ın *Salmonella* varlığını ortaya koyduğu bazı örneklerde klasik yöntemin yetersiz kaldığı gösterilmiştir (Fakhr ve ark., 2006).

Real-time PCR üzerine yapılan çalışmalarda klasik kültür metodu ile *Salmonella* negatif bulunan örnekler, Real-time PCR ile pozitif sonuç vermektedir. Bu bulgular *Salmonella* saptanmasında, bu yöntemler arasında Real-time PCR'ın daha hassas olduğunu göstermektedir.

Yapılan bu çalışmada, hindi karkaslarından izole edilen ve Real-time PCR ile doğrulanan 50 izolatın 10 farklı antibiyotiğe karşı antibiyogram testi sonucunda; izolatlar arasında en fazla dirençlilik %100 ile vankomisin, metisilin, novobiosin'e karşı gelişirken, bu antibiyotiği %34 ile gentamisin, %30 ile tetrasiklin, %10 ile polimiksin ve ampisilin, %8 ile Amoksisilin+Klavunik asit, %4 ile Sülfametoksazol / Trimetoprim ve %0 ile Mezlocillin izlemiştir. Diğer araştırmacılar tarafından *Salmonella* suşlarının antibiyotiklere karşı duyarlılık ve dirençlilik profillerinin belirlendiği birçok çalışma bulunmaktadır.

Thakur ve Bajaj (2006) kanatlı karkaslarından izole ettiği 17 *Salmonella* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını incelemişler ve sırasıyla %64.7 vancomycin'e, %58 metisiline, %17.6 ampisiline karşı dirençli olduklarını saptarlarken gentamicin'e karşı direnç gelişimi olmadığını bildirmişlerdir. Kılınç ve Aydın (2006)'nın Kayseri yöresinde kanatlı işletmelerindeki tavuk ve civcivlerden izole ettikleri *Salmonella* suşlarının da gentamisin'e dirençli olmadığını bildirmişlerdir. Logue ve ark. (2003), ise ABD'de hindi kesimhanelerinden topladıkları hindi karkası ve soğutma suyu örneklerinden izole ettikleri *Salmonella* izolatlarının gentamisine dirençlilik oranlarını %26.5 olarak bulmuşlardır. De Oliveira ve ark. (2006), tarafından 2001-2002 yılları arasında kanatlı ve gıda orjinli 79 *S. Enteritidis* izolatının antibiyotik duyarlılığı üzerine yapılan çalışma ile gentamisin dirençlilik oranı %12.7 olarak belirlenirken, De Oliveira ve ark (2005), Brezilya'da aynı özellikteki örneklerden 91 *S. Enteritidis* izolatında gentamisin dirençliliğini %5,5 olarak tespit etmişlerdir.

Bir çok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda, kanatlılardan izole edilen *Salmonella*'ların tetrasikline direnç geliştirdiği gösterilmiştir (White ve ark., 2001; Pedersen ve ark., 2002; Antunes ve ark., 2003; Logue ve ark., 2003; De Oliveira ve ark., 2005; De Oliveira ve ark., 2006; Hernandez ve ark., 2002; Yazıcıoğlu ve ark. 2005; Zhao ve ark. 2007; Chen ve ark., 2004). Bu çalışmada elde edilen tetrasiklin %30 dirençlilik oranından daha düşük

oranda olmak üzere White ve ark. (2001), 1998 yılında ABD'de inceledikleri 50 hindi kıymasından elde ettikleri izolatların, tetrasikline dirençlilik oranlarını %7 olarak bulmuşlardır. Yine benzer bir çalışmada Pedersen ve ark. (2002), Danimarka'da 1995-2000 yılları arasında hindi sürüleri üzerinde yaptıkları araştırmada, %8.5, kanatlı ve gıda orijinli izolatların üzerinde yapılan çalışmalarda sırasıyla De Oliveira ve ark. (2005), %9.1; De Oliveira ve ark. (2006) %8.9 oranında tetrasiklin dirençliliğini saptamışlardır. Zhao ve ark. (2007), 2002-2003 yılları arasında izole edilen 380 *Salmonella* suşlarının tetrasiklin'e %78 oranında direnç gelişimi gösterdiklerini bildirmişlerdir. Yazıcıoğlu ve ark. (2005)'nin, yaptıkları çalışmada tavuk kesimhanelerinin parçalama ünitelerinden aldıkları boyun ve kanat örneklerine ait *Salmonella* izolatlarının, tetrasikline direncinin %5.2 olduğunu tespit ederek, bu çalışmaya göre düşük gerçekleşen bir oranda direnç belirlemişlerdir. Logue ve ark. (2003) hindi karkaslarından izole edilen *Salmonella* suşlarının tetrasikline dirençliliğini %50 gibi bu çalışmaya göre yüksek değerlerde bildirirlerken, tetrasiklin dirençliliği üzerine bu çalışmayla benzer bulgular elde eden araştırmacıların sonuçları bulunmaktadır (Antunes ve ark., 2003; Hernandez ve ark., 2002). Antunes ve ark. (2003)'nin Portekiz'de 1999 yılında tavuk ve hindi karkasları üzerinde yaptıkları çalışmada %36, Hernandez ve ark. (2002), İspanya'da tavuk eti örneklerinden yaptıkları çalışmada, 60 *Salmonella* serovarının %33,9'unu tetrasikline dirençli olduğunu ortaya koymuşlardır. Chen ve ark., (2004), tarafından ABD'deki süpermarketlerden temin ettikleri tavuk, hindi, domuz, sığır ve koyun eti örneklerine ait izolatlarda tetrasikline %61 dirençlilik oluştuğunu araştırmalarında bildirirlerken, bu değerler Çin'deki süpermarketlerden temin edilen aynı hayvansal örneklere ait izolatlarda %27 olarak bulunmuştur.

Çalışmada elde edilen ampisilin dirençliliğinin aksine, Kılınç ve Aydın (2006), % 20, Arvanitidou ve ark. (1998), tavuk karkaslarından elde edilen izolatlarda % 19.4, Logue ve ark. (2003), ise dirençliliği % 17 olduğunu göstermişlerdir. Zhao ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada elde ettikleri izolatlarının %54'ünde, Hernandez ve ark (2002), % 34,8'inde, De Oliveira ve

ark. (2006), % 5,1'inde, De Oliveira ve ark. (2005) ise, % 1,1'inde ampisiline karşı direnç tespit etmişlerdir. Goncagül ve ark. (2004)'nın Bursa'da yaptıkları bir çalışmada, 25 tavuk etinden izole ettikleri *Salmonella*'ların ampisiline dirençliliklerini bu çalışma bulgularına benzer şekilde %8 olarak bildirirlerken, trimetoprim/sülfametaksazol direncini yine %8 olarak bu çalışmaya göre yüksek oranda bulmuşlardır. Kılınç ve Aydın (2006) ve De Oliveira ve ark. (2006), yaptıkları çalışmalarda, sülfametoksazol-trimetoprim'e hiç direnç gelişiminin bulunmadığını belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışma ile sonuçları paralel olan Antunes ve ark. (2003)'nin yaptıkları çalışmada trimetoprim-sulfametoksazole karşı direnç %3.0 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmalarda farklı kaynaklardan izole edilen *Salmonella*'ların antibiyotik dirençliliklerinin ülkelere ve hatta bölgelere göre farklı dağılım gösterdiği görülmektedir. Gıda amaçlı yetiştirilen ve *Salmonella* ile enfekte hayvanların klinik tedavisinde gerekli olan kinolon ve l3>-laktam gibi antimikrobiyel maddelerin kontrolsüz kullanımı bu maddelere karşı dirençliliğin artmasına neden olmaktadır (Angulo ve ark., 2000).

Çiftlik hayvanlarında tedavi, profilaktik veya büyütme faktörü olarak uzun bir periyot halinde, düşük konsantrasyonlarda antibiyotik kullanımının antibiyotiklere dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında en önemli faktörlerden birini oluşturduğu bilinmektedir. Kontamine gıdaların tüketilmesiyle ortaya çıkan infeksiyonların çoğunun hayvan orijinli, antimikrobiyellere dirençli *Salmonella*'lar tarafından oluşturulduğu da ayrıca vurgulanmaktadır (Tollefson ve ark., 1997).

Dünyanın farklı bölgelerinden insan ve hayvanlardan izole edilen *Salmonella*'ların antibiyotik dirençliliklerindeki artış, bunun epidemik olarak yaygınlaştığının bir göstergesi olabilir (Cruchaga ve ark., 2001). *Salmonella* izole edilmiş yiyeceklerden kaynaklanan gıda kaynaklı salgınlar antibiyotik direncinin önemini göstermekte olup, bu da gıda zinciri ile insanlarda dirençli

Salmonella'ların yayılması olasılığının ne kadar yüksek oranda olabileceğini kanıtlamaktadır (Kiessling ve ark., 2002). Sıklıkla Salmonellozis'e sebep olan kanatlı eti ve ürünlerinin önemi burada ortaya çıkmaktadır.

Günümüzde bakteri taksonomisi amacıyla en yaygın olarak kullanılan DNA bölümü 16S rRNA genidir (Bottger, 1989; Kolbert ve Persing, 1999; Palys ve ark., 1997; Tortoli, 2003). Bu çalışmada, seçilen *Salmonella* suşlarının tiplendirilmesi amacıyla 16S rRNA sekans analizi yapılmıştır. Sonuç olarak, B serogrubuna ait olan 5 *Salmonella* suşundan beşi de *Salmonella* Typhimurium olarak; D₁ serogrubuna ait olan 5 *Salmonella* suşundan dördü *Salmonella* Enteritidis ve biri *Salmonella* Agona olarak; B ve D₁ serogrubuna ait olmayan 10 *Salmonella* suşu ise *Salmonella enterica* partial 16S rRNA geni olarak Nükleotide Blast da tanımlandı.

Gerek yurtiçinde gerekse yurt dışında *Salmonella*'nın 16S rRNA sekans analizi kullanılarak tiplendirilmesi çalışmalarının sayısı oldukça azdır. Stanley ve ark. (1994), D₁ serogrubuna ait olduğu bilinen *Salmonella* suşlarının 16S rRNA geni üzerine yaptıkları çalışmada, her bir serotipin spesifik bir profil çizdiğini göstermişlerdir. Çalışmanın bu şekilde sonuçlanmasıyla da araştırmacılar, laboratuvarlarda epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan standart metotların doğrulanmasında 16S rRNA geninin kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Patrick ve ark. (2003), 500 bp'lik 16S rRNA sekans analizi ile 37 farklı bakteri suşu üzerine yaptıkları çalışmada; bu test ile tüm bakterileri izolatlarını birbirinden ayırmışlar ancak, %81.1 oranında identifikasyon başarısı elde edilebilmiştir. Bunun nedeninin de 500 bp'lik 16S rRNA sekans analizine dayalı genetik bilginin gen bankasında yeterli olmadığı düşünülmüştür. Buna ek olarak, tüm 16S rRNA sekans analizinin kullanımının mikrobiyoloji laboratuvarları için daha iyi bir seçenek olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan diğer iki çalışmanın sonuçları, bu çalışmanın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Mark ve ark. (1993), 300 bakteri suşunu 16S rRNA sekans analiz yaparak 8 cins ve 28 tür veya serotipe ayırdıklarını; bunlardan *Salmonella* genusuna ait 6 serotipin

(*Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Choleraesuis) bulunduğunu ifade etmişlerdir.

Salmonellalar gibi izolasyon ve identifikasyonun zor, pahalı, bir çok prosedür gerektiren ve üretilmesi için uzun zamana gerek duyulan mikroorganizmalardan biride mycobacterium cinsi bakterilerdir. 500 bp'lik 16S rRNA sekans analizi ile Mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonu için yapılan çalışmada, 328 suşun %95,1'i kompleks, grup ve tür düzeyinde ayırımı yapılmıştır. Ancak bunlardan tam doğru olarak, %62,5'i tür düzeyinde identifiye edilebilmiştir (Hall ve ark.,2003).

16S rRNA sekans analizi tekniğinin hastalık etkenlerinin hızlı ve doğru tanısında izolasyon ve identifikasyon çalışmalarına göre avantajları bulunmaktadır. B ve D₁ serogrubuna ait olan *Salmonella* suşlarının tiplendirilmesinde %100 oranında bir başarı sağlanmıştır. Ancak, bu veri serotiplendirmenin yapılamaması nedeniyle serolojik tanı ile desteklenememiştir. Tür ve genus belirlenmesinde "altın standartın DNA-DNA hibridizasyonun bildirilmiş olmasına rağmen; bu tekniğin zor, sadece birkaç laboratuvarın uygulayabildiği ve tür tanısı kullanımında her zaman bir korelasyon vermemesi nedeniyle, araştırmacılar arasında çok daha kolay sonuç vermesiyle yeni "altın standart"ın 16S rRNA sekans analizi olduğunun belirtilmesi bu çalışmada bulunan sonucun önemini ortaya koymaktadır (Fournier ve ark., 2003; Harmsen ve Karch, 2004).

Çalışmada 16S rRNA sekans analizi sonucu B ve D₁ serogrubuna ait olmayan 10 *Salmonella* suşu ise *Salmonella enterica* partial 16S rRNA geni olarak tanımlanmıştır. Bu sonuç, cins düzeyindeki 10 *Salmonella'nın* tür düzeyinde de *Salmonella enterica* olarak tanısının yapılmış olmasına rağmen, serotip düzeyinde identifiye edilemediğini göstermiştir. 500 ve 1500 bp kıyaslama ve dizi uzunluğu açısından yaygın olarak kullanılmasına

rağmen, dizi analizinde kullanılan sekans bilgisi için farklı uzunluklar seçilebilir. Bunun sebebi, seçilen 500 bp'lik 16S rRNA sekans analizinin bu identifikasyon için yeterli bulunmadığı olarak düşünülmektedir. 16S rRNA geninin ortalama 1550 bp uzunluğunda olduğu göz önünde bulundurulduğunda, bu uzunluğun bakteri identifikasyonunda daha spesifik olarak kullanılacağı değerlendirilmektedir (Clarridge, 2004).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada, Eskişehir, Bolu, Bandırma ve İstanbul'da yer alan farklı kesimhanelerden gelen 721 hindi karkas örneğinin 50'sinde (% 6,9) *Salmonella*'ların varlığı, klasik kültür ve Real-time PCR teknikleri kullanılarak ortaya konmuştur.

Gıda üretim zincirinin her safasında kontamine olan ürünlerin hızlı ve güvenilir olarak kontrolü için, *Salmonella* varlığını ortaya koyan, otomasyona yönelik, çapraz kontaminasyon oranının düşük Real-time PCR metodunun kullanımı önerilmektedir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hijyen ve biyogüvenlik önlemleri alınmalıdır. İşletmelerdeki *Salmonella* kontaminasyonu gözle görülür bir olgu olmadığı için, işletmede yapılan biyogüvenlik işlemlerinin kalitesini ölçmek ve tamamlamak amacıyla, bu konuda çalışan iyi bir laboratuvar tarafından uygulanan iyi düzenlenmiş bir bakteriyolojik izlemeye ihtiyaç vardır.

16S rRNA sekans analizi tekniğinin hastalık etkenlerinin hızlı ve doğru tanısında izolasyon ve identifikasyon çalışmalarına göre çok avantajları bulunmaktadır, ancak identifiye edilecek mikroorganizmaya göre sekanslama yapılacak gen uzunluğunun iyi belirlenmesi gerekmektedir.

Yapılan bakteriyolojik gözlem sayesinde işletmede ve kesimhanede *Salmonella* tespit edildiğinde hemen olası kontaminasyon yok edilmeye çalışılmalıdır.

ÖZET

Hindilerde *Salmonella* Tanısında Kültür ve Real-Time PCR Kullanımı

Bu çalışmada, Marmara, Ege ve İç Anadolu bölgesindeki kesimhanelerden temin edilen hindi karkaslarında *Salmonella*'ların varlığının araştırılması, *Salmonella* tanısında kültür ve Real-Time PCR'ın kullanımı *Salmonella* suşlarının sekans analizine tabi tutularak tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışma sonucunda Eskişehir, Bolu, Bandırma ve İstanbul'dan gelen, 721 hindi karkas örneği üzerinde yapılan analizler sonucunda, toplam 50 örneğin (%6.9) *Salmonella* içerdiği saptandı. İzole edilen 50 *Salmonella* suşu Grup B ve Grup D₁ antiserumları ile serogruplandırılmış olup 50 *Salmonella* suşundan 13 adedi B grubuna, 21 adedinin ise D₁ grubuna ait olduğu tespit edilirken; 16 *Salmonella* suşunun B ve D₁ grubunda olmadığı tespit edildi.

İzolatlar *invA* gen sekansı esas alınıp Real-time PCR ile doğrulanarak, 10 farklı antibiyotiğe karşı dirençlilikleri incelenmiştir. Vankomisin, metisilin, novobiosin'e %100, gentamisine %34, tetrasikline %30, polimiksine ve ampisiline %10, Amoksisilin+Klavunik asite %8, Sülfametoksazol-Trimetoprim ise %4 olarak dirençlilik saptandı. İzolatların hiçbirinde Mezlosillin direnci izlenemedi.

DNA dizi analizi ile B serogrubuna ait olan 5 *Salmonella* suşundan beşide *Salmonella* Typhimurium olarak; D₁ serogrubuna ait olan 5 *Salmonella* suşundan dördü *Salmonella* Enteritidis ve biri *Salmonella* Agona olarak; B ve D₁ serogrubuna ait olmayan 10 *Salmonella* suşu ise *Salmonella enterica* partial 16S rRNA geni olarak tanımlanmıştır.

Sonuç olarak, hindi karkaslarında *Salmonella* bulunmuş olup halk sağlığının korunması amacıyla çiftlikten sofraya kadar her aşamada hijyenik önlemlerin alınması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Antibiyotik dirençlilik, hindi karkas, Real-time PCR, *Salmonella*, Sekanslama

SUMMARY

The Use of Real-Time PCR and culture in *Salmonella* diagnosis of turkeys

In this study, turkey carcasses taken from Marmara, Aegean and Central Anatolia regions were used to detect the presence of *Salmonella* spp. by Real-time PCR and culture method. Molecular typing of isolated *Salmonella* spp. by sequence analysis is also performed in this study.

As a result of the study *Salmonella* spp. were found in 50 (6.9%) samples of 721 turkey carcasses taken from Eskişehir, Bolu, Bandırma and İstanbul. Isolated 50 *Salmonella* strains were serogrouped with Group B and Group D₁ antisera. According to serogrouping it is found that 13 *Salmonella* were belongs to group B, 21 were belongs to group D₁, and 16 were not belong to either group B or group D₁.

Isolates were confirmed by Real-time PCR with *invA* gene sequence and antibiotic resistances for 10 different antibiotics were found 100% for vancomycin, methicillin, novobiocine; 34% for gentamycin; 30% for tetracycline; 10% for polymiksin and ampycilline; 8% Amoxicillin+clavulanate; 4% for Sulphamethoxazol-Trimethoprim. Mezlocillin resistance was not detected in isolates.

Five *Salmonella* strains belong to B serogroup were found *Salmonella typhimurium*; 4 of 5 *Salmonella* strains belong to D₁ serogroup were found *Salmonella enteritidis* and 1 strain belongs to D₁ serogroup was found *Salmonella agona* by DNA sequence analysis. Ten *Salmonella* strains that were not belong to B and D₁ serogroups were defined as *Salmonella enterica* partial 16S rRNA gene.

As a result of the study *Salmonella* spp. were detected in turkey carcasses and this result indicates the importance of hygienic precautions that must be obeyed from farm to table in order to protect public health.

Keywords: Antibiotic resistance, Real-time PCR, *Salmonella*, sequencing, turkey carcass

KAYNAKLAR

- ALPHONS, J.A.M., JAAP, E. (2005). Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Microbiol and Med. Immunol.*, 44: 251-259.
- ANGULO, F.J., JOHNSON, K., TAUXE, R.V., COHEN, M.L. (2000). Significance and sources of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Microb. Drug Res.*, 6: 77-83.
- ANON (1993). Meat and meat products Detection of Salmonellae. The International Organization for Standardization (ISO, 6579).
- ANON (2001). Devlet Planlama Teşkilatı, Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı, Kanatlı etleri ve yumurta ürünleri sanayi alt komisyon raporu. Erişim: [<http://ekutup.dpt.gov.tr/gida/oik646.pdf>]., Erişim Tarihi: 25.10. 2010.
- ANON (2006). CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 16th Informational Supplement. CLSI Document M100-S16, 26. Wayne, PA.
- ANONİM (1998). Kuluçkahane ve Damızlık İşletmelerin Sağlık Kontrol Yönetmeliği ve Talimatı. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı., s: 1-64.
- ANTUNES, P., REU, C., SOUSA, J.C., PEIXE, L., PESTANA, N. (2003). Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.*, 82: 97-103.
- ARDA, M., ESENDAL, Ö. M., AKAY, Ö., KESKİN, O., İZGÜR, M. (1995): Tavuk Salmonellosis' inin Teşhisinde Propylene Glycol' lü Yeni Bir Besiyerinin Kullanılması. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 42: 91-96.
- ARVANITIDOU, M., TSAKRIS, A., SOFIANOU, D., KATSOUYANNOPOULOS, V. (1998). Antimicrobial resistance and R-factor transfer of *Salmonella* isolated from chicken carcasses in Greek hospitals. *Int. J.Food Microbiol.*, 40: 197-201.
- BANSAL, A. K., MEYER, T. E. (2002). Evolutionary analysis by whole genome comparisons. *J. Bacteriol.*, 184: 2260-2272.
- BARROW, P.A. (1992). In-vitro and in-vivo characteristics of TnphoA mutant strains of *Salmonella* serotype gallinarum not invasive for tissue culture cells. *J. Med. Microbiol.*, 36: 389-397.
- BARROW, P.A. (2000). The paratyphoid salmonellae. *Rev.sci. tech.Off. int. Epiz.*, 19: 351-375.
- BARROW, P.A., LOWELL, M.A., MURPHY, C.K., PAGE, K. (1999). *Salmonella* infection in a commercial line of ducks; Experimental studies in virulence, intestinal colonization and immune protection. *Epidemiol. Infect.*, 123: 121-132.

- BARROW, P.A., SIMPSON, J.M., LOVELL, M.A. (1988). Intestinal colonization in the chicken by food poisoning *Salmonella* serotypes: microbia characteristics associated with faecal excretion. *Avian Pathol.*, 17: 571-588.
- BÂUMLER, A.J., HEFFRON, F., REISSBRODT, R. (1997). Rapid Detection of *Salmonella enterica* with Primers Specific for *iroB*. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 1224-1230.
- BELI, E., DURAKU, E., DURAKU, E. (2001). *Salmonella* Serotypes Isolated from turkey meat in Albania. *Int. J. Food Microbiol.*, 63: 165-167.
- BİLGEHAN, H. (2004). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İzmir: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları., p: 425-455.
- BLAIS, B.V., PIETRZAK, E., OUDİT, D., WILSON, C., PHILLIPPE, L.M., HOWLETT, J. (1998). Polymacron enzyme immunoassay system for detection of naturally contaminated *salmonella* in foods, feeds and environmental studies. *J. Food Prot.*, 61: 1187-1190.
- BOTTGER, E. C. (1989). Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 65:171-76.
- BOYD, D., G. A. PETERS, A. CLOECKAERT, K. S. BOUMEDINE, E. CHASLUS-DANCLA, H. IMBERECHTS, M. R. MULVEY. (2001). Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistant region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J. Bacteriol.*, 183: 5725-5732.
- BRENNER, F. W., VILLAR, R. G., ANGULO, F. J., TAUXE, R., SWAMINATHAN, B. (2000): *Salmonella* Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 2465-2467.
- BRIGGS, C. E., P. M. FRATAMICO. (1999). Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 846-849.
- BUCHOLZ, P.S., FAIRBROTHER, A. (1992). Pathogenicity of *Salmonella pullorum* in northern bobwhite quail and mallard ducks. *Avian Dis.*, 36: 304-312.
- BURKHALTER, P.W., MULLER, C., LUTY, J., CANDIRAN, U. (1995). Detection of *Salmonella* spp. in eggs: DNA Analyses, Culture, Techniques ve Serology. *J. AOAC Int.*, 78: 1531-1537.
- CANDRIAN, U. (1995). Polymerase chain reaction in food microbiology. *J. Microbiol. Meth.*, 23: 89-103.

- CHANTAL, W. N., FAKHR, M.K., MOHAMED K., DOETKOTT, C., LOGUE, C. M. (2008). An Evaluation of Conventional Culture, *invA* PCR, and the Real-Time PCR iQ-Check Kit as Detection Tools for *Salmonella* in Naturally Contaminated Premarket and Retail Turkey *J. Food Prot.*, **71**: 386-391.
- CHARY, P., PRASAD, R., CHOPRA, A.K., PETERSON, J.W. (1993) Location of the enterotoxin gene from *Salmonella typhimurium* and characterization of the gene products. *FEMS Microbiol. Lett.*, **111**: 87-92.
- CHEN, K., NEIMARK, H., RUMORE, P., STEINMAN, C. R. (1989). Broad-range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids. *FEMS Microbiol. Lett.*, **57**:19-24.
- CHEN, M., STERN, J.S., BAILEY, J.S., COX, N.A. (1998). Administering mucosal competitive exclusion flora for control of *Salmonellae*. *J. Appl. Poult. Res.*, **7**: 384-391
- CHEN, S., ZHAO, S., WHITE, D.G., SCHROEDER, C.M., LU, R., YANG, H., MCDERMOTT, P.F., AYERS, S., MENG, J. (2004). Characterization of multiple-antimicrobial resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70(1)**: 1-7.
- CHIU, C.H., OU, J.T. (1996). Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J. Clin. Microbiol.*, **34**: 2619-2622.
- CLARRIDGE, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**: 840-862.
- COHEN, N.D., MCGRUDER, E.D., NEILBERGS, H.L., BEHLE, R.W., WALLIS, D.E., HARGIS, B.M. (1994). Detection of *Salmonella enteritidis* in feces from poultry using booster PCR and oligonucleotide primers specific for all members of the genus *Salmonella*. *Poult. Sci.*, **73**: 354-357.
- COLLINSON, S.K., LIU, S.L., CLOUTHIER, S.C., BANSER, P.A., DORAN, J.L., SANDERSON, K.E., KAY, W.W. (1996). The location of four fimbriae-encoding genes, *agfA*, *fimA*, *sefA* and *sefD*, on the *Salmonella enteritidis* and/or *S. typhimurium* XbaI-BlnI genomic restriction maps. *Gene*, **169**: 75-80.
- COTTER, P.F., MURPHY, J.E., KLINGER, J.D., TAYLOR, R.L. (1995). Identification *Salmonella enteritidis* from experimentally infected hens using a colorimetric DNA hybridization method. *Avian Dis.*, **39**: 873-878.
- CRAVEN, S.E. (1994). Altered colonizing ability for the ceca of broiler chicks by lipopolysaccharid-deficient mutants of *Salmonella typhimurium*. *Avian Dis.*, **38**: 401-408.

- CRUCHAGA, S., ECHEITA, A., ALUDEA, A., GARCIA-PENA, J., FRIAS, N., USERA, M.A. (2001). Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. *J. Antimicrob. Chemother.*, 47: 315-321.
- CUDJOE, K.S., KRONA, R. (1997). Detection of Salmonella from raw food samples using Dynabeads⁷ anti-Salmonella and a conventional reference methods. *Int. J. Food. Microbiol.*, 37: 55-62.
- CUDJOE, K.S., KRONA, R., GRON, B., OLSEN, E. (1994). Use of ferrous sulphate and immunomagnetic separation to recover Salmonella enteridis from raw eggs. *Int. J. Food. Microbiol.*, 23: 149-158.
- ÇARLI, K.T., ÜNAL, C. B., CANER, V., EYİGOR, A. (2001). Detection of n Chicken Feces by a Combination of Tetrathionate Broth Enrichment, Capillary PCR, and Capillary Gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 39(5): 1871-1876.
- D'AOUST, J.Y., MAURER, J.J. (2007). *Salmonella* species. In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Ed: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R. ASM pres., p: 187-236.
- DAUGA, C., ZABROVSKAIA, A., GRIMONT, P.A.D. (1998). Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of Salmonella enterica. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 2835-2843.
- DAVIES, R.H., NICHOLAS, R.A.J., MCLAREN, I.M., CORKISH, J.D., LANNING, D.G., WRAY, C. (1997). Bacteriological and serological investigation of persistent Salmonella enteritidis infection in an integrated poultry organisation. *Vet. Microbiol.*, 58: 277-293.
- DE OLIVEIRA, F. A., BRANDELLI, A., TONDO, E.C. (2006). Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. *New Microbiol*, 29: 49-54.
- DE OLIVEIRA, S.D., FLORES, F.S., LUCIANA RUSCHEL DOS SANTOS, L.R., BRANDELLI, A. (2005). Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *Int.J.FoodMicrobiol.*, 97: 297-305.
- DESMEDT, J.M., BOLDERDIJK, R.F., RAPPOLD, H.F., LAUTENSCHLAEGER, D. (1986). Rapid Salmonella Detection in Foods by Motility Enrichment on a Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Medium. *J. Food Protect. Vol.* 49: 510-514.
- DIBB-FULLER, M.P., ALLEN-VERCOE, E., THORNS, C.J., WOODWARD, M.J. (1999). Fimbriae and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by Salmonella enteritidis. *Microbiology*, 145: 1023-1031.
- DUSCH, H., ALTWEGG, M. (1995): Evaluation of New Plating Media for Isolation of *Salmonella* Species. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 802-804.
- EROL, İ. (2007). *Salmonella*. In: Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif Matbaacılık Ltd. Sti., s.: 60-70.

- EYİGÖR, A. ÇARLI, K.T., ÜNAL, C.B. (2002). Implementation of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of Salmonella detection in poultry. *Lett Appl Microbiol.*, 34: 37-41.
- FAKHR, M.K., MCEVOY, J.M., SHERWOOD, J.S., LOGUE, C.M. (2006). Adding a elective enrichment step to the iQ-Check real-time PCR improves the detection of Salmonella in naturally contaminated retail turkey meat products. *Lett Appl Microbiol.*, 43: 78-83.
- FEDER, I., NIETFELD, J.C., GALLAND, J., YEARY, T., SARGEANT, J.M., OBERST, R., TAMPLIN, M.L., LUNCHANSKY, J.B. (2001). Comparison of Cultivation and PCR-Hybridization for Detection of *Salmonella* in Porcine Fecal and Water Samples. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 2477-2484.
- FERNANDEZ, L.A., BERENUER, J. (2000). Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24: 21-44.
- FLOWERS, R.S., D'AOUST, J.Y., ANDREWS, W.H., BAILEY, J.S. (1992). *Salmonella*. In: Compendium of the The Methods for the Microbiological Examinations of Food. Ed.: Vanderzant, C., Splittsoesser, D.F. American Public Health Assoc. 3rd.ed., p.: 371-404.
- FLUIT, A.C., WIDJOJOATMODJO, M.N., BOX, A.T.A., TORENSMA, R., VERHOEF, J. (1993). Rapid detection of Salmonellae in poultry with the magnetic immuno-polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1342-1346.
- FOURNIER, P. E., DUMLER, J. S., GREUB, G., ZHANG, J., WU, Y., RAOULT, D. (2003). Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 5456-5465.
- GARRITY, G. M., HOLT, J. G. (2001). The road map to the manual. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Ed: G. M. Garrity. New York, N.Y., p.: 119-166.
- GAST, R.K. (1993). Evaluation of direct plating for detecting Salmonella enteritidis in pools of egg contents. *Poult. Sci.*, 72: 1611-1614.
- GAST, R.K. (2003). Salmonella Infections. In: *Diseases of poultry 11*. Ed. Ed: SAİF, Y.M. Iowa State Press, p: 567-613.
- GAST, R.K., BEARD, C.W. (1990). Production of Salmonella enteritidis-contaminated eggs by experimentally infected hens. *Avian Dis.*, 34: 438-446.
- GIANNELLA, R.A. (2006). Salmonella. Erişim: [<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch021.htm>] Erişim Tarihi: 11.12.2006.
- GONCAGÜL, G., GÜNAYDIN, E., ÇARLI, K.T. (2004). Antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis of human and chicken origin. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 28: 911-914.

- GROISMAN, E.A., OCHMAN, H. (1996). Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell.*, 87: 791-794.
- HALL, L., DOERR, K. A., WOHLFIEL, S. L., ROBERTS, G.D. (2003). Evaluation of the MicroSeq System for Identification of Mycobacteria by 16S Ribosomal DNA Sequencing and Its Integration into a Routine Clinical Mycobacteriology Laboratory. *Clin. Microbiol.*, 41: 1447-1453.
- HARMSSEN, D., KARCH, H. (2004). 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *ASM News*, 70: 19-24.
- HAYWARD, R.D., KORONAKIS, V. (2002). Direct modulation of the host cell cytoskeleton by *Salmonella* actin-binding proteins. *Trends Cell Biol.*, 12: 15-20.
- HENDERSON, S. C., BOUNOUS, D. I., LEE, M. D. (1999): Early Events in the Pathogenesis of Avian Salmonellosis. *Infect. Immun.*, 67(7): 3580-3586.
- HERNANDEZ, T., RODRÍGUEZ, C., AREVALO, M.P. (2002) *Antimicrobial-resistant Salmonella enterica serovars isolated from chickens in Spain. J. Chemother.*, 14: 346-350.
- HOLMBERG, S.D., OSTERHOLM, M.T., SENGER, K.A., COHEN, M.L. (1984). Drug resistant *Salmonella* from animals fed antimicrobials. *New Engl. J.Med.*, 311: 617-622.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. WILLIAMS, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Edition.
- HOORFAR, J., BAGGESEN, D.L., PORTING, P.H. (1999). A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates. *J. Microbiol. Meth.*, 35: 7-84.
- HUMBERT, F., CARRAMINANA J. J., LALANDE F., SALVAT G. (1997): Bacteriological monitoring of *Salmonella enteritidis* carrier birds after decontamination using enrofloxacin, competitive exclusion and movement of birds. *Vet. Rec.*, 141: 297-299.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (1996). *Microorganisms in Food-5. Salmonellae.*, p.: 217-264.
- IZAT, A.L., DRIGGERS, C.D., COLBERG, M., REIBER, M.A., ADAMS, M.H. (1989). Comparison of the DNA probe to culture methods for the detection of *Salmonella* on poultry carcasses and processing waters. *J. Food Prot.*, 52: 564-570.
- İZGÜR, M. (2002). *Salmonella* İnfeksiyonları. In: *Kanatlı Hayvan Hastalıkları*, Ed.: M. İzgür, M. Akan, Ankara: *Medisan Yayınevi*, p: 41-53.
- İZGÜR, M. (2006). *Salmonella* İnfeksiyonları. In: *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*, Ed.: AYDIN, N.; PARACIKLIOĞLU, J. Ankara: İlke-Emek Yayınları, p: 116-121.

- JOHNSON, D.C., DAVID, M., GOLDSMITH, S. (1992). Epizootiological investigation of an outbreak of pullorum disease in an integral broiler operation. *Avian Dis.*, 36: 770-775.
- KEITH, M. (1997). Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay system for the detection of *Salmonella* in foods. *J. Food Prot.*, 60: 682-685.
- KIESSLING, C.R., CUTTING, J.H., LOFTIS, M., KIESSLING, W.M., DATTA, A.R., SOFOS, J.N. (2002). Antimicrobial resistance of food-related *Salmonella* isolates, 1999-2000. *J. Food Prot.*, 65: 603-608.
- KILINÇ, Ü., AYDIN, F. (2006). Kayseri yöresindeki tavukçuluk işletmelerinden toplanan tavuklardan izole edilen *Salmonella* türlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 15(1): 35-40.
- KIMURA, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Mol. Evol.*, 16:111-120.
- KOLBERT, C. P., PERSING, D. H. (1999). Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2: 299-305.
- KONEMAN, E., WASHINGTON, W.J., ALLEN, S., JANDA, W., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P., WOODS, G. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology sixth edition*. USA: Lippincott Williams & Wilkins, Chapter 6.
- KOUPAL, L.P., DEIBEL, R.H. (1975). Assay, characterization and localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*. *Infect. Immun.*, 11: 14-22.
- LAMMERDING, A.M., GARCIA, M.M., MANN, E.D., ROBINSON, Y., DORWARD, W.J., TRUSCOTT, R.B., TITTIGER, F. (1988). Prevalence of *Salmonella* and thermophilic *Campylobacter* in fresh pork, beef, veal and poultry in Canada. *J. Food Prot.*, 51(1): 47-52.
- LI, J., SMITH, K.N., CRICHTON, P.B., OLD, D.C., WHITTAM, T.S., SELANDER, R.K. (1993). Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile salmonella. *J. Med. Microbiol.*, 38: 129-139.
- LOCKMAN, H.A., CURTISS, R. (1992). Virulence of non-type 1-fimbriated and nonfimbriated and nonflagellated *Salmonella typhimurium* in murine typhoid fever. *Infect. Immun.*, 60: 491-496.
- LOGUE, C.M., SHERWOOD, J.S., OLAH, P.A., ELIJAH, L.M., DOCKTER, M.R. (2003). The incidence of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. on freshly processed poultry from US Midwestern processing plants. *J. Appl. Microbiol.*, 94: 16-24.
- MALORNY, B., BUNGE, C., HELMUTH, R. (2007). A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *J. Microbiol. Methods.*, 70: 245-251.

- MARCUS, S.L., BRUMELL, J.H., PFEIFER, C.G., FINLAY, B.B. (2000). Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.*, **2**: 145-156.
- MARK, A., JENSEN, J. A., WEBSTER, N. S. (1993). Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 945-952.
- MASSO, R., OLIVA, J. (1997). Technical evaluation of an automated analyser for the detection of *Salmonella enterica* in fresh meat products. *Food Control.*, **8**: 99-103.
- MAYAHY, M., SHARMA, R.N., MAKTABI, S. (1995). An outbreak of blindes in chicks associated with *Salmonella pullorum* infection. *Indian Vet. J.*, **72**: 922-925.
- MCDERMID, A.S., LEVER, M.S. (1996). Survival of *Salmonella enteritidis* PT4 and *S. typhimurium* Swindon in aerosol. *Lett. Appl. Microbiol.*, **23**: 107-109.
- MCDONOUGH, P.L., JACOBSON, R.H., TIMONEY, J.F. (1989). Virulence determinants of *Salmonella typhimurium* from animal sources. *Am. J. Vet. Res.*, **50**: 662-670.
- MDEGELA, R.H., YONGOLO, G.S., MINGA, U.M., OLSEN, J.E. (2000). Molecular epidemiology of *Salmonella gallinarum* in chickens in Tanzania. *Avian Pathol.*, **29**: 457-463.
- MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., McCAING, F., BRESEE, J.S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P., TAUXE, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Inf. Dis.*, **5(5)**: 607-625.
- MEDICI, D.D., PEZZOTTI, G., MARFOGLIA, C., CACIOLO, D., FOSCHI, G., OREFICE, L. (1998). Comparison between ICS-Vidas, MSRV and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. *Int. J. Food Microbiol.*, **45**: 205-210.
- MEDICI, D.D., LUCIANA, C., DELIBATO, E., PASQUALE, S.D., FILETICI, E., TOTI, L. (2003). Evaluation of DNA Extraction Methods for Use in Combination with YBR Green I Real-Time PCR To Detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in Poultry. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69(6)**: 3456-3461.
- MEER, R. R., PARK D. L. (1995). Immunochemical detection methods for *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in foods. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **142**: 1-12.
- MILLER, R.G., TATE, C.R., MALLINSON, E.T., SCHERRER, J.A. (1991). Xylose-lysine-tergitol 4: An improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*. *Poult. Sci.*, **70**: 2429-2432.
- OLIVEIRA, S.D., RODENBUSCH, C.R., CE, M.C., ROCHA, S.L.S., CANAL, C.W. (2003). Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.*, **36**: 217-221.

- OLIVEIRA, S.D., SANTOSA, L.R., SCHUCHA, D.M.T., B, SILVAA, A.B., SALLEA C.T.P., CANALA, C.W. (2002). Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Vet. Microbiol.*, **87**: 25-35.
- OPARA, O.O., CARR, L.E., RUSSEK-COHEN, E., TATE, C.R., MALLINSON, E.T., MILLER, R.G., STEWART, L.E., JOHNSTON, R.W., JOSEPH, W.S. (1992). Correlation of water activity and other environmental conditions with repeated detection of Salmonella contamination on poultry farms. *Avian Dis.*, **36**: 664-671.
- PACE, N. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, **276**: 734-740.
- PALYS, T., NAKAMURA, L. K., COHAN, F. M. (1997). Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequencedata. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**: 1145-1156.
- PATRICK, C. Y. W., KENNETH H. L. N., SUSANNA K. P. L., KAM-TONG, Y., AMI, M. Y. F., KIT-WAH, L., DOROTHY, M. W. T., TAK-LUN, Q., KWOK-YUNG, 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 *j. Clin. Microbiol.* **41**: 1996-2001.
- PEDERSEN, K., HANSEN, H.C., JORGENSEN, J.C., BORCK, B. (2002). Serovars of *Salmonella* isolated from Danish turkeys between 1995 and 2000 and their antimicrobial resistance. *Vet. Rec.*, **150**: 471-474.
- PENNYCOTT, T.W., DUNCAN, G. (1999). *Salmonella pullorum* in the common pheasant. *Vet. Rec.*, **144**: 283-287.
- POPOFF, M.Y., BOCKEMUHL, J., BRENNER, F.W. (2004). Supplement 2002 (No:46) to the Kaufmann-White scheme. *Res. Microbiol.*, **155**: 568-570.
- PORTER, R.E., HOLT, P.S. (1993). Effect of induced molting on the severity of intestinal lesions caused by *Salmonella enteritidis* infection in chickens. *Avian Dis.*, **37**: 1009-1016.
- PRAGER, R., FRUTH, A., TSCHÂPE, H. (1995). *Salmonella enterotoxin (stn)* gene is prevalent among strains of *Salmonella enterica*, but not among *Salmonella bongori* and other Enterobacteriaceae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **12**: 47-50.
- QUINN, P.J., MARKEY, B.K., CARTER, M.E., DONNELLY, W.J., LEONARD, F.C. (2004). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. India Replica Pres Pvt. Ltd., Chapter 18.
- RABSCH, W., TSCHÂPE, H., BÂUMLER, A. J. (2001). Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes. Infect.*, **3**: 237-247.
- RALL, V.L.M., RALL, R., ARAGON, L.C., SILVA, M.G. (2005). Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. *Braz. J. Microbiol.*, **36**: 147-150.

- REEVES, M.V., EVINS, G.B., HEBIA, A.A. (1989). Clonal nature of *salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *salmonella bongori comb. nov.* *J. Clin. Microbiol.*, 27: 313-320.
- RELMAN, D. A. (1999). The search for unrecognized pathogens. *Science*, 284: 1308-1310.
- RODRIGUE, D.C., TAUXE, R.V., ROWE, B. (1990). International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? *Epidemiol. Infect.*, 105: 21-27.
- ROTGER, R., CASADESUS, J. (1999). The virulence plasmid of *Salmonella*. *Int. Microbiol.*, 2: 177-184.
- SATO, Y., SATO, G., TUCHILI, L., PANDY, G.S., NAKAJIMA, A., CHIMANA, H., SINSUNGWE, H. (1997). Status of *Salmonella gallinarum-pullorum* infections in poultry in Zambia. *Avian Dis.*, 41: 490-495.
- SCHRANK, I.S., MORES, M.A.Z., COSTA, J.L.A., FRAZZON, A.P.G., SONCINI, R., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H., SILVA, S.C. (2001). Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. *Vet. Microbiol.*, 82: 45-53.
- SEO, K.H., VALENTIN-BON, I.E., BRACKETT, R.E., HOLT, P.S. (2004). Rapid, specific detection of *Salmonella Enteritidis* in pooled eggs by real-time PCR. *J. Food Prot.*, 67: 864-869.
- SHAW, S.J., BLAIS, B.V., NUNDY, D. C. (1998). Performance of the Dynabeads anti-*Salmonella* system in the detection of *Salmonella* species in food, animal feeds, and environmental samples. *J. Food Protect.*, 61: 1507-1510.
- SHIVAPRASAD, H.L. (2000). Fowl Typhoid and Pullorom disease. *Rev. Sci. Tech.*, 19: 405-424.
- SHIVAPRASAD, H.L. (2003). *Salmonella* Infections. In: *Diseases of poultry 11. Ed.* Ed: SAIF, Y.M. Iowa State Press, p: 568-582.
- SHIVAPRASAD, H.L., TIMONEY, J.F., MORALES, S., LUCIO, B., BAKER, R.C. (1990). Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serologic responses. *Avian Dis.*, 34: 548-557.
- STANLEY, J., POWELL, N., JONES, C., BURNENS, A. P. (1994). A framework for S200,16S rRNA gene and plasmid-profile analysis in *Salmonella* serogroup D1. *J. Med. Microbiol.*, 41: 112-119.
- STONE, G.G., OBERST, R.D., HAYS, M.P., MCVEY, S., CHENGAPPA, M.M. (1994). Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *J. Clin. Microbiol.*, 32:1742-1749.

- TAYLOR, W.J. (1965). Isolation of Shigellae. I. Xylose lysine agars: new media for isolation of enteric pathogens. *Am. J. Clin. Path.*, **44**: 471-475.
- TELO, A., BELI, E., DIBRA, A., PANARITI, E. (1998). *Salmonella enteritidis* in imported poultry meat in Albania. *Veterinarski- Arhiv.*, **68(5)**: 173-176.
- THAKUR, Y. R., BAJAJ, B.K. (2006). Antibiotic resistance and molecular characterization of poultry isolates of Salmonella by RAPD-PCR. *World J Microbiol Biotechnol.*, **22**: 1177-1183.
- THORNE, J. L., KISHINO, H., PAINTER, I. S. (1998). Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.*, **15**: 1647-1657.
- TIETJEN, M., FUNG, D.Y.C. (1995). Salmonellae and food safety. *Crit.Rev. Microbiol.*, **21(1)**: 53-83.
- TOLLEFSON, L., ALTEKRUSE, S.F., POTTER, M.E. (1997). Therapeutic antibiotics in animal feeds and antibiotic resistance. *Rev. Sci. Tech.*, **16**: 709-715.
- TORTOLI, E. (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.*, **16**:319-354.
- TUCHILI, L. M., KODAMA, H., IZUMOTO, Y., MUKAMOTO, M., FUKATA T., BABA, T. (1995). Detection of *Salmonella gallinarum* and *S. typhimurium* DNA in experimentally infected chicks by polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.*, **57**: 59-63.
- UYTTENDAELE, M.R., DEBEVERE, J.M., LIPS, R.M., NEYTS, K.D. (1998). Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. *Int. J. Food Microbiol.*, **40**: 1-8.
- UYTTENDAELE, M.R., VANWILDEMEERSCH, K., DEBEVERE, J. (2003). Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **37**: 386-391.
- VAN DER VELDEN, A.W.M., BÄUMLER, A.J., TSOLIS, R.M., HEFFRON, F. (1998) Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.*, **66**: 2803-2808.
- VAN SCHOTHORST, M., RENAUD, A.M. (1983). Dynamics of salmonellae isolation with modified Rappaport's medium (R 10). *J. Appl. Bact.*, **54**: 209-215.
- WARD, M. P., RAMER, J. C., PROUNDFOOT, J., GARNER, M. M., JUAN-SALLES, C., WU, C. C. (2003): Outbreak of Salmonellosis in a Zoologic Collection of Lorikeets and Lories (*Trichoglossus*, *Lorius* and *Eos* spp.). *Avian Dis.*, **47**: 493- 498.
- WAWERLA, M., STOLLE A., SCHALCH B., EISGRUBER, H. (1999). Impedancemicrobiology: applications in food hygiene. *J. Food Protect.*, **62**: 1488-1496.

- WHITE, D.G., ZHAO, S.D.V.M., SUDLER, R.M.S., AYERS, S., FRIEDMAN, S.B.A., CHEN, S.D.V.M., McDERMOTT, P.F., McDERMOTT, S.B.S., WAGNER, D.D., MENG, J. (2001). The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. *N. Engl. J. Med.*, 345(16): 1147-1154.
- WOESE, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51: 221-271.
- WOESE, C. R., STACKEBRANDT, E., T. J. MACKE, G. E. FOX. (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6: 143-151.
- WOESE, C. R., OLSEN, G. J., IBBA, M., SOLL, D. (2000). Comparisons of Complete genome sequences allow the most objective and comprehensive Descriptions possible of a lineage's evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 202-236.
- WONG, K.K., MCCLELLAND, M., STILLWELL, L.C., SISK, E.C., THURSTON, S.J., SAFFER, J.D. (1998). Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect. Immun.*, 66: 3365-3371.
- WOODWARD, M.J., KIRVAN, S.E.S. (1996). Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs by the PCR. *Vet. Rec.*, 138: 411-413.
- YAZICIOGLU, N., KAYA, K., AYAZ, Y., SEN, S., ÖZKÖK, S., AKSOY, M., YAVUZ, M. K., KAPLAN, Y. Z., TUNCA, S. T., VURAL, S., EVGİN, N., KARAKOÇ, S. R., MİROĞLU, M., TURUT, N. (2005). Kanatlı kesimhanelerinin parçalama ünitelerinden alınan boyun ve kanat örneklerinden *Salmonella* izolasyonu, serotiplendirilmesi ve antibiyotik dirençliliğinin araştırılması. *Etilik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, 16(1-2): 23-36.
- ZHAO, C., GE, B., VILLENA, J., SUDLER, R., YEH, E., ZHAO, S., WHITE, D.G., WAGNER, D., MENG, J. (2001). Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(12): 5431-5436.
- ZHAO, S., MCDERMOTT, P.F., WHITE, D.G., QAIYUMI, S., FRIEDMAN, S.L., ABBOTT, J.W., GLENN, A., AYERS, S.L., POST, K.W., FALES, W.H., WILSON, R.B., REGGIARD, C., WALKER, R.D. (2007). Characterization of multidrug resistant *Salmonella* recovered from diseased animals. *Vet. Microbiol.*, 123: 122-132.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Zafer
Soyadı: ATA
Doğum yeri ve tarihi: Ankara; 02/04/1976
Uyruğu: T.C.
Medeni durumu: Evli
İletişim adresi ve telefonu: Çiğiltepe lojmanları 1565. Sok. Gürsu Apt. No:
7/9 Mamak/Ankara
Tlf: 0 505 5272201

II- Eğitimi

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2003-2007)
Lisans: Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (1994-2000)
Lise: Kabataş Erkek Lisesi(1990-1994)
Orta okul: Merkez Ortaokulu (1987-1990)
İlkokul: Bahçelievler İlkokulu (1982-1987)
Yabancı Dili: İngilizce

III- Unvanları

Uzman Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

2000 yılından itibaren Veteriner Hekim Subay

V- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları ve Posterleri

ATA, Z., AYDIN, N. (2008). Ankara Bölgesin'deki tavukçuluk işletmelerinden *Salmonella* spp. İzolasyonu. *Ankara Üniv. Vet. Fak.Derg.*, 55: 161-166.

Ankara ve Çevresindeki Yumurta Tavukçuluğu Yapan İşletmelerden *Salmonella* spp. İzolasyonu. Poster. VII. Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (2006) (uluslararası katılımlı) Antalya Side

Tavukların Dışkı ve Yumurtalarında *Salmonella* Etkenlerinin Klasik Yöntemlerle ve PZR ile Tanısı Sözlü Bildiri. VIII. Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (2008) (Uluslararası Katılımlı) Van.

Hindilerden Direkt Real-time PCR ile *Salmonella* spp. Teşhisi. Poster. IX. Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (2010) (Uluslararası Katılımlı) Kıbrıs.

VI- Bilimsel Etkinlikleri

Seminer:

- 1.Günümüzde, Avian İnfluenza Konusunda Epidemiyolojik ve İmmunoproflaktikYönden Önemli Gelişmeler (2005).
- 2.Dna Aşılı Üzerine Güncel Gelişmeler ve Gelecekteki Öngörüler (2007).
- 3.Salmonella Türleri Arasında Klasik Virulans Faktörlerinin Dağılımı (2008).