

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

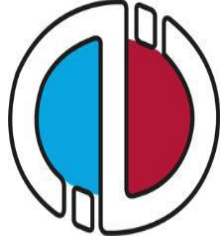
**ADAPAZARI BÖLGESİ BROİLER TİPİ TAVUK
İŞLETMELERİNDEN *SALMONELLA* İZOLASYONU VE
TİPLENDİRİLMESİ**

**Satiye ÖREN
Yüksek Lisans**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ**

BİLECİK, 2015

Ref. No:10101128



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

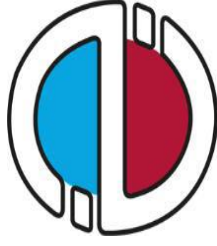
**Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**ADAPAZARI BÖLGESİ BROİLER TİPİ TAVUK
İŞLETMELERİNDEN *SALMONELLA* İZOLASYONU VE
TİPLENDİRİLMESİ**

**Satiye ÖREN
Yüksek Lisans**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ**

BİLECİK, 2015



ANADOLU UNIVERSITY



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
UNIVERSITY**

**Graduate School of Science
Molecular Biology and Genetic Department**

**ISOLATION AND TYPING OF *SALMONELLA* IN BROILER
FARMS AT ADAPAZARI AREA**

**Satiye ÖREN
Master's Thesis**

**Thesis Advisor
Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ**

BİLECİK, 2015



BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜKSEK LİSANS
JÜRİ ONAY FORMU**

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 21.12.2015...tarih ve 50..... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 06.01.2016...tarihinde tez savunma sınavı yapılan Selma ÖREN'in "Aparzon Bilge: İster Tıp... İster İktisat... İster İktisat..." başlıklı tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği/ oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI): Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ

ÜYE: Prof. Dr. Merih KIVANCI

ÜYE: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

ÜYE: Doç. Dr. Çhan DARCAN

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Ülkay Duda GÖL

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI BAŞKANI:

ONAY

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/ MÜHÜR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu yola çıkmamda beni yüreklendiren amirim Dr. Tuębay TIRAKOęLU'na, bu süreçte yardımlarını esirgemeyen amirim Dr. Burcu KESİN TUğ'a ve anlayış gösteren tüm mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ve ben bu yolu yürürken varlıklarıyla her zaman destekçim olan sevgili AİLEM ve DOSTLARIM'a sonsuz teşekkürler.

Satiye ÖREN

Aralık, 2015

ÖZET

Salmonella, tüm dünyada gıda kaynaklı patojenlerin başında gelmektedir. Salmonellozis, kanatlı sektörü içinde hem güvenilir gıda üretmek hem de ekonomik kayıplara sebep olmamak için kontrol altına alınması gereken önemli bir vakadır. Başarılı bir kontrol programına ulaşmak için erken teşhis de önem kazanmıştır. Birçok klinik örnek ve yiyecek materyalindeki *Salmonella*, ortamdaki sayılarının azlığı, yarışmacı mikrofloranın yoğunluğu ve gıdalarda depolama aşamalarında zarar görmüş *Salmonella*'ların varlığı nedeniyle teşhis edilememektedir. Standart Kültür Metoduyla sonuç almak 5 ile 11 gün arasında değişirken, PCR tabanlı bir teşhis yöntemi olan ribotiplendirme yöntemi özgüllük, hız ve hassasiyetinin yüksek olması nedeniyle büyük bir avantaj sunmaktadır.

Bu çalışmada, broiler tipi tavuk işletmesi yönünden yoğun olan Adapazarı Bölgesinin 2013-2014 yılları arasındaki *Salmonella* yoğunluğu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Bölgedeki 46 işletmeye ait kümeslerden alınan drag-swab örneklerinden *Salmonella* izolasyonu gerçekleştirilmiş ve ribotiplendirme yöntemi ile tanımlamaları yapılmıştır. Her biri iki ayrı drag-swab içeren 65 örnek *Salmonella* bakımından incelenmiş, kümeslerin %29,23'ünde *Salmonella* varlığı tespit edilmiştir. Pozitif örnekler içinde en fazla olan serotipin %52.6 oranla *Salmonella ser. Enteritidis* olduğu görülmüştür. Bu serotip dışında 6 farklı serotipin de varlığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Salmonella*, PCR, Ribotiplendirme, Broiler, Tavuk

ABSTRACT

Salmonella is leading of foodborne pathogens in all around the world. Salmonellosis is an important case that should be under controlled for both to produce safe food and prevent economic losses in poultry sector. Early diagnosis has also gained importance to achieve to a successful control program. *Salmonella* in many clinical samples and food materials can not be identified due to lack of their numbers in ambient, density of competitor micro flora and damaged *Salmonella* in storage phase of foods. While to obtain result with standard culture method changes among 5-11 days, ribotyping method that is PCR-based diagnostic method presents a great advantage due to have high specify, speed and sensitive.

In this study, among 2013-2014 years, density and characterization of *Salmonella* in Adapazarı Region having broiler-type chicken company was performed. *Salmonella* isolation was performed from drag-swab samples obtained from coops of 46 companies in mentioned region and their identifications were carried with ribotyping method. 65 *Salmonella* samples including two different drag-swab samples were investigated and it was determined that there is *Salmonella* in 29,23% of coops. It was observed that *Salmonella ser. Enteritidis* have maximum rate with 52,6% among positive samples. In addition to, the six different serotypes were also determined.

Keywords: *Salmonella*, PCR, Riboprinter, Broiler, Chicken

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

| | |
|--|----------|
| JÜRİ ONAY SAYFASI | |
| TEŞEKKÜR | |
| ÖZET..... | I |
| ABSTRACT | II |
| İÇİNDEKİLER | III |
| ÇİZELGE LİSTESİ..... | V |
| KISALTMALAR | VII |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | VII |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. <i>Salmonella</i> 'ların Klasifikasyonu ve Nomenklatürü | 2 |
| 1.2. Etiyolojileri | 5 |
| 1.2.1. Morfoloji ve boyanma özellikleri | 5 |
| 1.2.2. Üreme ihtiyaçları | 5 |
| 1.2.3. Koloni morfolojileri..... | 5 |
| 1.2.4. Biyokimyasal özellikleri..... | 5 |
| 1.2.5. Antijen yapısı..... | 6 |
| 1.2.5.1. O somatik antijeni | 6 |
| 1.2.5.2. H kirpik antijeni | 6 |
| 1.2.5.3. Vi yüzeysel antijeni..... | 6 |
| 1.3. <i>Salmonella</i> 'nın Ekonomik Boyutu | 7 |
| 2. MATERYAL ve METOT..... | 8 |
| 2.1. Drag Svap Örnekleri | 8 |
| 2.2. Besiyerleri | 9 |
| 2.2.1. Tamponlanmış peptonlu su (Buffered Peptone Water, BP) | 9 |
| 2.2.2. Rappaport vassiliadis soy broth..... | 10 |
| 2.2.3. Mueller kaufmann tetrathionate broth (base) | 10 |
| 2.2.3.1. İodine/potasyum iodyür çözeltisi | 11 |
| 2.2.3.2. Brilliant green çözeltisi | 11 |
| 2.2.4. Xylose lysin deoxycholate agar (XLD) | 12 |
| 2.2.5. Brilliant-Green Phenol-Red lactose sucrose agar (BPLS)..... | 12 |
| 2.2.6. Mueller-Hinton agar (MH) | 13 |
| 2.3. BAX [®] Q7 <i>Salmonella</i> PCR kiti | 14 |
| 2.4. BAX [®] system Q7 makinesi | 14 |
| 2.5. Bilgisayar | 14 |
| 2.6. Isıtıcı Bloklar..... | 14 |
| 2.7. Soğutucu Bloklar..... | 14 |
| 2.8. Optik Kapakların Açılıp Kapatılmasını Sağlayan Aletler..... | 14 |
| 2.9. Otomatik Pipetler | 15 |
| 2.10. Otomatik Pipetler İçin Pipet Uçları..... | 15 |
| 2.11. Steril Plastik Pipetler | 15 |
| 2.12. Deiyonize Saf Su Sistemi..... | 15 |
| 2.13. Buzdolabı | 15 |
| 2.14. Laminer Hava Kabini | 15 |
| 2.15. İnkübatör | 15 |
| 2.16. Hassas Terazî | 15 |

| | |
|--|--------------|
| 2.17. Dupont Riboprinter® Sistem kiti | 16 |
| 2.17.1. Dupont Riboprinter® Sistem hazırlık paketi | 16 |
| 2.18. Isıtıcı Blok | 16 |
| 2.19. Dupont Riboprinter® Sistem karakterizasyon ünitesi | 16 |
| 2.20. Kültür | 16 |
| 2.20.1. Drag-svab örneklerinden <i>Salmonella</i> izolasyonu | 16 |
| 2.21. Bax Q7 System PCR | 17 |
| 2.22. Dupont Riboprinter® Sistem | 17 |
| 3. BULGULAR | 19 |
| 3.1. Kültür Bulguları | 19 |
| 3.2. BAX Q7 rPCR Bulguları | 20 |
| 3.3. Ribotiplendirme Bulguları | 22 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ | 27 |
| KAYNAKLAR | 30 |
| ÖZGEÇMİŞ | |

ÇİZELGE LİSTESİ

| | Sayfa No |
|--|-----------------|
| Çizelge 1.1. <i>Salmonella</i> türlerinin ve alttürlerinin klasifikasyonu..... | 3 |
| Çizelge 1.2. CDC' de kullanılan <i>Salmonella</i> nomenklatürü..... | 4 |
| Çizelge 1.3. <i>Salmonella</i> 'ların kültürel ve biyokimyasal özellikleri..... | 6 |
| Çizelge 3.1. BAX Q7 rPCR bulguları..... | 21 |
| Çizelge 3.2. Pozitif örneklerde tespit edilen <i>Salmonella</i> tipleri..... | 22 |

KISALTMALAR

- AOAC** :Analitik Topluluklar Derneđi
- BPLS** : Brilliant-Green Phenol-Red Lactose Sucrose Agar
- BPW** :Tamponlanmış Peptonlu Su
- CDC** :ABD Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezleri
- DNA** :Deoksiribo Nükleik Asit
- LPS** :Lipopolisakkarit
- MH** :Mueller-Hinton Agar
- PCR** :Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- PTS** :Paratifoid Salmonella
- RVS** :Rappaport Vassiliadis Broth
- WHO** :Dünya Sağlık Örgütü
- XLD** : Xylose Lysin Deoxycholate Agar

ŞEKİL LİSTESİ

| | Sayfa No |
|---|-----------------|
| Şekil 2.1. Drag-svab örnekleme öncesi | 8 |
| Şekil 2.2. Drag-svab örnekleme sonrası | 8 |
| Şekil 2.3. Ön zenginleştirme yapılmış drag-svab örneği..... | 9 |
| Şekil 3.1. MERCK Rappaport Vassiliadis Soya Broth ‘da Salmonella zenginleştirme işlemi | 19 |
| Şekil 3.2. XLD Agarda Salmonella kolonileri | 20 |
| Şekil 3.3. Mueller-Hinton Agar (MH)’da saf koloni..... | 20 |
| Şekil 3.4. Riboprinter’da <i>Salmonella ser.</i> Enteritidis Karakterizasyonu..... | 23 |
| Şekil 3.5. Riboprinter’da <i>Salmonella ser.</i> Infantis Karakterizasyonu | 23 |
| Şekil 3.6. Riboprinter’da <i>Salmonella ser.</i> Lille Karakterizasyonu..... | 24 |
| Şekil 3.7. Riboprinter’da <i>Salmonella ser.</i> Hadar Karakterizasyonu | 24 |
| Şekil 3.8. Riboprinter’da <i>Salmonella ser.</i> Give Karakterizasyonu | 25 |
| Şekil 3.9. Riboprinter’da <i>Salmonella Arizonae/III</i> Karakterizasyonu..... | 25 |
| Şekil 3.10. Riboprinter’da <i>Salmonella ser.</i> Typhimurium Karakterizasyonu | 26 |

1. GİRİŞ

Salmonella'lar, Dünya'da ve Türkiye'de önemli bakteriyel patojenler arasındadır(Çarlı ve ark., 2001; Gast, 2003). Kanatlı hayvanlar, gıda zinciri vasıtasıyla insanlara bulaşabilen *Salmonella*'ların en önemli rezervuarlarından birisi olduğundan, resmi yetkililerce Salmonellozis, gıda kaynaklı bu hastalığın önlenmesinde kanatlı üreticileri için öncelikli bir konumdur(Stone ve ark., 1994; Gast 2003; Oliveria ve ark., 2002). Gıda tüketim alışkanlıklarındaki değişim ile toplu gıda üretimi ve uluslararası gıda ticaretinin artmasına bağlı olarak, değişik *Salmonella* serotiplerinden kaynaklanan gıda enfeksiyonlarının sayısı da, dünyanın hemen her bölgesinde özellikle son yıllarda büyük artış göstermiştir. Buna bağlı olarak gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonları, ABD, Almanya, Fransa, İspanya, Polonya ve İsveç'te tüm gıda enfeksiyon ve intoksikasyonları içerisinde ilk sırayı alırken, İngiltere, Galler ve Hollanda'da *Campylobacter* ile birlikte yine ilk sırayı paylaşmaktadır(Sinell ve ark., 1995). Yiyecek kaynaklı hastalıklar; gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde insanlar için hayatı tehdit edicidir ve önemli ekonomik sonuçlara neden olur. *Salmonella*; en sık rastlanan patojendir ve tüm dünyada yiyecek kaynaklı hastalıkların ana sebebidir (Gomez ve ark., 1997; Patrick ve ark., 1985-1999). *Salmonella*'ların patogenezinde rol oynayan toksinler; konağın bağırsak mukozasında yıkıma neden olan endotoksinler, bağırsaklardan sıvı salınımına neden olarak şiddetli elektrolit kaybına neden olan enterotoksinler ve bağırsak mukozasındaki epitellerde protein sentezini engelleyen sitotoksinler olmak üzere üç grupta incelenmektedir(Arda ve ark., 2002).

Endotoksinler *Salmonella*'ların hücre duvarı lipopolisakaridinin (LPS) lipit A kısmıdır. Enfekte hayvanın kan dolaşımına geçen etkenler eğer parçalanırlarsa, endotoksin vücutta ateş oluşturur. *Salmonella*'ların enterotoksinleri *Escherichia coli*'nin Labil toksinine(LT-ısıya duyarlı) benzemektedir. Bu toksin, mukozal cAMP miktarlarını arttırarak adenilat siklazı aktive etmekte ve dolayısıyla bağırsak epitellerinden aşırı sıvı salınımına neden olduğundan, hayvanlarda elektrolit kaybı şekillenmektedir. PTS(Paratifoid *Salmonella*)'ın sitotoksini, bağırsak epitel hücrelerinin yapısal formunu değiştirmekte ve protein sentezini durdurmaktadır(Gast, 2003).

İnsanlarda *Salmonella* enfeksiyonlarının en önemli kaynağı ise, bu etkenlerle kontamine tavuk etleri ve tavuk yumurtaları olduğu bildirilmiştir. Bilindiği gibi ishal ile

seyreden hastalıklar, gelişmekte olan ülkelerde halen bebek ve küçük çocuklar için önemli bir halk sağlığı sorununu oluşturmaktadır. *Salmonella* türleri bakteriyel ishal etkenlerinden en önemlilerinden birisidir(Roher ve ark., 1997). Kanatlılarda Salmonellozis, üç hastalık içerisinde klasifiye edilir. Bunlar, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Pullorum*(*S. Pullorum*)’un neden olduğu pullorum hastalığı, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Gallinarum*(*S. Gallinarum*)’un neden olduğu tavuk tifosu(Shivaprasad, 2003; Gast, 2003) ve insanlarda gıda kaynaklı hastalıklarla ilişkili olan farklı grupların serovarları tarafından oluşturulan paratifo infeksiyonudur(Oliveira ve ark., 2002; İzgür, 2002). Tavuk ürünlerine bulaşan ve insanlarda gıda zehirlenmesi vakalarından en çok izole edilen serovarlar *Salmonella typhimurium*(*S. Typhimurium*) ve *Salmonella enteritidis*(*S. Enteritidis*)’dir(Oliveira ve ark., 2003).

Salmonella serovarlarını standart laboratuvar metotları ile izole ve identifiye(tanımlama) etmek hem güç olmakta, hem de uzun süre almaktadır(Tuchili ve ark., 1995; Medici ve ark., 1998; Meer ve ark., 1995; Wawerla ve ark., 1999).

PCR(Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi, bir teşhis yöntemi olarak özgüllük, hız ve duyarlılığının yüksek olması nedeniyle büyük bir avantaj sunmaktadır. Birçok klinik örnek ve yiyecek materyalindeki bakteriyel identifikasyon için, gittikçe artan bir şekilde kullanılmaktadır(Stone ve ark., 1994; Oliveira ve ark., 2003; Tuchili ve ark., 1995). PCR’ın diğer bir avantajı ise, antijenlerin ekspresyonuna veya bir substratın kullanımına bağımlı olmaması, antijenlerin biyokimyasal ve fenotipik varyasyonlarına rağmen, mikroorganizmaları teşhis edebilmesidir(Hoorfar ve ark., 1999).

Bu çalışmada, broiler tipi tavuk işletmesi yönünden yoğun olması nedeniyle Adapazarı Bölgesinin *Salmonella* yoğunluğu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bölgedeki 46 işletmeye ait kümeslerden alınan drag-swab örneklerinden *Salmonella* izolasyonu gerçekleştirilmiş ve ribotiplendirme yöntemi ile tanımlamaları yapılmıştır.

1.1. *Salmonella*’ların Klasifikasyonu ve Nomenklatürü

Salmonella etkenleri *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan *Salmonella* cinsine ait türlerin içerdiği serovarlardır. *Salmonella* cinsi adını Daniel E. Salmon’dan alır ve yaklaşık 2500 den fazla serovar içermektedir. 1 Temmuz 1983’den önce *Salmonella*’nın üç türü bulunduğu kabul edilmekteydi ve bunlar: *Salmonella choleraesuis*, *S. Typhi* ve çoğu serovarin 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 *Salmonella bongori*'nin, DNA–DNA hibridizasyon yöntemi ile farklı bir tür olduğu kabul edilmiştir(Reeves ve ark., 1989). Bu nedenle *Salmonella enterica* altı alttüre ayrılmakla birlikte artık *Salmonella*'nın iki türü bulunmaktadır(Çizelge 1.1.)(Koneman ve ark., 2006; İzgür, 2006).

Çizelge 1.1. *Salmonella* türlerinin ve alttürlerinin klasifikasyonu(Koneman ve ark., 2006).

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

S. enterica subsp. *enterica*(I) : (Bir çok serotipi vardır)

S. enterica subsp. *salamae*(II)

S. enterica subsp. *arizonae*(IIIa)

S. enterica subsp. *diarizonae*(IIIb)

S. enterica subsp. *houtenae*(IV)

S. enterica subsp. *indica*(VI)

Salmonella bongori (eskiden alttür V olarak bilinirdi).

Kanatlılardan izole edilen *Salmonella* 'ların birçoğu *S. enterica subsp. enterica*(I) alt grubuna dahil olup, bu grup çok fazla serovar veya serotip içermektedir. Genellikle ilk izole edildikleri şehrin ya da ilk izole edildikleri hastalığın belirtisinin veya ilk izole edildikleri kanatlı türünün adını alırlar. Örneğin *S. enterica subsp. enterica serovar Dublin* ya da *S. enterica subsp. enterica serovar Typhi* veya *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 için bu şekilde isimlendirilmişlerdir. Ancak çoğu yayın ve kitapta bunlar kısaca *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Gallinarum diye adlandırılırlar(İzgür, 2002).

1966'nın başlarında Dünya Sağlık Örgütü(WHO) sadece alttür *S. enterica* subsp. *enterica*(I)'daki serovarıları adlandırmaya başlamıştır ve diğer tüm alttürlerdeki serovar adlarından vazgeçmiştir.

CDC(ABD Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezleri) bu pratiği uygulamış ve *S. enterica* subsp. *enterica*(I) daki serovar isimlerini, 1966'dan sonra tanımlanmış alttür II,

IV, VI ve *S. bongori*'nin adlandırılmamış serovarları için antijenik formüllerini kullanmıştır. İlk olarak bir serovarin cins ismi daha sonra serotip kelimesinin kısaltılması "ser" yazılır. Ondan sonra da serotip adı yazılır(*Salmonella* serotip veya ser Typhimurium veya *S. Typhimurium*)(Çizelge 1.2.)(Koneman ve ark., 2006).

Çizelge 1.2. CDC' de kullanılan *Salmonella* Nomenklatürü(Brenner ve ark.,2000).

| Taksanomik Durum Güncel Nomenklatür |
|--|
| Cins(İtalik)..... <i>Salmonella</i> |
| Tür(İtalik)..... <i>enterica</i> (I, II, IIIa, IIIb, IV, VI) <i>S.bongori</i> (önceleri alttür V olarak bilinirdi) |
| 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> IIIb60: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:z51:-). |

1.2. Etiyolojileri

1.2.1. Morfoloji ve boyanma özellikleri

Salmonella'lar *Enterobacteriaceae*'ların bir üyesi olup(Barrow,2000) gram negatif, sporsuz, kapsülsüz çomakçıklardır(Bilgehan, 2004). Boyutları 0.7–1.5x2.0–5.0 µm'dır(İzgür, 2006). Çoğunlukla boyalı preparatlarda tek tek görülen *Salmonella*'lar sporsuz ve kapsülsüz olup *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* hariç hareketlidirler(İzgür,2002).

1.2.2. Üreme ihtiyaçları

Salmonella'lar 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. *Salmonella*'lar izolasyonlarında kullanılan selektif agar besiyerinde 37°C de 24 saat içinde tipik koloniler oluşturur ve besiyerinin rengini özgün biçimlerde etkilerler(Çarlı ve ark., 2004). *Salmonella*'lar 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. *Salmonella*'ların besin ihtiyaçları oldukça basittir ve üremelerini destekleyen karbon ve nitrojen ihtiva eden çoğu besiyerinde üreyebilirler. *Salmonella*'ların üremesi için minimum sıcaklık *S. Hieldenberg* için 5.3 °C, *S. Typhimurium* için 6.2 °C olurken, üreme için maksimum sıcaklık 45 °C olarak bildirilmiştir(Gast, 2003; Fricker, 1987).

1.2.3. Koloni morfolojileri

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

1.2.4. Biyokimyasal özellikleri

Bu organizmalar; nitratı nitrite indirgerler, *S. Typhi* dışında glikozdan asit ve gaz oluştururlar, üreaz ve indol negatiftirler. Sitrat bütün *Salmonella* türleri tarafından değerlendirilebilen karbon kaynağıdır. *Salmonella*'lar, *S. cholerae* ve *S. Paratyphi* dışında genelde hidrojen sülfür(H₂S) oluştururlar ve *S. Typhi* dışında ornitini, *S. Paratyphi* A dışında lizini dekarboksile ederler. Sukroz, salisin, inositol ve *S. Arizonae* dışında laktoz fermentasyonları negatif olan *Salmonella*'ların lipaz ve

deoksiribonükleaz enzimleri yoktur(Guthrie, 1992; Krieg ve ark., 1984; Zwadyk ve ark., 1988). Ayrıca Metil–Red pozitif ve Voges–Proskauer negatiftir(Barrow, 2000).

Çizelge 1.3. *Salmonella*'ların kültürel ve biyokimyasal özellikleri(Koneman ve ark., 2006).

| Salmonella | Kia | Gaz | H2S | Mr | Vp | İnd | Sit | Pad | Üre | Har | Lyn | Ari | Orn | Onpg |
|--|-------|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Cins: Salmonella | Alk/A | + | + | + | - | - | + | - | - | + | + | +/- | + | - |
| Kia, Kligler's iron agar, H2S, hidrojen sülfür, mr,metil red, vp, voges preskauver, ind, indol, sıt,sitrat,pad, fenilalenindeaminaz, üre, üreaz, har, hareket, lys, liysin, arj, arjinin, org, ornitin, onpg, o-nitrofenil-β-D-galactopyranoside | | | | | | | | | | | | | | |

1.2.5. Antijen yapısı

Salmonella 'ların üç ayrı antijen yapıları vardır:

1.2.5.1. O somatik antijeni

Bütün *Salmonella* türlerinde bulunan bu antijenik yapı, polisakkarit özelliğinde olup, hücre duvarında protein ve lipitlere bağlı olarak bulunur. Endotoksin özelliğinde olan bu yapı organizmada toksik şokların çoğundan sorumludur(İzgür, 2002).

1.2.5.2. H kirpik antijeni

“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 özgüldür ve değişmezler. Bunlara spesifik faz veya Faz: 1 antijenleri adı verilir(Bilgehan, 2004).

1.2.5.3. Vi yüzeysel antijeni

Salmonella'larda bulunanan “Vi” antijeni, Somatik “O” antijeninin en dışında glikolipid yapısında yüzeysel bir antijendir. *Salmonella*'ların tümünde bulunmaz. Bulunması halinde bakterilerin anti-O bağışık serumları ile aglütinasyonunu önler. 60

derecede bir saat ısıtıldığında bakterilerden ayrılarak etkinliğini kaybeder(Bilgehan, 2004).

Diğer antijenlerden M antijeni *S. Paratyphi B* ve mukoid koloni oluşturan bazı *Salmonella* 'larda bulunur ve O serumlarına karşı O aglutinasyonunu önler. Ayrıca formale dirençli, ısıya duyarlı fimbriantijenleri vardır.

İzole edilen *Salmonella*'ların serotiplendirilmesi buldukları O ve H antijenlerinin belirlenmesi ile olur(Gast, 2003). İdentifikasyonda öncelikle "O" grubu antiserumların karışımı kabul edilen *Salmonella* polivalan antiserumu ile yapılan aglutinasyon testinde pozitif sonuç elde edilir ise, incelenen etkenin *Salmonella* spp. olduğu kabul edilip, daha sonra "O" spesifik grup antiserumları(A, B, C, D,...Z) ile bu etken tekrar aglutinasyona 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. Salmonella'nın Ekonomik Boyutu

Salmonella enfeksiyonlarının ekonomik ölçüler açısından önemi görmezden gelinemez. Kanatlılarda bazen ciddi kayıplı hastalığa yol açarlar ve bu yetiştirici açısından büyük masraf demektir. İnsanlarda gıda zehirlenmesi meydana geldiği takdirde etkilenen kişi açısından gelir kaybı ve toplumda verim kaybı şeklindeki kayıplar söz konusudur. Buna ek olarak *Salmonella*'nın kanatlılarda ya da kanatlı ürünlerinde varlığı uluslararası ticareti aksatır. *Salmonella*'nın gıdalardaki varlığı tüketiciler tarafından kabul edilebilirliğini etkiler ve bu durum özel işleri kayda değer şekilde olumsuz etkiler. Örneğin birkaç yıl önce *Salmonella* İngiltere'de bir bebek mamasına bulaşmış ve bu marka artık piyasada bulunmamaktadır. Sofralık yumurtalarda *S. Enteritidis* sorununun başlangıcında sofralık yumurtaların tüketimi olumsuz etkilenmiştir. Günümüzde *Salmonella*, kontrol ve izlemesi birçok kanatlı yetiştiricisine katlanan bir maliyet getirmiştir. Son olarak, birçok ülkede belirli tipteki sürüler kesime gönderilmiş ya da ürünleri ekonomik açıdan daha az değerli kanallara yönlendirilmiştir. Bunun iyi bir örneği bazı ülkelerde *S. Enteritidis*'li bir sürünün yumurtalarının pastörize edilmesinin gerekliliğidir.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Drag Svap Örnekleri

2013-2014 yılları arasında Adapazarı ve Düzce’de bulunan 46 farklı işletmeden, her birinden ikişer adet olmak üzere toplam 130 adet drag-svap örneği alınmıştır. Drag-svablar galoş üzerine geçirilmiş ve kümes içi ağır ağır gezinerek tamamen dolaşmıştır. Yaklaşık 20 dk süren bu işlem sonunda pet steril poşet içine koyulmuş ve üzerine 20ml tamponlanmış peptolu su dökülmüştür. Örnekler soğuk zincir kurallarına uyularak bir gün içinde laboratuvara getirilmiştir.



Şekil 2.1. Drag-svap örnekleme öncesi.



Şekil 2.2. Drag-svap örnekleme sonrası.



Şekil 2.3. Ön zenginleştirme yapılmış drag-swab örneği.

2.2. Besiyerleri

2.2.1. Tamponlanmış peptonlu su(Buffered Peptone Water, BP)

Alınan örneklerden *Salmonella* izolasyonu yapılmasında ve BAX[®] Q7 PCR testi için önzenginleştirme aşamasında kullanılmak üzere Buffered Peptone Water(BPW) (kat.no:1.07228.0500)] kullanılmıştır.

MERCK Buffered Peptone Water(BPW)

1 litre içerisindeki maddeler ve ortalama miktarları aşağıdaki gibidir.

| | |
|---|--------|
| Peptone from Casein | 10.0 g |
| Sodium chloride | 5.0 g |
| Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate | 9.0 g |
| Potassium dihydrogen phosphate | 1.5 g |

Hazırlanışı: Toz BPW 25.5 g tartılıp 1 litre distile suyla karıştırılmış ve su banyosunda homojen hale gelene kadar eritilmiştir. 121°C’de 15 dakika otoklav edilmiştir. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra 50°C’ye kadar soğutulup sterilite kontrolü için 37°C’de 1 gün inkube edildikten sonra, kontaminasyon sonucu üremeye bağlı renk değişimi ve bulanıklık yönünden incelenmiştir. Renk değişimi ve bulanıklık

görülmeyen steril besiyerleri +4°C'lik buzdolabına kaldırılarak en fazla 1 hafta içinde ön zenginleştirme amacıyla kullanılmıştır.

2.2.2. Rappaport vassiliadis soy broth

MERCK Rappaport Vassiliadis Broth(RVS Broth)(kat. no: 1.07700.0500). *Salmonella*'nın örneklerden izolasyonu için zenginleştirme aşaması için kullanılmıştır.

MERCK Rappaport Vassiliadis Soya Broth(RVS Broth)

1 litre içerisindeki maddeler ve ortalama miktarları aşağıdaki gibidir.

| | |
|---------------------------------|---------|
| Peptone from soymeal | 4.5 g |
| Magnesium chloride hexahydrate | 28.6 g |
| Sodium chloride | 7.2 g |
| Di-potassium hydrogen phosphate | 0.18 g |
| Potassium di-hydrogen phosphate | 1.26 g |
| Malachite-green | 0.036 g |

Hazırlanışı: Toz Rappaport Vassiliadis brothdan 41.8 g tartılıp 1 litre distile suyla karıştırılmış ve su banyosunda homojen hale gelene kadar eritilmiştir. 121 °C'de 15 dakika otoklav edilmiştir. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra 50 °C'ye kadar soğutulup steril vidalı kapaklı cam tüplere 10'ar ml dağıtıldıktan ve sterilite kontrolü için 37 °C'de 1 gün inkube edildikten sonra, kontaminasyon sonucu üremeye bağlı renk değişimi ve bulanıklık yönünden incelenmiştir. Renk değişimi ve bulanıklık görülmeyen steril besiyerleri +4°C'lik buzdolabına kaldırılarak en fazla 1 hafta içinde *Salmonella* izolasyonu amacıyla zenginleştirme aşamasında kullanılmıştır.

2.2.3. Mueller kaufmann tetrathionate broth (base)

MERCK Tetrathionate broth(base)(kat. no: 1.05285.0500). *Salmonella*'ların örneklerden izolasyonu için zenginleştirme aşaması için kullanılmıştır.

MERCK Tetrathionate broth(base)

1 litre içerisindeki maddeler ve ortalama miktarları aşağıdaki gibidir.

| | |
|---------------------|--------|
| Peptone from casein | 2.5 g |
| Peptone from meat | 2.5 g |
| Bile salt mixture | 1.0 g |
| Calcium carbonate | 10.0 g |
| Sodium thiosulfate | 30.0 g |

Hazırlanışı: Toz Tetrathionate brothdan 46 g tartılıp 1 litre distile suyla karıştırılmış ve yavaşça ısıtılarak kaynama noktasına getirilmiştir. Hızla soğutulmuş ve kullanımdan önce 20ml/l olacak şekilde iodine/potasyum iyodür çözeltisi ve % 0.1'lik brilliant green çözeltisinden 10 ml/l olacak şekilde ilave edilerek karıştırılmıştır. Steril vidalı kapaklı cam tüplere 10'ar mililitre dağıtılmış ve katkıları ilave edilmiş besiyerleri aynı gün içerisinde *Salmonella* izolasyonu amacıyla zenginleştirme aşamasında kullanılmıştır.

2.2.3.1. İodine/potasyum iyodür çözeltisi

Potasyum iyodür(Merck, kat. no:1.05043) ve resublime iyot(Merck, kat. no: 1.04761) çözelti halinde tetrathionate broth(base) hazırlanışında kullanılmıştır.

Hazırlanışı: 20 ml distile su içinde 5 g potasyum iyodür ve 4 g resublime iyot eritildi. Tetrathionate broth(base) içerisinde 20ml/l olacak şekilde karıştırılmıştır.

2.2.3.2. Brilliant Green çözeltisi

Brilliant green(Merck,kat. no:1.01310) %0.01' lik brilliant green çözeltisi hazırlanışında kullanılmıştır.

Hazırlanışı: 100 ml distile su içinde 0.01 g brilliant green eritilmiştir. Tetrathionate broth(base) içerisinde 10ml/l olacak şekilde karıştırılmıştır.

2.2.4. Xylose Lysin Deoxycholate Agar(XLD)

XLD Agar(MERCK, kat. no: 1.05287.0500). *Salmonella*'ların örneklerden izolasyonunda selektif katı besiyeri olarak kullanılmıştır.

MERCK XLD Agar

1 litre içerisindeki maddeler ve ortalama miktarları aşağıdaki gibidir.

| | |
|----------------------------|--------|
| Yeast extract | 3.0 g |
| Sodium chloride | 5.0 g |
| Xylose | 3.75 g |
| Lactose | 7.5 g |
| Sucrose | 7.5 g |
| L(+) lysine | 5.0 g |
| Sodium deoxycholate | 1.0 g |
| Sodium thiosulfate | 6.8 g |
| Ammonium iron(III) citrate | 0.8 g |
| Phenol red | 0.08 g |
| Agar-agar | 14.5 g |

Hazırlanışı: Toz XLD Agar'dan 55.0 g tartılıp 1 litre distile suyla karıştırılmış, yavaşça ısıtılarak kaynama noktasına getirilmiştir. Hızla 50-55 0 C' ye soğutulup steril 9 cm'lik petrilere 25'şer ml döküldükten sonra sterilite kontrolü için, 1 gece 37 °C'lik etüvde bekletilmiştir. Kontrolde geçirilen besiyerleri +4 °C'lik buzdolabına kaldırılarak en fazla 1 hafta içinde *Salmonella* izolasyonu amacıyla kullanılmıştır.

2.2.5. Brilliant-Green Phenol-Red Lactose Sucrose Agar(BPLS)

BPLS Agar(MERCK, kat. no: 1.07237.0500). *Salmonella*'ların örneklerden izolasyonunda selektif katı besiyeri olarak kullanılmıştır.

BPLS Agar

1 litre içerisindeki maddeler ve ortalama miktarları aşağıdaki gibidir.

| | |
|------------------------------|----------|
| Peptone from meat | 5.0 g |
| Peptone from casein | 5.0 g |
| Meat extract | 5.0 g |
| Sodium chloride | 3.0 g |
| di-sodium hydrogen phosphate | 2.0 g |
| Lactose | 10.0g |
| Sucrose | 10.0g |
| Phenol red | 0.08g |
| Brilliant green | 0.0125 g |
| Agar-agar | 12.0g |

Hazırlanışı: Toz BPLS Agar'dan 57.0 g tartılıp 1 litre distile suyla karıştırılmış, yavaşça ısıtılarak kaynama noktasına getirilmiştir. 121 °C'de 15 dakika otoklav edilip, otoklavdan çıkarıldıktan sonra 50 °C'ye kadar soğutulup steril 9 cm'lik petrilere 25'şer ml döküldükten sonra sterilite kontrolü için, 1 gece 37 °C'lik etüvde bekletilmiştir. Kontrolde geçirilen besiyerleri +4 °C'lik buzdolabına kaldırılarak en fazla 1 hafta içinde *Salmonella* izolasyonu amacıyla kullanılmıştır.

2.2.6. Mueller-Hinton Agar(MH)

MH Agar(MERCK, kat. no: 1.05437.0500). *Salmonella* izolasyonunda şüpheli kolonilerden saf kültür elde etmek için kullanılmıştır.

MH Agar

1 litre içerisindeki maddeler ve ortalama miktarları aşağıdaki gibidir.

| | |
|--------------------|-------|
| Meat infusion | 2,0 g |
| Casein hydrolysate | 17,5g |
| Starch | 1,5 g |
| Agar-agar | 13,0g |

Hazırlanışı: Toz MH Agar'dan 34.0 g tartılıp 1 litre distile suyla karıştırılıp, yavaşça ısıtılarak kaynama noktasına getirilmiştir. 121 °C'de 15 dakika otoklav edilip,

otoklavdan çıkarıldıktan sonra 50 °C'ye kadar soğutulup steril 9 cm'lik petrilere 25'şer ml döküldükten sonra sterilite kontrolü için, 1 gece 37 °C'lik etüvde bekletilmiştir. Kontrolden geçirilen besiyerleri +4 °C'lik buzdolabına kaldırılarak en fazla 1 hafta içinde *Salmonella* şüpheli kolonilerden saf kültür elde etmek için kullanılmıştır.

2.3. BAX[®] Q7 *Salmonella* PCR kiti

Dupont Qualicon marka(BAX System PCR Assay *Salmonella* kod: D11000133, A.B.D.).

BAX[®] Q7 *Salmonella* PCR kit içeriği aşağıdaki gibidir.

- 96 adet içinde tableti ile PCR tüpleri
- 96 adet optik kapak
- Protease(400 µl)
- Lysis buffer(2x12)

2.4. BAX[®] system Q7 makinesi

PCR reaksiyonları BAX[®] system Q7 makinesi ile gerçekleştirilmiştir.

2.5. Bilgisayar

BAX[®] Q7 PCR uygulama programı analizin yürütülmesi ve sonuçların görüntülenmesi için kullanılmıştır.

2.6. Isıtıcı Bloklar

Dupont marka(Dry Block Heater) 2 adet ısıtıcı blok DNA ekstraksiyonu sırasında, reagentlerin uygun sıcaklığa getirilmesi ve bu sıcaklıklarda gereken beklemenin yapılması amacıyla kullanılmıştır.

2.7. Soğutucu Bloklar

2 adet soğutucu blok DNA ekstraksiyonu sırasında, reagentlerin uygun sıcaklığa getirilmesi ve bu sıcaklıklarda gereken beklemenin yapılması amacıyla kullanılmıştır.

2.8. Optik Kapakların Açılıp Kapatılmasını Sağlayan Aletler

Cluster tüp kapağı ve PCR reaksiyon tüpünün optik kapağını açılıp kapatılırken kullanılmıştır.

2.9. Otomatik Pipetler

Stepper(Thermo Finnpiette, CJ 08700.4540, Thermo Fisher Scientific, ABD,), 5-50 µl(Thermo Finnpiette, CJ 077885.4500, Thermo Fisher Scientific, ABD,), 5-50 µl sekiz kanallı(Thermo Finnpiette, CJ 09617.4510, Thermo Fisher Scientific, ABD,), 20-200 µl(Thermo Finnpiette, CJ 17642.4500, Thermo Fisher Scientific, ABD,)’ lik pipetler PCR reaksiyonu sırasında ve DNA ekstraksiyonları aşamalarında kullanılmıştır.

2.10. Otomatik Pipetler İçin Pipet Uçları

5-50 ve 20-200µl pipetler(Finntip 250 Universal steril Cat: 9400263), stepper(Finntip stepper sterile 5ml. Cat.9404203) için steril pipet uçları kullanılmıştır.

2.11. Steril Plastik Pipetler

1 ml(LP Italiana Spa; Milano- Italy, 160110) ve 10 ml(LP Italiana Spa; Milano- Italy, 161010)’lik pipetler bakteriyolojik analizler ve besiyeri hazırlık aşamalarında kullanılmıştır.

2.12. Deiyonize Saf Su Sistemi

NUVE marka(NS 103, Ankara, Türkiye). İzolasyon sırasında kullanılacak besiyerlerinin hazırlanmasında, kullanılacak olan cam ya da plastik malzemenin temizliğinde kullanılmıştır.

2.13. Buzdolabı

Arçelik marka(model: 3061 plus, Türkiye). 2-4 °C’de saklanması gereken malzemelerin ve besiyerlerinin saklanması amacıyla kullanılmıştır.

2.14. Laminer Hava Kabini

NÜVE marka(NÜVE, model: LN120, Ankara, Türkiye). Bakteri izolasyonu ve DNA ekstraksiyonu yapılırken gereken steril ortamın sağlanması amacıyla kullanılmıştır.

2.15. İnkübatör

NÜVE marka(Model: EN 055, Ankara, Türkiye). Bakteri izolasyonu için gerekli inkubasyon ısılarının sağlanması amacıyla kullanılmıştır.

2.16. Hassas Terazı

Sartorius Marka(Model: GM 2202, Germany). *Salmonella* izolasyonunda kullanılan besiyerlerinin hazırlanmasında gerekli tartımların yapılabilmesi için kullanılmıştır.

2.17. Dupont Riboprinter® Sistem kiti

Dupont Qualicon marka(RiboPrinter® Sistem kod: D12531875, A.B.D.).

Riboprinter® kit içeriği aşağıdaki gibidir:

- 8 adet DNA prep pack
- 8 adet jel kaset
- 8 adet membran
- 8 adet Riboprinter® Sistem restriction enzim
- 8 adet prob
- 8 adet konjugat
- 8 adet substrat
- 2 adet 2 litrelik saf su

2.17.1. Dupont Riboprinter® sistem hazırlık paketi

Dupont Qualicon marka(RiboPrinter® Sistem kod: D10734042, A.B.D.).

RiboPrinter® sistem hazırlık paket içeriği aşağıdaki gibidir:

- Koloni çubukları
- Numune kuyucukları
- Tamponlanmış numune dilüsyon solüsyonu

2.18. Isıtıcı Blok

Kolonilerin ısı aracılığı ile inaktivasyonu ve inaktivasyonun durdurulması için soğutulması aşamalarında kullanılmıştır.

2.19. Dupont Riboprinter® Sistem Karakterizasyon Ünitesi

Dupont Qualicon marka RiboPrinter®(Sistem kod: D10734042, A.B.D.). Elde edilen izolataın identifikasyonu için kullanılmıştır.

2.20. Kültür

2.20.1. Drag-svab örneklerinden Salmonella izolasyonu

Laboratuarda örnekler 1:9 oranında tamponlanmış peptonlu su ile homojenize edilip, 35-37 ° C' da 16-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ön zenginleştirme ortamından 0.1 ml alınarak 10 ml'lik Rappaport Vasiliadis Soya(RVS) Broth'a ve Mueller Kaufmann Tetrathionate Broth'a inokulasyon yapıp, her ikisinde vortekste iyice karıştırıldıktan sonra 42 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her zenginleştirme ortamından Xylose Lysine Desoxycholate Agar(XLD) ve Brilliant Green Phenol-Red Lactose Sucrose Agar(BPLSA)'a çizgi ekim yöntemine göre ekim yapılmış

ve petrilere 24 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda XLD agarda siyah merkezli pembe koloniler, BPLS agarda ise pembe-kırmızı renkte ve çevrelerinde kırmızı zon oluşturan koloniler seçilerek Mueller-Hinton(MH)'a saflaştırma ekim yöntemine göre ekim yapılmıştır. Riboprinter' da tiplendirme yapmak için bu saf kolonilerden seçilmiştir.

2.21. Bax Q7 System PCR

Tamponlanmış peptonlu su ile homojenize edilen örnekler 35-37 ° C' da 16-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda BAX System Q7 makinesi çalıştırılıp, bilgisayarda operasyon dosyası açılmıştır. Çalışılacak numunenin template dosyası hazırlanmıştır. 150 µl protease 12 ml lysis buffer ile karıştırılarak lysis reagent hazırlanıp, herbir cluster tüpe 200 µl lysis reagent eklenmiştir.

Cluster tüplerdeki lysis reagentlerin üzerine analizi yapılacak numunenin ön zenginleştirmesinden 5 µl eklenmiştir. Cluster tüpler kapakları kapatılarak daha önce ısıtılmış ısıtma bloklarında 35° C' da 20 dakika, 95° C' da 10 dakika lysis aşamasının gerçekleşmesi için ısıtılmıştır. Lysis tamamlanınca cluster tüpler soğutma bloğuna alınarak 5 dakika bekletilmiştir. PCR tüpleri soğutma bloğunda hazırlanmıştır. 5 dakikalık süre sonunda cluster tüplerdeki lizatlardan 50 µl PCR tüplerine aktarılmıştır. Optik kapaklar kapatılıp, template yerleşimine göre PCR tüpleri makineye yerleştirilmiş 210 dakika sonunda bilgisayardaki programda sonuçlar gözlenmiştir.

Temel olarak PCR yüksek sıcaklıkta yapısı bozulmayan bir DNA polimeraz kullanılarak bir ısı düzenleyici yardımıyla DNA replikasyonunun in vitro ortamda tekrarlanması sonucu DNA'nın çoğaltılmasını sağlamaktır. Spesifik DNA dizilerinin primer denilen sentetik oligonükleotid diziler yardımıyla çoğaltılması işlemidir. Standart bir PCR protokolü yoktur.

2.22. Dupont Riboprinter® Sistem

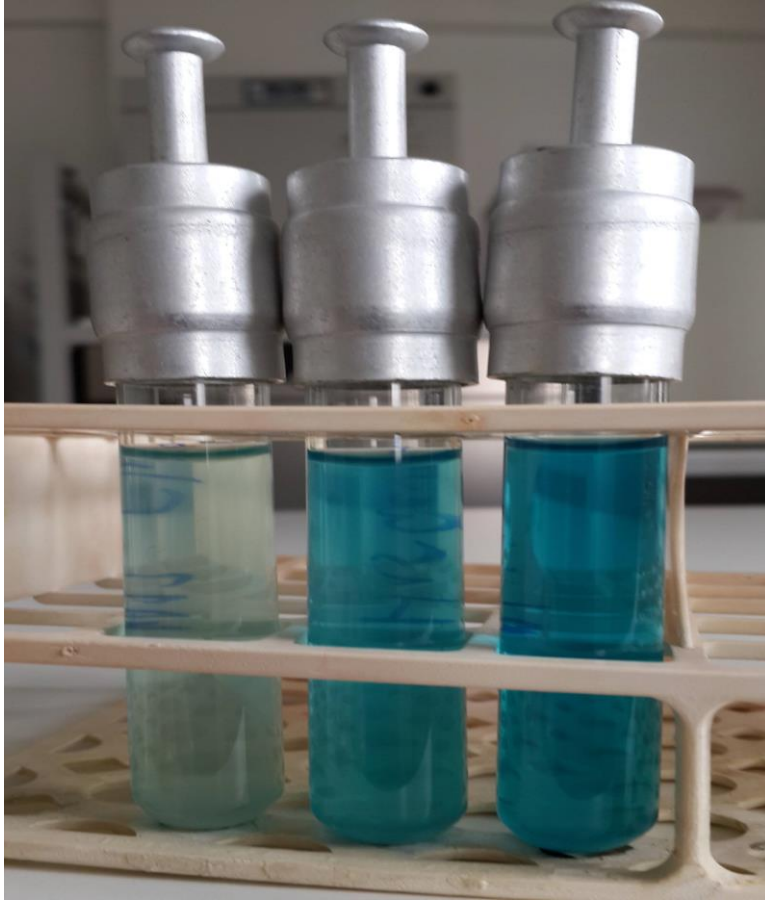
Besiyerinde üreyen kolonilerin MH agarda saf kültür olarak elde edilmesinden sonra Riboprinter® Sistem için 200 µl sample buffera 1 koloni eklenerek süspansiyon hazırlanıp 30 µl numune taşıyıcı tüpe aktararak ısıtma bloğuna konulmuştur. Bilgisayar programı üzerinde gereken bilgiler girildikten sonra ısıtma işlemi biten numune tüpü ve enzim, MP base, konjugat, prob, substrat, jel kaset, membran gibi sarf malzemeleri de makineye konarak program başlatılmıştır. Yaklaşık 8 saat sonunda bilgisayardaki programda sonuçlar gözlenmiştir.

Ribotiplendirmede total genomik DNA bir restriksiyon enzimiyle daha küçük fragmentlere parçalanır ve bu parçalar jel elektroforeziyle birbirinden ayrılma prensibine dayanır. Fragmentler jelden bir membrana transfer edilir ve ribozomal 16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genlerin korunmuş bölgelerine spesifik işaretlenmiş evrensel bir proba hibridizasyona tabi tutulur. Hibridizasyondan sonra fragmentleri göstermek için probların hibridize olduğu yerde probdaki işaret gözlemlenir. Ribotip denilen bu bantlar, referans bir tür veri bankasıyla karşılaştırılarak izolatların tanımlanması için kullanılabilir.

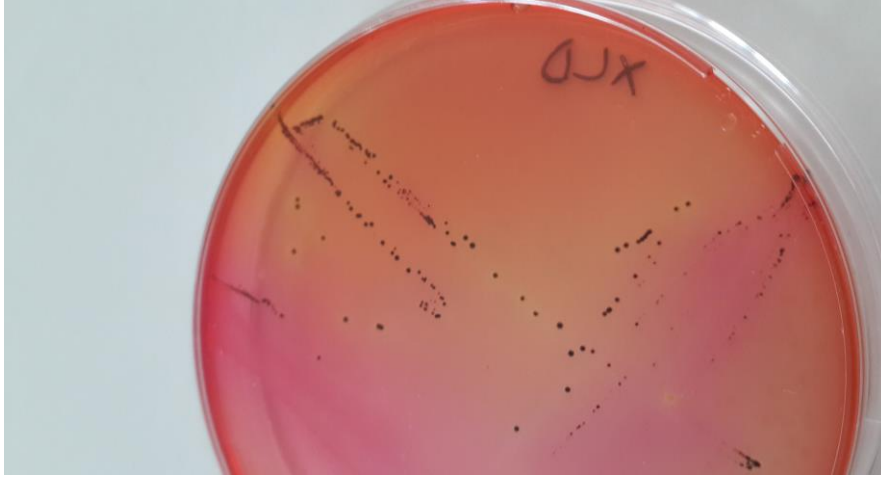
3. BULGULAR

3.1. Kültür Bulguları

İncelenen toplam 46 farklı kmesten her seferinde ikişer örnek olmak üzere alınan toplam 130 drag svap örneğinden çalışılan 65 numuneden kültür metodu ile toplam 19 örneğin(7, 12, 15, 17, 20, 25, 27, 28, 34, 36, 37, 42, 45, 46, 54, 55, 57, 60 ve 63) *Salmonella* pozitif olduğu görülmüştür.

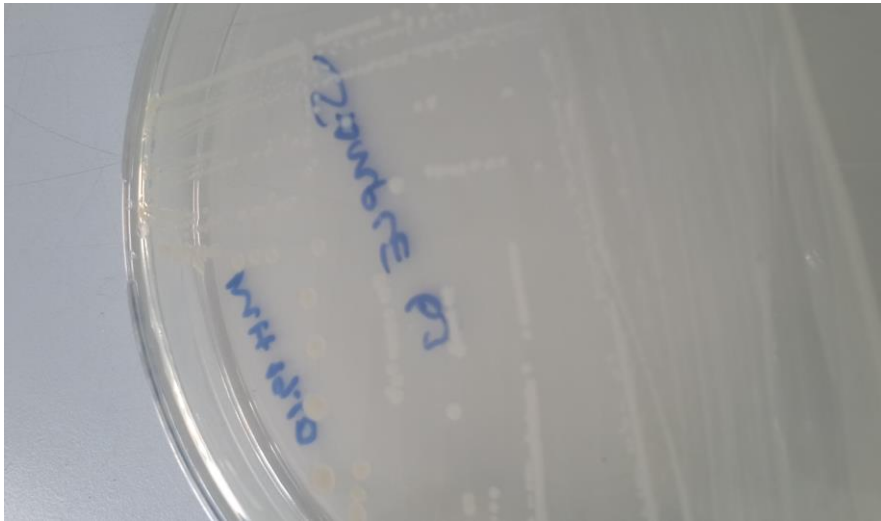


şekil 3.1. MERCK Rappaport Vassiliadis Soya Broth ‘da *Salmonella* zenginleştirme işlemi.



Şekil 3.2. XLD Agarda Salmonella kolonileri.

Sonuçlar BAX Q7 rPCR ile paralellik göstermiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda tespit edilen 19 pozitif örnek, ribotiplendirme analizi için Muller Hinton(MH)'a saflaştırma amacıyla ekimi yapılmıştır.



Şekil 3.3. Mueller-Hinton Agar(MH)'da saf koloni.

3.2. BAX Q7 rPCR Bulguları

Çalışılan numunelerde *Salmonella* DNA'sı varlığı yönünden toplam 19 örneğin(7, 12, 15, 17, 20, 25, 27, 28, 34, 36, 37, 42, 45, 46, 54, 55, 57, 60 ve 63) *Salmonella* pozitif olduğu görülmüştür. Analizi yapılan örnekler arasında *Salmonella* için tespit edilen pozitif ve negatif sonuçlarını gösteren cihaz verileri

kaydedilmiştir(Çizelge 3.1). Kültürel yöntemle de çalışılan örnek sonuçları benzerlik göstermiştir.

Çizelge 3.1. BAX Q7 rPCR bulguları.

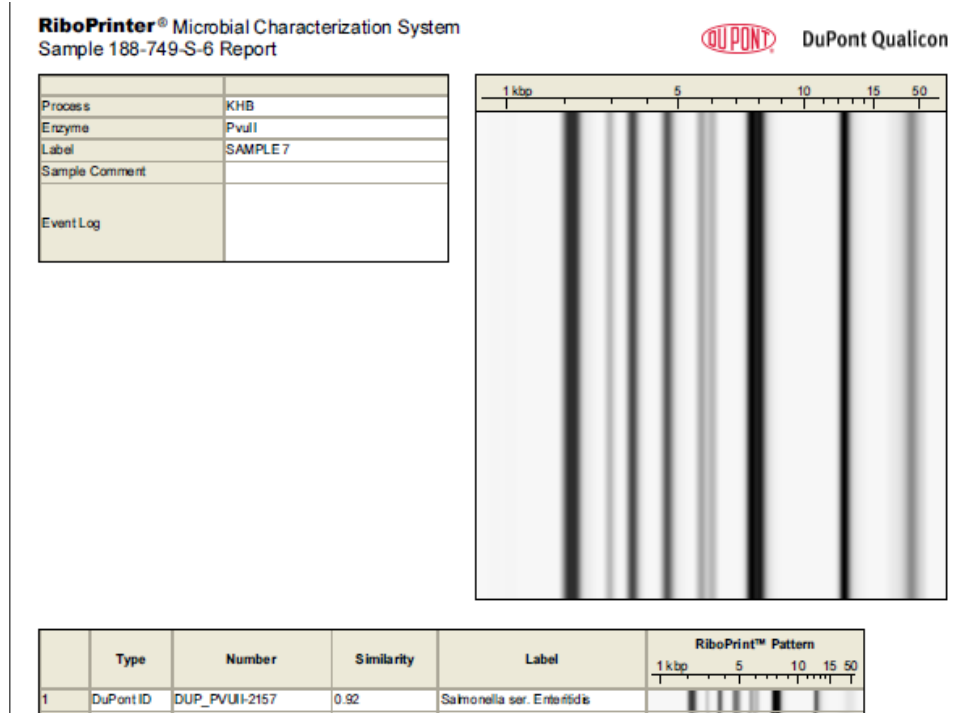
| Sample ID | Result | Target | Control | Positive Contr |
|-----------|----------|------------|----------|----------------|
| SAMPLE 1 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 2 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 3 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 4 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 5 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 6 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 7 | Positive | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 8 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 9 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 10 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 11 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 12 | Positive | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 13 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 14 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 15 | Positive | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 16 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 17 | Positive | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 18 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 19 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 20 | Positive | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 21 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 22 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 23 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 24 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 25 | Positive | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 26 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 27 | Positive | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 28 | Positive | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 29 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 30 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 31 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 32 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 33 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 34 | Positive | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 35 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 36 | Positive | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 37 | Positive | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 38 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 39 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 40 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 41 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 42 | Positive | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 43 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 44 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 45 | Positive | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 46 | Positive | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 47 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 48 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 49 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 50 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 51 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 52 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 53 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 54 | Positive | Salmonella | Internal | Negative |
| SAMPLE 55 | Positive | Salmonella | Internal | Negative |
| SAMPLE 56 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 57 | Positive | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 58 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 59 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 60 | Positive | Salmonella | Internal | Negative |
| SAMPLE 61 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 62 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 63 | Positive | Salmonella | Internal | Negative |
| SAMPLE 64 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |
| SAMPLE 65 | Negative | Salmonella | Internal | Positive |

3.3. Ribotiplendirme Bulguları

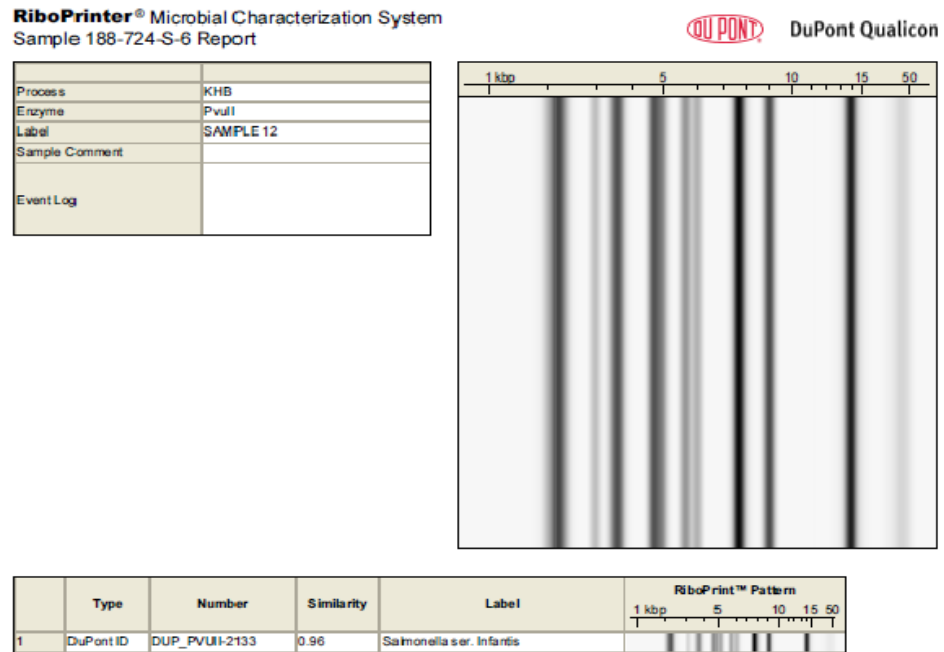
Klasik kültür metodu ve rPCR analizi sonucu elde edilen 19 adet *Salmonella* izolatının her biri için Ribotiplendirme analizi gerçekleştirilmiştir. Bu örneklerden 10 tanesinin *Salmonella ser. Enteritidis*(%52.6), 3 tanesinin *Salmonella ser. Lille*(%15.8), 2 tanesinin *Salmonella ser. Infantis*(%10.5), ve birer tanesinin(%5.3) de *Salmonella ser. Hadar*, *Salmonella ser. Give*, *Salmonella ser. Typhimurium* ve *Salmonella ser. Arizonae/III* oldukları tespit edilmiştir(Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Pozitif örneklerde tespit edilen *Salmonella* tipleri.

| Pozitif Örnek Numarası | <i>Salmonella</i> Tipi |
|------------------------|------------------------------------|
| Örnek 7 | <i>Salmonella ser. Enteritidis</i> |
| Örnek 12 | <i>Salmonella ser. Infantis</i> |
| Örnek 15 | <i>Salmonella ser. Enteritidis</i> |
| Örnek 17 | <i>Salmonella ser. Lille</i> |
| Örnek 20 | <i>Salmonella ser. Enteritidis</i> |
| Örnek 25 | <i>Salmonella ser. Enteritidis</i> |
| Örnek 27 | <i>Salmonella ser. Infantis</i> |
| Örnek 28 | <i>Salmonella ser. Lille</i> |
| Örnek 34 | <i>Salmonella ser. Enteritidis</i> |
| Örnek 36 | <i>Salmonella ser. Enteritidis</i> |
| Örnek 37 | <i>Salmonella ser. Enteritidis</i> |
| Örnek 42 | <i>Salmonella ser. Enteritidis</i> |
| Örnek 45 | <i>Salmonella ser. Enteritidis</i> |
| Örnek 46 | <i>Salmonella ser. Hadar</i> |
| Örnek 54 | <i>Salmonella ser. Give</i> |
| Örnek 55 | <i>Salmonellaser. Arizonae/III</i> |
| Örnek 57 | <i>Salmonella ser. Lille</i> |
| Örnek 60 | <i>Salmonella ser. Enteritidis</i> |
| Örnek 63 | <i>Salmonella ser. Typhimurium</i> |



Şekil 3.4. Riboprinter’da *Salmonella ser. Enteritidis* karakterizasyonu.

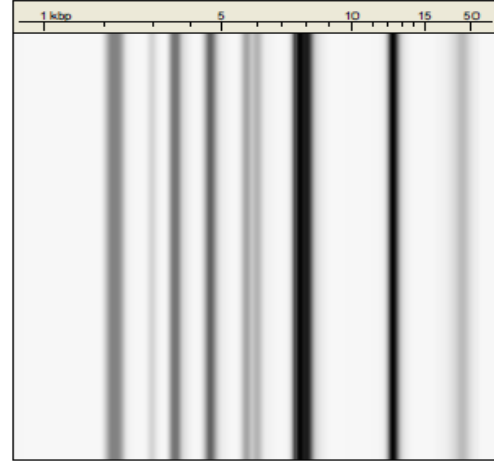


Şekil 3.5. Riboprinter’da *Salmonella ser. Infantis* karakterizasyonu.

RiboPrinter® Microbial Characterization System
Sample 188-749-S-2 Report

DU PONT® DuPont Qualicon

| | |
|----------------|-----------|
| Process | KHB |
| Enzyme | PvuII |
| Label | SAMPLE 17 |
| Sample Comment | |
| Event Log | |



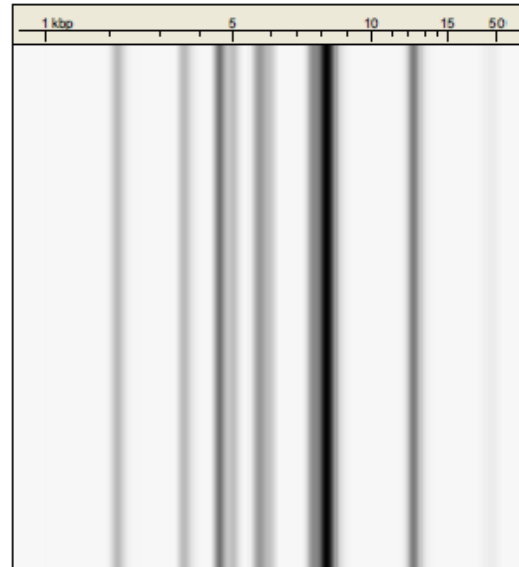
| | Type | Number | Similarity | Label | RiboPrint™ Pattern |
|---|-----------|----------------|------------|-----------------------|--------------------|
| 1 | DuPont ID | DUP_PVUII-1085 | 0.93 | Salmonella ser. Lille | |

Şekil 3.6. Riboprinter'da *Salmonella ser. Lille* karakterizasyonu.

RiboPrinter® Microbial Characterization System
Sample 188-732-S-5 Report

DU PONT® DuPont Qualicon

| | |
|----------------|-----------|
| Process | KHB |
| Enzyme | PvuII |
| Label | SAMPLE 46 |
| Sample Comment | |
| Event Log | |



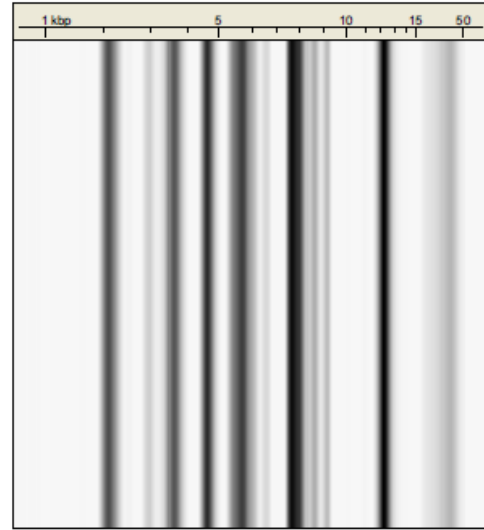
| | Type | Number | Similarity | Label | RiboPrint™ Pattern |
|---|-----------|----------------|------------|-----------------------|--------------------|
| 1 | DuPont ID | DUP_PVUII-1061 | 0.97 | Salmonella ser. Hadar | |

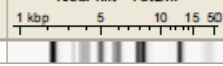
Şekil 3.7. Riboprinter'da *Salmonella ser. Hadar* karakterizasyonu.

RiboPrinter® Microbial Characterization System
Sample 188-515-S-2 Report

 DuPont Qualicon

| | |
|----------------|-----------|
| Process | KHB |
| Enzyme | PvuII |
| Label | SAMPLE 54 |
| Sample Comment | |
| Event Log | |



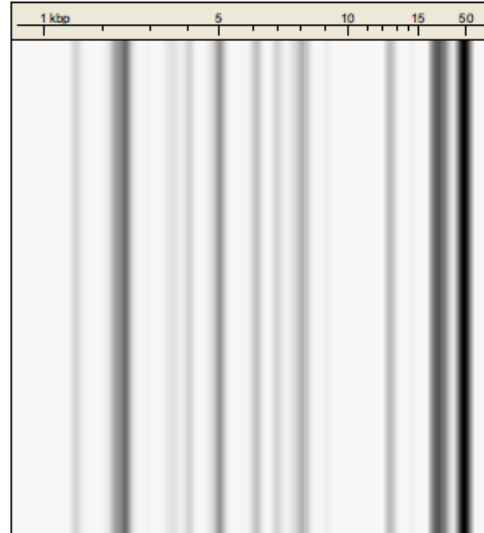
| | Type | Number | Similarity | Label | RiboPrint™ Pattern |
|---|-----------|----------------|------------|----------------------|---|
| | | | | | 1 kbp 5 10 15 50 |
| 1 | DuPont ID | DUP_PVUII-1057 | 0.87 | Salmonella ser. Give |  |

Şekil 3.8. Riboprinter'da *Salmonella ser. Give* karakterizasyonu

RiboPrinter® Microbial Characterization System
Sample 188-538-S-5 Report

 DuPont Qualicon

| | |
|----------------|-----------|
| Process | KHB |
| Enzyme | PvuII |
| Label | SAMPLE 55 |
| Sample Comment | |
| Event Log | |



| | Type | Number | Similarity | Label | RiboPrint™ Pattern |
|---|-----------------|----------------|------------|-------------------------|---|
| | | | | | 1 kbp 5 10 15 50 |
| 1 | DuPont Neighbor | DUP_PVUII-3117 | 0.58 | Salmonella Arizonae/III |  |

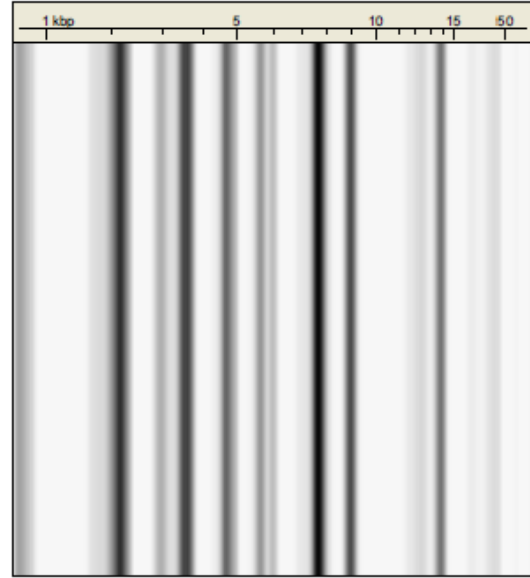
Şekil 3.9. Riboprinter'da *Salmonella Arizonae/III* karakterizasyonu.

RiboPrinter® Microbial Characterization System
Sample 188-709-S-6 Report



DuPont Qualicon

| | |
|----------------|-----------|
| Process | KHB |
| Enzyme | PvuII |
| Label | SAMPLE 63 |
| Sample Comment | |
| Event Log | |



| | Type | Number | Similarity | Label | RiboPrint™ Pattern |
|---|-----------------|----------------|------------|-----------------------------|--------------------|
| | | | | | 1 kbp 5 10 15 50 |
| 1 | DuPont Neighbor | DUP_PVUII-1171 | 0.81 | Salmonella ser. Typhimurium | |

Şekil 3.10. Riboprinter'da *Salmonella ser. Typhimurium* karakterizasyonu.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Salmonella bakterileri insandan tavuğa, yılandan kaplumbağaya kadar çok sayıda farklı konakçıyı etkileyebilecek bir spektruma sahiptir. Dolayısı ile özellikle bazı hayvan türleri başta olmak üzere türler arası bulaşma potansiyeline sahip olup; ayrıca zoonotiktirler. Bunlardan sadece 200 kadarı kanatlılarla ilgilidir. Bu türler içerisinde ise en dominant olarak bulunan serovarlar kanatlı sektörünün değişik basamaklarında farklılık göstermektedir(Khakhria ve ark., 1997; Limawongpranee ve ark., 1999).

Dünya çapında, paratifoid *Salmonella*'lar gıda kaynaklı hastalık ajanlarının en yaygın olanları arasındadır ve 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 ve Amerika'da çoğunu tavuk ve yumurtaların oluşturduğu gıda kaynaklı zehirlenmelerin en yaygın sebeplerinden biridir(Rabsch ve ark., 2001; Medici ve ark., 2003;Hargis ve ark., 1995; Medici ve ark., 2003; Suzuki, 1994). Çalışmamızdan elde edilen verilerde *Salmonella ser. Enteritidis*'in diğer serotiplere göre en yüksek orana sahip olması bu bilgiyi destekler niteliktedir.

İnsanlar ve hayvanlar için önemli enfeksiyon nedenlerinden biri olan *Salmonella*'lara ülkemizin değişik bölgelerinde insan ve hayvanlarda sıklıkla rastlanmaktadır. Zoonotik olmalarının yanında ekonomik kayıplara da neden olmaktadır(Bilgehan, 1992; Gyles ve ark., 1986). Ülkemizde, 1989 yılında Bursa bölgesinde Çarlı, hastalıklı tavuk dışkılarından toplam 197 adet *Salmonella* suşu izole etmiş, 186'sını *S. Gallinarum*, 7'sini *S. Typhimurium*, 2'ser adedini de *S. Pullorum* ve *S. Infantis* olarak tanımlamıştır(Çarlı, 1990).

1995 yılında yapılan iki çalışmadan birinde Özdemir, Bandırma ve Bursa bölgelerinde incelediği *Salmonella* enfeksiyonundan şüpheli 24 ticari yumurtacı işletmenin 21'inden, 7 broiler işletmesinin ise 2' sinden izolasyon yapmıştır. İzole edilen suşların yumurtacılarda 13'ünün *S. Gallinarum*, 5'inin *S. Enteritidis* ve 3'ünün *S. Typhimurium* broilerlerde ise 1'inin *S. Enteritidis* ve 1'inin ise *S. Gallinarum* olduğunu rapor etmiştir(Özdemir, 1995).

Diğer bir çalışmada ise Goncagül ve Çarlı tarafından Bursa, İstanbul ve İzmir bölgelerinde broiler damızlıklardan 4 adet *S. Gallinarum*, 5 adet *S. Typhimurium*, 3 adet *S. Enteritidis*; ticari yumurtacı sürülerden 4 adet *S. Gallinarum*, 3 adet *S. Typhimurium*, 5 adet *S. Enteritidis*; ticari broilerden 2 adet *S. Gallinarum*, 3 adet *S. Typhimurium*, 3 adet *S. Enteritidis* izole edildiği rapor edilmiştir(Goncagül ve ark., 1999).

1940'lı yıllardan beri, insan ve hayvanlardan spesifik konakçısı olmayan *Salmonella* serovarlarının izolasyonunda hızlı bir artış bulunmaktadır ve bu serovarlar hala genç tavuklarda önemli kayıplara neden olmaya devam etmektedir(Oliveira ve ark., 2002).

Bu çalışmada 46 farklı broiler tipi kümeden farklı zamanlarda her defasında 2 adet olmak kaydıyla 130 adet drag-swab örneği alınmış ve toplamda 65 adet numunede *Salmonella* aranmıştır. Klasik kültür yöntemiyle de desteklenen BAX rPCR çalışmalarımızın sonunda 19 adet(%29.23) pozitif sonuç tespit edilmiştir. Pozitif örnekler arasında, yapılan ribotiplendirme analizi sonucunda en fazla olan serotipin %52.6 oranla *Salmonella ser. Enteritidis* olduğu görülmüştür. Bu serotip dışında 6 farklı serotipin; *Salmonella ser. Lille*(%15.8), *Salmonella ser. Infantis*(%10.5), *Salmonella ser. Hadar*(%5.3), *Salmonella ser. Give*(%5.3), *Salmonella ser. Typhimurium*(%5.3) ve *Salmonella Arizonae/III*(%5.3) de varlığına rastlanılmıştır. Bu sonuç ülkemizde ve dünyada yapılmış birçok çalışma ile benzerlik göstermektedir(Ata Z. ve Aydın N., 2003, Temelli ve ark., 2010, Eyigör ve ark., 2002, Eyigör ve ark., 2005;Zhang, L. ve ark., 2006, Van Hoorebeke, S. ve ark., 2010).

Tavuk dışkı, iç organ ve karkaslarında *Salmonella* türlerinin hem PCR hem de standart kültür metodu ile identifikasyonu ve belirlenmesinin araştırıldığı bir çalışmada, Oliveria ve arkadaşları(2002), 64 drag svab örneğini, *Salmonella* spp. yönünden standart kültür metodu ile incelemişler ve 16 adet drag-svab örneğinden(% 25) etkeni izole etmişlerdir. Oliveria ve arkadaşları(2003), 49 drag svab örneğinden 3(% 6.12)'ünde standart kültür metodu ile *Salmonella* spp. izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Kanatlı hayvanların ve insanların zaman zaman sağlığını tehdit eden *Salmonella* 'ların kültür metodu ile tanı süreleri oldukça uzun sürmektedir. Bu nedenle de Amerika Birleşik Devletleri ve bazı Avrupa ülkelerinde optimize edilmiş, kültür yöntemi 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(Oliveria ve ark., 2002, Baumler ve ark., 1997; Çarlı ve ark., 2001; Feder ve ark., 2001; Woodward ve ark., 1996). Çalışmamızda kullanılan BAX rPCR sistemi de, *Salmonella* teşhisinde gerçek zamanlı PCR sistemi olup, hedefe özgü problara sahip tabletleri kullanmaktadır(Kahya ve ark., 2014, Tomazelli ve ark.; 2008; Tice ve Ark., 2009a; Tice ve Ark., 2009b; Löffström ve ark., 2009; Francin ve ark. 2006; Sommer ve ark., 2012).

Serolojik testler konakçı-bağımsız *Salmonella* enfekte bireyleri tanımak için düşük özgünlüğe sahiptir ve bundan dolayı da yanlış pozitif veya negatif sonuçlara neden olabilir(Çarlı ve ark., 2001; Fricker, 1987). Buna ek olarak serovar-özgün serolojik testler sadece kendi serovarı ile enfekte bireyi belirler; bu durumda sürüde birden fazla sayıda serovar varlığında kendi taradığı serovar dışındakini yakalayamaz ya da ülkelere göre serovar dağılımındaki farklılıktan dolayı, serolojik test uygulanırsa bile kendi serovarı o yörede yok ise boşuna masraf edilmiş olunur. Bu nedenle tavuk sürülerinin yüksek özgünlükte ve duyarlılıkta *Salmonella* arama testleri ile taranması en akılcı yaklaşım olacaktır. *Salmonella* izolasyonunun ve identifikasyonunun tam olarak yapılması 5 ile 11 gün arasında bir zaman sürecini gerektirmektedir(Wallace ve ark., 1999). Bu süre, özellikle kanatlı üreticilerinin gerekli kontrol önlemlerini alması için uzun bir süredir(Aabo ve ark., 1995; Nastasi ve ark., 1999; Soumet ve ark., 1994). Çalışmamızda *Salmonella* izolasyonu 24 saat gibi kısa bir sürede yapılmıştır. *Salmonella* örneklerinin tiplendirme işlemleri de yaklaşık 120 saatte gerçekleştirilmiştir. Zamanla ilgili bu problem polimeraz zincir reaksiyonu tabanlı moleküler biyolojik, hızlı bir yöntem uygulaması ile çözülebilmektedir. Son yıllarda gelişmiş batı ülkeleri de, gıda ürünlerinin değişik bakteriyel etkenler yönünden kontrolünde, PCR tabanlı testler gibi hızlı güvenilir moleküler mikrobiyolojik testlerden faydalanmaktadır(Aabo ve ark., 1995; Nastasi ve ark., 1999; Soumet ve ark., 1994). AOAC(Association Of Analytical Communities) onaylı yöntemler hem hız kazandırmakta hem de güvenilirlik artırmaktadır. Çalışmamızda elde edilen verilerden de anlaşıldığı gibi, gelişen teknoloji ve yapılan çalışmalara bağlı olarak gelecekte hızlı olan moleküler tekniklere yönelimin daha da artacağını görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aabo S., Andersan J. K., and Olsen J. E., “Research note: Detection of Salmonella in Minced Meat by The Polymerase Chain Reaction Method”, *Letters in Applied Microbiology*, 21: 180-182 (1995).
- Arda, M. Minbay, A. Aydın, N. Akay, Ö. İzgür, M. Yardımcı, H. Esendal, Ö.M. Erdeger, J. Akan, M. “Kanatlı Hayvan Hastalıkları” *Medisan Yayınları*, 26: Ankara, (2002).
- Ata, Z. ve Aydın, N., “Ankara Bölgesindeki Tavukçuluk İşletmelerinde *Salmonella* spp. İzolasyonu”, *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 55: 161–168 (2008).
- Barrow, P.A. “The Paratyphoid Salmonellae”, *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 19: 351-375 (2000)
- Baumler, A.J., Heffron, F.ve Reissbrodt, R., “Rapid Detection of *Salmonella enterica* with Primers Specific for *iroB*,” *Journal of Clinical Microbiology*, 35:1224-1230 (1997)
- Bilgehan, H., “Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları”, *Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi*, 24-45 (1992)
- Bilgehan, H., “Klinik Mikrobiyolojik Tanı”, *Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları*, İzmir, 425-455 (2004).
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., Swaminathan, B., “*Salmonella* Nomenclature”, *Journal Clinical Microbiology*, 38: 2465-2467 (2000).
- Cotter, P.F., Murphy, J.E., Klinger, J.D., Taylor, R.L., “Identification *Salmonella* Enteritidis From Experimentally Infected Hens Using a Colorimetric DNA Hybridization Method” *Avian Diseases*, 39: 873-878 (1995)
- Çarlı, K. T., “Bursa Bölgesindeki Broiler ve Yumurta Tipi Tvuklardan İzole Edilen *Salmonella* Türleri Üzerinde Bakteriyolojik ve Serolojik Çalışmalar”, *Doğa Türk Veteriner Hayvancılık Dergisi*, 14: 428-438 (1990)
- Çarlı, K.T., Unal, C. B., Caner, V., Eyigör, A., “Detection of Chicken Feces by a Combination of Tetrathionate Broth Enrichment, Capillary PCR, and Capillary Gel Electrophoresis”, *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5): 1871-1876 (2001).
- Çarlı, K.T., Unal, C. B., Caner, V., Eyigör, A., “Prevalance of *Salmonella* Serovars in Chickens in Turkey”, *Journal of Food Protection*, 64: 1832-1835 (2001).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Çarlı, K.T., Eyigör A., Goncagül, G., Günaydın, E., *Salmonella Standart Tanı ve İleri Tanı*, İstanbul, 1-3 (2004).
- Eyigor, A., Carli, K.T. and Unal, C.B., “Implementation of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of Salmonella detection in poultry”, *Letters in Applied Microbiology*, 34: 37-41 (2002).
- Eyigör, A., Goncagul, G., Günaydın. E. and Çarlı, K.T., “*Salmonella* profile in chickens determined by realtime polymerase chain reaction and bacteriology from years 2000-2003 in Turkey”, *Avian Pathology*, 34: 101-105 (2005).
- Feder, I., Nietfeld, J.C., Galland, J., Yearly, T., Sargeant, J.M., Oberst, R., Tamplin, M.L., Lunchansky, J.B., “Comparison of Cultivation and PCR-Hybridization for Detection of Salmonella in Porcine Fecal and Water Samples”, *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2477-2484 (2001).
- Franchin, P., Ogliairi, P.J., Andrade, D.F., Chiapinoto, M., Silva, I.G.D. and Batista, C.R.V., “Comparision of the BAX system with an in house MRSV method for the detection of Salmonella in chicken carcasses and pork meat”, *Braz. J. Microbiology*, 37: 521-526 (2006).
- Fricker, J.R., “The Isolation of Salmonellas and Camphylobacters” *Journal of Applied Bacteriology*, 63: 99-116 (1987).
- Gast, R.K., “Salmonella Infections. In: Diseases of poultry 11. Ed. Ed: SAIF”, *Y.M. Iowa State Press*, 567-613 (2003).
- Gomez, T.M., Motarjemi, Y., Miyagawa, S., Kaferstein, F.K., Stohr, K., “Foodborne Salmonellosis”, *World Health Stat Q*, 50(1-2): 81-89 (1997).
- Goncagül, G., Çarlı, K. T., “Tavuklarda Salmonella İzolasyonunda Kloakal Swab ve Drag-Swab Metotlarının Karşılaştırılması”, *Veterinarium*, 10: 31-33 (1999).
- Guthrie, R.K., “*Salmonella*, Boca Raton”, *CRC Press*, 37: (1992).
- Gyles, C. L., Thoen, C., “Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals”. *Iowa State University*, 95-109 (1986).
- Hargis, B. M., Caldwell, D. J., Brewer, R. L., Corrier, D. E. ve Deloach, J. R., “Evaluation of The Chicken Crop As a Source of *Salmonella* Contamination for Broiler Carcasse”, *Poultry Science* 74: 1548–1552 (1995).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Hoorfar, J., Baggesen, D.L., Porting, P.H., “A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates”, *Journal Microbiology Methods*, 35: 7–84 (1999).
- İzgür, M., “*Salmonella* İnfeksiyonları. In: Kanatlı Hayvan Hastalıkları, Ed.: M. İzgür, M. Akan”, *Medisan Yayınevi*, Ankara, 41-53 (2002).
- İzgür, M., “*Salmonella* İnfeksiyonları. In: Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar), Ed.: AYDIN, N.; PARACIKLIOĞLU, J.”, *İlke-Emek Yayınları*, Ankara, 116-121 (2006).
- Jukka Ranta & Riitta Maijala, “A. Probabistic Transmission Model of *Salmonella* in the Primary Broiler Production Chain”, *Risk Analysis*, 22: 47-61 (2002).
- Kahya, S., Kesin Tuğ, B., Temelli, S., Çarlı, K.T. and Eyigör, A., “Yumurtacı Tavuklarda *Salmonella* İzolatlarının Tanısı ve Tiplendirilmesi”, *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 20(6): 939-944 (2014).
- Khakhria R., Wodward D., Johnson W. M., and Poppe C. “*Salmonella* Isolated from Humans, Animals and Other Sources in Canada, 1983-92.”, *Epidemiologic Infections*, 119: 15-23 (1997).
- Koneman, E., Washington, W.J., Allen, S., Janda, W., Procop, G., Schreckenberger, P. ve Woods, G., “Koneman’ s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology sixth edition”, *Lippincott Willams & Wilkins*, 6: (2006).
- Krieg, N.R., Holt, J.G., “Bergey ’s Manual of Systematic Bacteriology. In: Le Minor L. (ed), *Salmonella*”, *Williams and Wilkins, Baltimore*, London, 427-458 (1984).
- Limawongpranee, S., Hayashidani, H., Okatani, A. T., Ono, K., Hirota, C., Kaneko, K., and Ogawa, M. “Prevalence and Persistence of *Salmonella* in Broiler Chicken Flocks”, *Journal of Veterinary Medicine Science*, 61(3): 255-259 (1999).
- Löfström, C., Kravse, M., Josefsen, M.H., Hansen, F. and Hoorfar, J., “Validation of a same-day real-time PCR method for screening of meat and carcasses swabs for *Salmonella*”, *BMC Microbiology*, 9: 1-9 (2009).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Medici, D.D., Pezzotti, G., Marfaglia, C., Caciolo, D., Foschi, G. ve Orefice, L., “Comparison between ICS-Vidas, MSR/V and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat”, *International Journal of Food Microbiology*, 45: 205-210 (1998).
- Medici, D.D., Luciana, C., Delibato, E., Pasquale, S.D., Filetici, E., ve Toti, L., “Evaluation of DNA Extraction Methods for Use in Combination with YBR Green I Real-Time PCR To Detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in Poultry”, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6): 3456-3461 (2003).
- Meer, R. R. ve Park, D. L., “Immunochemical detection methods for *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in foods”, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 142: 1–12 (1995).
- Nastasi, A., Mammina, C. and Mioni, R., “Detection of *Salmonella* spp. In Food by a Rapid PCR-Hybridization Procedure”, *Microbiologica*, 22: 195-202 (1999).
- Oliveira, S.D., Santosa, L.R., Schucha, D.M.T.B., Silvaa, A.B., Sallee, C.T.P., Canala, C.W., “Detection and identification of *Salmonellas* from poultry-related samples by PCR”, *Veterinary Microbiology*, 87: 25-35 (2002).
- Oliveira, S.D., Rodenbusch, C.R., Cé, M.C., Rocha, S.L.S. ve Canal, C.W., “Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection” *Letters in Applied Microbiology*, 36: 217-221 (2003).
- Özdemir, Ü., “Kanatlılardan İzole Edilen *Salmonella* Suşlarının İdentifikasyonunda Kullanılan Metotlar Üzerine Çalışmalar”, Doktora Tezi *Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Bursa, (1995).
- Patrick, M.E., Adcock, P.M., Gomez, T.M., “A Hekruse SF, Holland BH et al. *Salmonella* Enteritidis infection, United States, 1985-1999”, *Emerging Infectious Diseases*, 10(1): 1-7 (2004).
- Rabsch, W., Tschaëpe, H. ve Bauml, A. J., “Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems”, *Microbes Infection*, 3: 237–247 (2001).
- Reeves, M.V., Evins, G.B., Hebia, A.A., “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.”, *Journal of Clinical Microbiology*, 27: 313-320 (1989).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Rodrigue, D.C., Tauxe, R.V., Rowe, B., “International increase in *Salmonella* enteritidis: a new pandemic?”, *Epidemiologic Infections*, 105: 21–27 (1990).
- Rohner, P., Pittet, D., Pepey, B., Nije-Kinge, T., Auckenthaler, R., “Etiological agents of infectious diarrhea: implications for requests for microbial culture”, *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 1427–32 (1997).
- Rose, N., Beaudou, F., Drouing, P., Toux, J. Y., Rose, V. and Colin, P., “Risk Factors for *Salmonella enterica subsp. enterica* Contamination in French Broiler-chicken Flocks at the end of the Rearing Period”, *Preventive Veterinary Medicine*, 39: 265-277 (1996).
- Shivaprasad, H.L., “Salmonella Infections. In: Diseases of poultry 11. Ed. Ed: SAIF”, *Y.M. Iowa State Press*, 568-582 (2003).
- Sinell, H.J., Kleer, J., “Lebensmittel als Infektionsquelle. In: Das Salmonellen problem. Selbitz HP, Sinell HJ, Sziegoleit A (eds) Gustav Fisher Verlag”, Jena / Stuttgart, 133-149 (1995).
- Skov, M. N., Angen, Q., Chriel, M., Olsen, J. E. and Bisgaard, M., “Risk factors Associated with *Salmonella enterica* serovar typhimurium Infections in Danish Broiler Flocks”, *Poultry Science*, 78: 848-854 (1999).
- Sommer, D., Enderlein, D., Antakli, A., Schönenbrücher, H., Slaghuis, J., Redmann, T. and Lier, M., “*Salmonella* detection in poultry samples. Comparison of two commercial real-time PCR systems with culture methods for the detection of *Salmonella* spp. in environmental and fecal samples of poultry”, *Tierartl. Prax.*, 40: 383-389 (2012).
- Soumet, C., Ernel, G., Fach, P. and Colin, P., “Evaluation of Different Dna Excracton Procedures for the Detection of *Salmonella* from Chicken Products by Polymerase Chain Reaction”, *Lettters in Aplied Microbiology*, 19: 294-298 (1994).
- Stone, G.G., Oberst, R.D., Hays, M.P., Mcvey, S. and Chengappa, M.M., “Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure”, *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 1742–1749 (1994).
- Suzuky, S. “Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in poultry”, *Journal Food Microbiology*, 21: 89–105 (1994).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Temelli, S., Kahya, S., Eyigor, A. and Carli, K.T., "Incidence of *Salmonella* Enteritidis in chicken layer flocks in Turkey: Results by real-time polymerase chain reaction and International Organization for Standardization culture methods," *Poultry Science*, 89: 1406-1410 (2010).
- Tice, G., Andaloro, B., Fallon, D. and Wallace, F.M., "Dupont qualicon BAX system polymerase chain reaction assay performance tested method 100201", *Journal of AOAC International*, 92: 1902-1905 (2009).
- Tice, G., Andaloro, B., White, H.K., Bolton, L., Wang, S., Davis, E. and Wallace, M., "In-house validation study of the Dupont qualicon BAX system Q7 instrument with the BAX System PCR assay for Salmonella", *Journal of AOAC International*, 92(3): 989-994 (2009).
- Tomazelli, I.B., Freitas, J.B., Fabbi, L.M., Filipini, T.A., Silva, C.M., Bedin, J.M., Duarte, D.A.M., Santos, A., Baccarin, A., Higa, L.R.H., Yano, D.M.Y., Killner, M., Frezza, A.L.C., Abecia, E.C.G., Tronco, V.M., Junior, O.T. and Junior, W.B., "Comparison of the BAX system PCR method to Brazil's official method for the 67 detection of *Salmonella* in food, water and environmental samples", *Journal of Food Protection*, 71: 2442-2447 (2008).
- Tuchili, L. M., Kodama, H., Izumoto, Y., Mukamoto, M., Fukata, T. ve Baba, T., "Detection of *Salmonella* Gallinarum and *S. Typhimurium* DNA in experimentally infected chicks by polymerase chain reaction", *Journal of Veterinary Medical Science*, 57: 59-63 (1995).
- United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service**, "The National Poultry Improvement Plan, CFR Part 147 auxiliary provisions on National Poultry Improvement Plan. Subpart B-bacteriological examination procedure. 147-11 laboratory procedure recommended for the bacteriological examination of *Salmonella*", 14-19 (1996).
- Van Hoorebeke, S., Van Immerseel, F., Schulz, J., Hartung, J., Harisberger, M., Barco, L., Ricci, A., Theodoropoulos, G., Xylouri, E., De Vylder, J., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Pasmans, F., De Kruijff, A. and Dewulf, J., "Determination of the within and between and flock prevalence and identification of risk factors for *Salmonella* infections in laying hen flocks housed in conventional and alternative systems", *Preventive Veterinary Medicine*, 94: 94-100 (2010).
- Wallace, H. A., June, G., Sherrod, P., Hammack, T. S. and Amaguana, R. M., "*Salmonella* In Food and Drug Administration bacteriological analytical manual L. A. Tomlison, ed. Hypertext source: <http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/bam-5.html#Intro>. 1999", (06.05.2015).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Wawerla, M., Stolle A., Schalch B. ve Eisgruber, H., “Impedancemicrobiology: applications in food hygiene”, *Journal of Food Protection*, 62: 1488–1496 (1999).
- Woodward, M. J. ve Kirwan, S. E. S., “Detection of *Salmonella* enteritidis in eggs by the PCR”, *Veterinary Record*, 138: 411-413 (1996).
- World Health Organisation (WHO) Food Safety**, “A resolution of the executive board of the WHO-Resolution EB 105.R16”, 50: 81-89 (2002).
- Zhang, L., Yan, Z. and Ryser, E.T., “Comparison of the reveal test, the U. S. Food and Drug Administration culture method, and selective media for recovery of *Salmonella* enteritidis from commercial egg layer flock environments”, *Journal of Food Protection*, 69: 2766-2769 (2006).
- Zwadyk, P., “*Enterobacteriaceae: Salmonella* and *Shigella* intestinal pathogens. In: Jaklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM (eds), *Zinsser Microbiology*. 9 th ed. USA”, *Appleton and Lange Comp*, 473-479 (1988).

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Satiye ÖREN
Doğum Yeri ve Tarihi : Devrek/1985

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Karadeniz Teknik Üniversitesi
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce
Bilimsel Faaliyetleri : 2013-01-BİL.04-02 no'lu Bilimsel Araştırma Projesi-
Araştırmacı
: Adapazarı Bölgesi Bazı Broiler Tipi Tavukçuluk İşletmelerinden Salmonella İzolasyonu ve Tiplendirilmesi- Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi

İş Deneyimi

Stajlar : Zonguldak Karaelmas Üniv. Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji Laboratuvarı/ ZONGULDAK, 2006
Çalıştığı Kurumlar : Özel Karadeniz Birey Dergisi Dershanesi(2009-2010)
: CP Group TURKEY (Ağustos 2010-Halen)

İletişim

Adres : Fatih Mah. Salim Sok. No:10 D:3 Alanyurt.
İnegöl/BURSA
Tel : 05332426754
E-Posta Adresi : oren.satiye@gmail.com
satiye.oren@cpturkiye.com

07/12/2015