



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ
ANABİLİM DALI



KASAPLIK SIĞIRLARDA SALMONELLA TAŞIYICILIĞININ VE SEROTİP DAĞILIMININ BELİRLENMESİ

Ece ÇETİN

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2017



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**KASAPLIK SIĞIRLARDA SALMONELLA TAŞIYICILIĞININ VE SEROTİP
DAĞILIMININ BELİRLENMESİ**

Ece ÇETİN

(DOKTORA TEZİ)

**DANIŞMAN:
Prof. Dr. Seran TEMELLİ**

OUAP(V)-2013/29-U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeler Birimi

BURSA-2017

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum

‘Kasaplık sığırlarda *Salmonella* Taşıyıcılığının ve Serotip Dağılımının Belirlenmesi’ adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.





Ece ÇETİN

09.01.2017



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Ece ÇETİN tarafından hazırlanan 'Kasaplık Sığırlarda *Salmonella* Taşıyıcılığının ve Serotip Dağılımının Belirlenmesi' konulu Doktora tezi 16/01/2017 günü, 10:00-12:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Seran TEMELLİ	
Üye	Prof. Dr. Ayşegül EYİĞÖR	
Üye	Doç. Dr. Hıdır GENÇOĞLU	
Üye	Prof. Dr. Fatma Seda BİLİR ORMANCI	
Üye	Yrd. Doç Dr. Devrim BEYAZ	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

09/01/201

Adı Soyadı: Ece ÇETİN

Anabilim Dalı: Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Tez Konusu: Kasaplık Sığırlarda *Salmonella* Taşıyıcılığının ve Serotip Dağılımının Belirlenmesi

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Seran TEMELLİ

İmza:



İÇİNDEKİLER

Dış Kapak

İç Kapak

ETİK BEYAN	II
KABUL ONAY	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	VII
İNGİLİZCE ÖZET	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Tarihçe	5
2.2. Taksonomi ve Nomenklatür	6
2.3. Etiyoloji	11
2.4. Epidemiyoloji	16
2.5. <i>Salmonella</i> Tanı Yöntemleri	18
2.5.1. Geleneksel yöntemler	18
2.5.2. Hızlı yöntemler	21
2.6. Salmonellalarda Tiplendirme Metodları	24
2.6.1. Fenotipik metodlar	24
2.6.2. Moleküler metodlar (Genom bazlı)	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	31
3.1. Gereç	31
3.1.1. Örnekler	31
3.1.2. Standart suşlar	31
3.1.3. Antiserumlar	31
3.1.4. Cihazlar	32
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Örnek alma	33
3.2.1.1. Karkastan örnek alınması	33
3.2.1.2. Dışkıdan örnek alınması	35
3.2.2. İzolasyon ve identifikasyon	35
3.2.2.1. Karkas örneklerinden ISO 6579:2002 ile <i>Salmonella</i> izolasyon ve identifikasyonu	35
3.2.2.2. Dışkı örneklerinden ISO 6579/A1:200 ile <i>Salmonella</i> izolasyon ve identifikasyonu	37
3.2.3. <i>Salmonella</i> spp. spesifik r-PCR için templeyt hazırlama	39
3.2.4. <i>Salmonella</i> spp. spesifik r-PCR	39
3.2.5. Serolojik tiplendirme	40
3.2.5.1. Aglütinasyon reaksiyonlarının değerlendirilmesi	40
3.2.5.2. İzolatların otoaglütinasyon özelliğinin test edilmesi	40
3.2.5.3. Serogruplandırma	41
3.2.5.4. Serotiplendirme	42

3.2.6. İstatistiksel analiz	44
4. BULGULAR	45
4.1. Örnekleme Sonuçları	45
4.2. Karkas Örneklerinde <i>Salmonella</i> spp. İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları.....	45
4.3. Dışkı Örneklerinde <i>Salmonella</i> spp. İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları	45
4.4. ISO ve <i>Salmonella</i> spp. Spesifik r-PCR Yöntemlerine Ait Sonuçlar	45
4.5. <i>Salmonella</i> spp.'lerin Serolojik Tiplendirme Sonuçları	46
4.6. İstatistiksel Analiz Sonuçları.....	46
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	64
5.1. Karkas Örneklerinde Bulunan <i>Salmonella</i> spp. Prevalansı ve Serotipleri	64
5.2. Dışkı Örneklerinde Bulunan <i>Salmonella</i> spp. Prevalansı ve Serotipleri	69
5.3. ISO ve <i>Salmonella</i> spp. Spesifik r-PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	73
6. KAYNAKLAR.....	75
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	81
8. EKLER	82
9. TEŞEKKÜR	83
10. ÖZGEÇMİŞ	84

ÖZET

KASAPLIK SIĞIRLARDA *SALMONELLA* TAŞIYICILIĞININ VE SEROTİP DAĞILIMININ BELİRLENMESİ

Kasaplık sığırlara ait karkas ve dışkı örneklerinin *Salmonella* spp. varlığı ve serotip dağılımının belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmada, 2013-2014 yılları arasında Bursa'da faaliyet gösteren 1 özel kombina ve 1 belediye mezbahasında kesilen 100 adet sığırdan karkas ve dışkı örnekleri olmak üzere toplam 200 örnek, sırasıyla ISO 6579:2002 metodu ve ISO 6579/A1:2007 metodu ile *Salmonella* spp. spesifik r-PCR kullanılarak incelendi. Ayrıca izole edilen salmonellalar White-Kauffmann-Le Minor Şeması'na göre klasik serotiplendirme ile serotiplendirildi.

İzolasyon ve identifikasyon sonucunda analiz edilen 100 karkas örneğinin 2'sinin (%2) ve 100 dışkı örneğinin 2'sinin (%2) *Salmonella* spp. ile kontamine olduğu tespit edildi. Elde edilen 39 izolata doğrulama amacı ile yapılan ISO identifikasyonu ve *Salmonella* spp. spesifik r-PCR testi sonrasında, 28 karkas izolatının 7'si ISO ile 10'u r-PCR ile, 11 dışkı izolatının ise her iki yöntem ile de 2'si *Salmonella* spp. pozitif olarak bulundu. ISO ile r-PCR arasındaki yüksek relatif doğruluk (%92,30), duyarlılık (%100) ve özgünlük (%90), iki test arasındaki uyumun neredeyse mükemmel olduğunu ($\kappa=0,81$) gösterdi. İzolatların geleneksel serotiplendirilmesi ile karkas örneklerinde *S. Typhimurium* (%100) ve dışkı örneklerinde *S. Enteritidis* (%50) ile *S. Albany* (%50) serovarları belirlendi.

Çalışma sonucunda, ülkemizde sığırlarda da *S. Enteritidis*'in belirlenmiş olması ile kırmızı et ve et ürünlerinin bu serovarin varlığına bağlı olarak halk sağlığı açısından önemi vurgulandı. Ayrıca *S. Typhimurium*'un diğer ülkeler ile paralel olarak karkaslardaki varlığının yanı sıra *S. Albany*'nin dışkıdan ilk defa izole edilmesinin de epidemiyolojik yönden önem taşıdığı ortaya konuldu.

Anahtar Sözcükler. *Salmonella*, sığır, karkas, dışkı, prevalans, serotip, PCR

SUMMARY

DETERMINATION OF *SALMONELLA* CARRIER STAGE AND SEROTYPE DISTRIBUTION IN SLAUGHTER CATTLE

In this study, a total of 200 samples, collected between 2013-2014, comprised of carcass and feces samples from 100 cattle slaughtered in 1 private slaughterhouse and 1 municipality abattoir, were investigated to determine *Salmonella* spp. by ISO 6579:2002 method and ISO 6579/A1:2007 method, respectively, and by *Salmonella* spp. specific r-PCR. Additionally, *Salmonella* isolates were serotyped according to the White-Kauffmann-Le Minor Scheme using conventional serotyping.

Isolation and identification results indicate that 2 out of 100 carcass (2%) and 2 out of 100 feces samples (2%) were contaminated with *Salmonella* spp. Confirmation of 39 isolates by ISO identification and *Salmonella* spp. specific r-PCR indicate that 7 and 10 out of 28 carcass isolates were positive by ISO and r-PCR, respectively; while 2 out of 11 feces isolates were positive by both methods. High relative accuracy (92,30%), sensitivity (100%) and specificity (90%) between ISO and r-PCR indicated almost perfect agreement ($\kappa = 0,81$) between two methods. Conventional serotyping of *Salmonella* isolates revealed both carcass isolates as *S. Typhimurium* (100%), while one *S. Enteritidis* (50%) and one *S. Albany* (50%) serotype for 2 feces isolates.

As a result, detection of *S. Enteritidis* in cattle indicates its importance in red meat and meat products from public health standpoint. Presence of *S. Typhimurium* on carcasses parallel to the findings in other countries as well as isolation of *S. Albany* for the first time from feces are all of epidemiological importance.

Key Words. *Salmonella*, cattle, carcass, feces, prevalence, serotype, PCR

1. GİRİŞ

Yeterli ve dengeli beslenmede günlük diyetin önemli bir kısmının proteinlerden karşılanması ve günlük protein gereksiniminin %50'sinin hayvansal kökenli olması önerilmektedir. Kırmızı et, hayvansal gıdalar içerisinde, biyolojik değeri yüksek proteinler yönünden zengin bir besin olması, vitamin ve bazı mineralleri, özellikle demir ve B12 vitaminini yapısında bulundurması nedeni ile beslenmede büyük önem taşımaktadır (Anar, 2010; Arslan, 2013; Gökalp, 1984; Saucier, 1999). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'nin 2015 yılı verilerine göre ülkemizde 1.149,262 ton olan toplam kırmızı et üretiminde, sığır etinin 1.014,925 ton ile en büyük paya sahip olduğu görülmektedir (TÜİK, 2016). Benzer şekilde, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agricultural Organization-FAO)'nın 2013 yılına ait istatistiksel bilgilerinde ülkemizde 1.077,735 ton olan toplam kırmızı et üretiminde, sığır eti payının 750,046 ton olduğu bilinmektedir. Ülkemizde kişi başına düşen yıllık toplam et tüketiminin FAO'ya göre 33,44 kg olduğu, bunun 14,38 kg'ını kırmızı etin, tüketilen kırmızı etin de %71,90'luk kısmını (10,34 kg) sığır etinin oluşturduğu rapor edilmektedir (FAO, 2016).

Kasaplık sığır etleri, hasta veya portör hayvanlardan ve/veya asgari teknik ve hijyenik şartlara sahip olmayan mezbahalarda uygun olmayan koşullarda kesildiği takdirde karaciğer, dalak, böbrek gibi yenilebilir iç organlar ile safra kesesi ve barsak içeriğinin karkasa bulaşması ile primer ve sekonder mikrobiyal kontaminasyona maruz kalmaktadır (Cornell ve Neal, 1998; Uğur ve ark., 2003). Mikrobiyal yükü fazla olan ve özellikle *Salmonella* gibi enterik patojenleri içerebilen bu etler, yetersiz pişirilerek tüketildiğinde ya da uygun olmayan koşullarda tüketicilere sunulduğunda gıda zehirlenmelerine neden olarak halk sağlığını tehdit etmekte aynı zamanda önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Cumbul, 1994; Yücel, 1978). Gıda kaynaklı bakteriyel patojenler içerisinde yer alan *Salmonella*, 8 Mart 2012'de Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority-EFSA) ve Avrupa

Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control-ECDC) tarafından yayınlanan 2010 yılı Avrupa Birliği Zoonozlar, Zoonotik Ajanlar ve Gıda Kaynaklı Salgınlar Özet Raporu (ECDC, 2011)'na göre kontamine gıdaların tüketimine bağlı zoonotik infeksiyon ve salgınlarda *Campylobacter*'den sonra en sık rapor edilen ajan olarak bildirilmiştir. Bu raporda aynı zamanda *Salmonella* kontaminasyonunda en önemli birincil hayvansal kaynağın kanatlı eti, ikincil kaynağın ise kırmızı et olduğu belirtilmiştir. İnsanlardaki *Salmonella* infeksiyonlarının sıklığını minimum düzeye indirmenin birincil koğu, hayvanlardaki bu infeksiyonları en aza indirmektedir. Bu nedenle, hayvanlarda *Salmonella* infeksiyonlarının düzeyinin ve tipinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu infeksiyonların tanısı amacı ile bir çok serolojik ve genetik tabanlı yöntemler geliştirilmesine rağmen, teşhiste kültür yöntemi 'Gold Standart' yöntem olarak kullanılmaktadır. Genellikle hayvan ve insanlardaki anti-*Salmonella* antikollarını saptayan testler ve Polimerase Chain Reaction (PCR) çabuk sonuç vermeleri açısından talep görmekte ve kültür yöntemini tamamlayıcı nitelik taşımaktadır.

Ülkemizde 2011 yılında 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanununun 4. maddesi, 639 sayılı Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın Teşkilat ve Görevleri Hakkında Kanun Hükmünde Kararnamenin 7. maddesi hükümlerine dayanılarak, ve Zoonozlar ve Zoonotik Etkenlerin İzlenmesine dair 2003/99/EC sayılı Avrupa Birliği Konsey Direktifi'ne paralel olarak, gıda kaynaklı bazı zoonozların da içinde yer aldığı Türk Gıda Kodeksi (TGK) Zoonozlar ve Zoonotik Etkenler, İlgili Antimikrobiyal Direnç ve Gıda Kaynaklı Salgınların İzlenmesi Yönetmeliği (TGK, 2011a) yayımlanmış ve yayım tarihinde yürürlüğe girmiştir. Yönetmelik ekinde yer alan ve izlenmesine 2016 yılına kadar başlanacak olan zoonozlar ve zoonotik etkenler içerisinde 'Salmonellozis ve etkenleri' de bulunmaktadır. Bunun yanında TGK Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği (TGK, 2011b) Ek 1. Gıda Güvenilirliği Kriterleri'ne göre 1.3. Et ve Et Ürünleri (kıyma, çiğ kırmızı et ve hazırlanmış kırmızı et karışımları, mekanik olarak ayrılmış kırmızı et ile et ürünleri)'nde, ile Ek 2. Üretim Hijyeni Kriterleri'ne göre ise 2.1. Et ve et ürünleri (2.1.3. Sığır, koyun, keçi ve at karkasları)'nde *Salmonella* varlığının referans metot olarak gösterilen Avrupa Normu/Uluslararası Standardizasyon Birliği (European

Norm/International Organization for Standardization) EN/ISO 6579 ile test edilmesi ve bu ürünlerde *Salmonella* bulunmaması gerektiği bildirilmektedir.

Serovolarların belirlenmesi, tüm dünyada gıda ve hayvan ticareti kapsamında, *Salmonella* infeksiyonlarından korunma ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesi için temel oluşturur. Serotiplendirme çalışmaları, uluslararası epidemiyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmakta ve *Salmonella* izolatlarının tam karakterizasyonunda ilk ve en önemli basamağı oluşturmaktadır. Bu nedenle *Salmonella* izolatlarının serotiplendirilmesi halk sağlığı, gıda hijyeni ve hayvan sağlığı yönünden ülkemizde de kritik bir öneme sahiptir (Bhan ve ark., 2005). Son 10 yıl içerisinde çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda, sığırların *Salmonella* taşıyıcılığı ile serotip dağılımının araştırıldığı pek çok yayımlanmış makale bulunmaktadır (Alemu ve Zewde, 2012; Brichta-Harhay ve ark., 2011). Bu çalışmalar içerisinde sığır karkaslarından alınan örneklerde, Amerika Birleşik Devletleri'nde %0,8-6,7 (Brichta-Harhay ve ark., 2011; Ransom ve ark., 2002), Kanada'da %0,1 (Bohaychuk ve ark., 2011), İngiltere'de %12,7 (Small ve ark., 2006), Etiyopya'da %2-4,8 (Alemu ve Zewde, 2012; Sibhat ve ark., 2011), Avustralya'da %3 (Fegan ve ark., 2005) oranlarında *Salmonella* izole edildiği, ayrıca en sık identifiye edilen serotiplerin *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Uganda*, *S. Agona*, *S. Hafnia*, *S. Anatum*, *S. Reading* ve *S. Dublin* olduğu bildirilmiştir (Alemu ve Zewde, 2012; Brichta-Harhay ve ark., 2011). Benzer şekilde sığır bağırsak içeriği veya dışkı örneklerinde farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda, (Bolton ve ark., 2012; Fegan ve ark., 2005) *Salmonella* taşıyıcılığı %1,4-32,5 aralığında değişen oranlarda saptanmıştır. Çalışmalarda izole edilen salmonellaları Jimenez ve ark. (2011) *S. Oranienburg*, Alemu ve ark. (2012) *S. Typhimurium*, *S. Newport* ve *S. Hafnia*, Sibhat ve ark. (2011) *S. Newport*, *S. Anatum* ve *S. Eastbourne*, Milnes ve ark. (2008) *S. Typhimurium*, *S. Mbandaka*, *S. Dublin*, *S. Derby* ve *S. London*, Akoachere ve ark. (2009) *S. Typhimurium*, Madden ve ark. (2007) *S. Chandans* ve *S. Liverpool*, Bolton ve ark. (2012) *S. Dublin*, *S. Kiel* ve *S. Typhimurium* olarak tiplendirdiklerini bildirmişlerdir.

Ülkemizde bilginiz dahilinde 1995-2016 yılları arasında *Salmonella* taşıyıcılığı yönünden riskli gıdalara kaynak olabilen kasaplık büyükbaş hayvanların karkasları ile bağırsak veya dışkı içeriklerinin incelendiği, kısıtlı sayıda prevalans ve/veya serogrup/serotip belirleme çalışmalarının var olduğu görülmektedir. Bu

çalışmalar içerisinde sığır karkaslarında *Salmonella* spp. prevalansı %0-20,8 arasında (Alişarlı ve ark., 2001; Küplülü, 1999) bildirilmiş olup sadece Küplülü (1999) tarafından serotiplendirme yapılmış ve tespit edilen serotiplerin tümünün *S. Anatum* olduğu rapor edilmiştir. Aden (2016) tarafından sığır dışkılarında *Salmonella* spp. prevalansı %0,55 oranında bulunmuştur. Ayrıca Canpolat (2007) tarafından sığır dışkılarında %0,94 oranında tespit edilen salmonellaların tümünün serogrup B, Genç (2002) tarafından sığır ince bağırsak içeriklerinde %1,2 oranında tespit edilen salmonellaların tümünün *S. Enteritidis*, Küplülü (1999) tarafından sığır ince bağırsak içeriklerinde %14,4 oranında tespit edilen salmonellalardan %53,8'inin *S. Anatum*, %30,8'inin *S. Typhimurium* ve %15,4'ünün *S. Telaviv* olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak, ülkemizde yapılan bu çalışmaların farklı yıllarda, farklı örnekleme yerlerinden, benzer/farklı yöntemlerle örneklendiği, benzer fakat aynı olmayan izolasyon ve identifikasyon metotlarının kullanıldığı ve elde edilen verilerin sığırlarda güncel *Salmonella* taşıyıcılığı ile serotip dağılımını yansıtması ve diğer ülke verileri ile karşılaştırılabilmesi açısından yeterli olmadığı görülmektedir.

Bu nedenle çalışmada, Bursa'da faaliyet gösteren 1 özel kombinada ve 1 belediye mezbahasında kesilen 100 adet sığıra ait, karkas örneklerinde 2002 yılında yürürlüğe girmiş ve uluslararası kabul görmüş Gold Standart metot olan ISO 6579 (2002) metodu ve dışkı örneklerinde 2007 yılında ek olarak çıkarılan ISO 6579/A1 (2007) metodu ile *Salmonella* prevalansı saptanacaktır. Ayrıca izole edilen salmonellaların White-Kauffmann-Le Minor Şeması (Grimont ve Weill, 2007; Gouibourdenche ve ark., 2010)'na göre klasik serotiplendirme ile serotip dağılımı belirlenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

Salmonella ilk kez 1880 yılında tifodan ölen bir kişinin dalak ve mezenteriyel lenf yumrusunda Karl Joseph Eberth tarafından tifo basili olarak bulunmuştur (Agbaje ve ark., 2011). Dört yıl sonra Georg Theodor Gaffky, bu patojeni saf kültür halinde geliştirerek Eberth'in bulgusunu doğrulamıştır (Hardy, 2015). Daniel Elmer Salmon ile Theobald Smith, 1886 yılında yaptıkları çalışmalarında domuz bağırsağından izole ettikleri domuz vebasına sebep olan ve günümüzde *Salmonella*'nın tip türü *S. choleraesuis* olarak bilinen bu etkeni 'yaban domuzu kolera basili' (*Bacterium suispestifer*) olarak isimlendirmişlerdir. 1888'de August Gärtner tarafından sonradan *S. enteritidis* olarak isimlendirilen *Bacterium enteritidis* ise acilen kesilen bir sığıra ait etten ve bu etin tüketimi sonrasında yaşanan 58 gıda zehirlenmesi vakasında bir hastadan izole edilmiştir. İzolasyon, yaklaşık yarım kilo kontamine et tüketen hastanın 36 saat sonrasında ölümünün ardından iç organlarından gerçekleştirilmiştir. Bu sayede, salmonelloz salgını ilk defa laboratuvarında doğrulanmıştır (Bell ve Kyriakides, 2002; Hardy, 2015).

Salmonella cins ismi, ilk kez 1900'de Salmon'a ithafen Joseph Léon Lignières tarafından önerilmiştir. Topley ve Wilson, 1929 yılında laktozu fermente edemeyen, dekstroz ve diğer şekerlerden asit ve gaz oluşturan, ksilozu fermente eden ve litmus milk'te alkali reaksiyon gösteren bu basilin isimlendirilmesinde *Salmonella*'yı kabul etmiştir. Aynı araştırmacılar ayrıca, *Salmonella* grubundaki bu organizmaların (*Bacterium enteritidis* ve *Bacterium aertrycke*) ile enfekte gıdaların tüketimine bağlı olarak sıkça karşılaşılan, aniden ortaya çıkan ve nispeten kısa süren akut gastroenterit ile karakterize bir hastalık (gıda zehirlenmesi) oluşturduğunu belirtmiştir. 1990'ların başında *typhosum* (sonrasında typhi olarak adlandırılan), *paratyphosum* A ve B (*paratyphi* A ve B), *gallinarum* ve *typhimurium* gibi salmonellaların diğer bazı önemli türleri tanımlanmış ve bu türlerin insanlar ile

hayvanlardaki hastalıkların etkenleri olduğu büyük ölçüde tespit edilmiştir. Günümüzde *Salmonella* türleri, gıda zehirlenmesi (gastroenterit), tifo, paratifo, bakteriyemi, sepsis gibi hastalıklara sebep olan çok önemli gıda ve su kaynaklı organizmalar olarak tanımlanmaktadır (Bell ve Kyriakides, 2002; Brands, 2006).

2.2.Taksonomi ve Nomenklatür

Yirminci yüzyılın ortalarına kadar *Salmonella*'nın da içinde bulunduğu Gram negatif, spor oluşturmeyen, insan ve hayvan bağırsakları ile bitki ve toprakta bulunan, saprofit, kommensal veya patojen olabilen bakterilerin isimlendirilmesinde 'cins' ile ilgili olarak 'çubuk' anlamına gelen *Bacterium* ve *Bacillus* kullanılmıştır. 1960'lı yıllarda *Salmonella* ismi yaygın bir şekilde kabul görmüş olup, 1980 yılında International Journal of Systematic Bacteriology Dergisi'nde yayınlanan Approved Lists of Bacterial Names (Bakteri İsimlerinin Onaylanmış Listesi)'de Enterobacteriaceae familyası altında spesifik bir cins olarak yer almıştır (Bell ve Kyriakides, 2002; Skerman ve ark., 1980).

Salmonella cinsi içerisindeki üyelerin sınıflandırılmasında zaman içerisinde gelişmeler gözlenmiştir. Salmonellalar, homolog antiserumlar kullanılarak oluşan aglütinasyon reaksiyonları ile antijenik yönden ayırt edilebilmektedir. (Guibourdenche ve ark., 2010; Grimont ve Weill, 2007). Etkenin antijenik farklılığı ile ilgili 1920'li yıllarda başlatılan çalışmalar, bakteri hücrelerinin üzerinde bulunan O (somatik-yüzey) antijenleri ve çoğu *Salmonella* kültüründe 2 farklı antijenik tipi (H1 ve H2) değişen iki fazda ekspres edilen H (flagella) antijenleri ile çok az sayıdaki *Salmonella*'da üretilen Vi (kapsül) antijeni temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu antijenlerin kombinasyonu, her bir *Salmonella* serotipi için tek olup 'antijenik formül' olarak bilinmektedir. Serolojik tiplendirme ile salmonellalar serotiplerine ayrılarak, 1920'lerin sonlarına doğru yaklaşık 20 serotip tanımlanmış ve genellikle her bir tip (tür); etkenin konakçıda oluşturduğu hastalık, ilk kez izole edildiği konakçı ya da yer ile ilişkilendirilerek isimlendirilmiştir. Örneğin; *S. typhi*, *S. gallinarum* ya da *S. dublin* denildiğinde; Typhi serovarı tifoid ateş belirtisiyle seyreden bir hastalıktan, Gallinarum serovarı ilk kez tavuktan ve Dublin serovarı ise ilk kez Dublin'de izole edildiği için bu şekilde isimlendirilmiştir. Etkenin ilk izole edildiği yere göre isimlendirme yaklaşımı, yeni çıkan *Salmonella* tiplerinin

isimlendirilmesinde kullanılan geleneksel bir yöntem haline gelmiştir (Bell ve Kyriakides, 2002; Brenner ve ark., 2000; İzgür, 2006).

İlk defa 1926 yılında, Phillip Bruce White tarafından gerçekleştirilmiş olan antijenlerin identifikasyonu ve isimlendirilmesi 1930'ların başlarında Fritz Kauffmann tarafından daha da geliştirilerek oluşturulan White-Kauffmann şemasında, her bir *Salmonella* serotipi ve ilgili antijenik formülü listelenmiş olup 1934 yılında ilk defa International Uluslararası Mikrobiyologlar Birliği (Association of Microbiologist) özel alt komitesince genel kullanıma açılmış ve o günden beri de kullanılır hale gelmiştir (Bell ve Kyriakides, 2002).

Salmonella cinsinin nomenklaturünde, 1966 yılında ilk olarak Kauffmann tarafından önerilen bir serotip-bir tür yaklaşımı (*S. choleraesuis*) ile oldukça büyük bir ilerleme gözlenmiştir. Bu tarihten itibaren tüm *Salmonella* serovarları antijenik formülleri ile nitelendirilmişler ve böylece aynı cinsin içerisinde yer alan sayısız tür identifiye edilmiştir. Her bir serotipin ayrı bir tür olarak (ör. *S. paratyphi A*, *S. newport*, *S. enteritidis*) değerlendirildiği bu yaklaşımın, günümüzde de devam etmesinden dolayı bugün 2500'ün üzerinde *Salmonella* serotipi (türü) bulunmaktadır. Nomenklaturde daha sonraları suşun klinik rolü, biyokimyasal özellikleri göz önünde bulundurularak serotiplerin alt cinslere ayrılmasının ve son olarak da genomik benzerliklerinin araştırılmasının temel alındığı farklı ülkelerdeki çalışma grupları tarafından alternatif taksonomik yaklaşımlar önerilmiştir (Bell ve Kyriakides, 2002; Brenner ve ark., 2000).

Sayısız *Salmonella* türü olduğu için yarattığı kompleks nomenklatur yaklaşımı nedeni ile *Salmonella* cinsinin 3 türe ayrılması önerilmiştir: 1. *S. choleraesuis* (tip tür), 2. "*S. typhosa* (*S. typhi*) ve 3. diğer tüm serovarları içeren *S. kauffmannii*. Bunun üzerine Kauffmann ve Edwards tüm salmonellaları içerecek *Salmonella enterica* adını önermişlerdir. 1966'larda Ewing tarafından bir diğer üçlü tür modeli yeniden önerilmiş; 1. *S. typhi*, 2. *S. choleraesuis* ve bunların haricindeki tüm serovarları temsil eden 3. *S. enteritidis* olarak bildirilmiştir. Özellikle bu son nomenklatur yaklaşımı Amerika Birleşik Devletleri'nde uzun bir süre kullanılmıştır (Agbaje ve ark., 2011; Brenner ve ark., 2000).

1970 yılında alt cinsin tür olarak düşünülmesini öneren diğer bir yaklaşımda, örneğin *S. kauffmannii*'nin "alt cins I", *S. salamae*'nin "alt cins II", *S. arizonae*'nin

“alt cins III” ve *S. houtenae*’nin “alt cins IV” olması önerilmiştir. Bu öneride “*S. kauffmannii*” nin serovarlarının, tür isimleri ve sonrasında serovar isimleri ile anılmaları (örneğin “*S. kauffmannii*” serovar typhi) ve diğer üç türün serovarlarının ise kendi tür adları sonrasında antijenik formülleri ile adlandırılmaları önerilmiştir. *Salmonella* taksonomisindeki bu yoğun çalışmalara rağmen nomenklatürde dönüm noktası 1970’lerin başında olmuş ve DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları ve diğer moleküler analizler sonrasında cinsin içerisindeki nükleotid dizi ilişkileri ortaya konulmuştur (Agbaje ve ark., 2011; Brenner ve ark., 2000).

1973 yılında Crosa ve ark. (1973), DNA tabanlı çalışmalarında *Salmonella*’nın tüm serotipleri ve alt cins I, II ve IV ile “Arizona” nın tüm serotiplerinin tür düzeyinde birbirleri ile ilişkili ve bu nedenle tek türe ait olduğunu, ayrıca önceden alt tür V olarak bilinen *S. bongori*’nin ise diğerlerinden belirgin olarak farklı nükleotid dizisine sahip olması nedeni ile ayrı bir tür olduğunu belirlemiştir. *S. choleraesuis*’in 1980 yılında Bakteri İsimlerinin Onaylanmış Listesi’nde *Salmonella*’nın tip türü olarak bulunması nedeni ile tür adında önceliğinin olmasına neden olmuştur. DNA yakınlığı ve numerik taksonomi bilgileri dahilinde, 1982 yılında Le Minor ve ark. (1982), tek bir *Salmonella* türü için *S. choleraesuis* ismini ve bunun altında da 6 türün belirlenmesini önermiştir. Ayrıca bu yazarlar, serovar isimlerinin italik olmadan ve altı çizilmeden kullanılmasını önermişlerdir (örneğin *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis* ser. Typhimurium) Bununla birlikte “choleraesuis” isminin hem tür hem de serotip adı olması, bu serotipin arabinoz ve trehaloz negatif olması ile serotiplerin büyük bir bölümünü temsil edecek biyokimyasal özelliklere sahip olmaması nomenklatürdeki karışıklığın devam etmesine neden olmuştur (Brenner ve ark., 2000).

1986’da Uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Komitesi Enterobacteriaceae Alt Komitesi’nin XIV. Uluslararası Mikrobiyoloji Kongresi’nde Le Minor ve Popoff (1987) tarafından *Salmonella* cinsi içerisinde *Salmonella*’nın tip-türü olarak *S. choleraesuis* yerine 1952’de Kauffmann ve Edwards (1952) tarafından verilen ve hiçbir serotipte bulunmayan *Salmonella enterica* (*S. enterica*) ismi önerilmiştir. 2005 yılında, Yetkili Komisyon tarafından *S. choleraesuis* yerine *S. enterica*’nın kullanılması ile *S. bongori*’nin bir diğer tür olduğu ve *S. enterica*’nın da 6 alt türü oybirliği ile kabul edilmiştir (Crosa ve ark., 1973). Her bir alt türün ismi tip türün adı

kullanılarak türetilmiştir. Aynı yıl içerisinde 3. tür olarak tanımlanarak *S. subterranean* ismi verilen Yetkili Komisyon tarafından onaylanarak sistem içerisine alınması beklenen bu türün yapılan genetik analizler sonrasında *Escherichia hermannii*'ye olan yakınlığı belirlenmiştir (Lin-Hui Su, 2006). 1987'de ise Le Minor ve Popoff (1987)'un önerisi ile *Salmonella*'nın 7 alt cinsi, alt tür (I, II, IIIa, IIIb, IV, V, ve VI) olarak adlandırılmış ve altcins III, genomik yakınlık ve biyokimyasal reaksiyonları bazında IIIa ve IIIb olarak ikiye ayrılmıştır. Alt tür IIIa (*S. enterica* subsp. *arizonae*) monofazik "Arizona" serotiplerini, alt tür IIIb (*S. enterica* subsp. *diarizonae*) ise difazik serotipleri içermektedir. Sonuç olarak Tablo 1'de belirtildiği gibi, günümüzde de kullanılan White-Kauffmann-Le Minor şemasında; *Salmonella* cinsi, *S. enterica* ve *S. bongori* olmak üzere 2 türden oluşmaktadır. *S. enterica* türü Romen rakamı ve ismi ile adlandırılmış 6 alt tür içermekte olup (I *S. enterica* subsp. *enterica*; II *S. enterica* subsp. *salamae*; IIIa *S. enterica* subsp. *arizonae*; IIIb *S. enterica* subsp. *diarizonae*; IV *S. enterica* subsp. *houtenae*; VI *S. enterica* subsp. *indica*); *S. bongori* türü ise herhangi bir alt tür içermemektedir. Bu tabloya göre güncel serotip sayısı 2610 olarak bildirilmektedir (Bell ve Kyriakides, 2002; Brenner ve ark., 2000; Guibourdenche ve ark., 2010; Grimont ve Weill, 2007).

Tablo 1. *Salmonella* taksonomisi ile güncel serotip sayıları (Grimont ve Weill, 2007; Guibourdenche ve ark., 2010)

Tür	Alt tür (subsp.)	Sayı
<i>Salmonella enterica</i>		
	<i>enterica</i> (I)	1547
	<i>salamae</i> (II)	513
	<i>arizonae</i> (IIIa)	100
	<i>diarizonae</i> (IIIb)	341
	<i>houtenae</i> (IV)	73
	<i>indica</i> (VI)	13
<i>Salmonella bongori</i> *		23
Toplam		2610

*Eskiden alt tür V olarak bilinirdi.

Tüm *Salmonella* serotiplerinin yaklaşık %60'ı *S. enterica* subsp. *enterica*'ya aittir. Bu alt türdeki en yaygın serogruplar A, B, C1, C2, D ve E'dir. Aynı zamanda bu serogrupların yaklaşık %99'u insanlarda ve sıcak kanlı hayvanlardaki *Salmonella*

infeksiyonlarına sebep olmaktadır. Benzer bir şekilde gıda güvenliği açısından da en önemli alt tür *S. enterica* subsp. *enterica*'dır.

Salmonella serovarlarının tanımlanmış tüm antijenik formülleri White-Kauffmann-Le Minor şemasında listelenmekte ve yeni tanımlanan serovarlar her yıl Research in Microbiology dergisinde rapor edilmektedir. Fransa'da bulunan Pasteur Enstitüsü ile Dünya Sağlık Teşkilatı *Salmonella* Referans ve Araştırma Merkezi (World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, WHO-Salm) tarafından düzenli olarak güncellenmektedir. Son güncelleme (9th edition) 2007 yılının Ocak ayında gerçekleştirilerek içerisindeki antijenik formüller onaylanmıştır (Guibourdenche ve ark., 2010).

Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrolü ve Korunma Merkezi (Center for Disease Control and Prevention, CDC)'nde kullanılan nomenklatur sistemi, WHO-Salm'ın tavsiyelerini temel almaktadır. Tablo 2'de görüldüğü gibi güncel nomenklaturde; sadece alt tür I'deki serotipler adları ile, alt tür II, III, IV, VI ve *S. bongori*'ye ait serotipler antijenik formülleri ile; II, IV, VI ve *S. bongori*'ye ait serotiplerden 1966 yılından önce adlandırılanlar ise antijenik formülleri ile birlikte adları da yazılarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, gereksiz karışıklıklardan kaçınmak için serovar ve tür arasındaki serovar ismi italik olmayıp büyük harfle başlamaktadır.

Tablo 2. CDC'de kullanılan güncel *Salmonella* nomenklaturü (Brenner ve ark., 2000)

Taksonomi	Güncel Nomenklatur
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> (Eskiden alttür V olarak bilinirdi)
Serotip (Büyük harf, italik değil)	<ul style="list-style-type: none">✓ Serotip metin içerisinde ilk defa kullanılacak ise; serotip adı 'serotip' ya da 'ser.' kısaltmasından sonra yazılır (<i>Salmonella</i> serotip (ser) Typhimurium)✓ Alttür I'e ait serotipler adları ile; alttür II, III, IV, VI ve <i>S. bongori</i>'ye ait serotipler antijenik formülleri ile tanımlanır (<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 yılından önce adlandırılan varsa adları da yazılır [<i>Salmonella</i> ser. Marina (IV 48:g,z₅₁:z)]

Bu yeni nomenklatur sisteminde serotip isimleri, *S. enterica* subsp. *enterica*'nın içerisindeki salmonellaların ayırımında kullanılmakta, biyotiplendirme ve faj tiplendirme ile aynı seviyede uyum göstermektedir. 2006 yılı American Society for Microbiology (ASM) yayınlarında, CDC'deki *Salmonella* nomenklaturü kullanılmaktadır. Türlerin yazılışında; örneğin ilk kez yazılırken "*Salmonella enterica*" şeklinde yazılıp sonrasında "*S. enterica*" olarak, alt türlerin yazımında ilk defa "*Salmonella enterica* subsp. *arizonae*" yazılırken sonrasında "*S. enterica* subsp. *arizonae*" ve serovarlarda ise ilk defa "*Salmonella enterica* serotype Typhimurium" ve sonrasında "*Salmonella* serotype Typhimurium" şeklinde olması gerektiği belirtilmiştir (Lin-Hui Su, 2006). Bununla birlikte, salmonellaların uzun isimlerinin kullanımının oldukça zor olması nedeni ile günümüzde sadece alt tür I'deki serotipler için örneğin; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype *typhimurium*, pratik kullanım amacı ile ya *Salmonella* Typhimurium ya da *S. Typhimurium* şeklinde kısaltılmaktadır (Bell ve Kyriakides, 2002; Brenner ve ark., 2000). Günümüzde, serotip ve serovar kelimeleri birbirinin yerine kullanılmasına rağmen bilimsel iletişimde Prokaryot Sistematiği Uluslararası Komitesi (International Committee on the Systematics of Prokaryotes)'nin Yetkili Komisyonu tarafından kurulan Rules of Bacteriological Code'a göre serovar kelimesi tercih edilmektedir (Agbaje ve ark., 2011; Lin-Hui Su, 2006).

2.3.Etiyoloji

Salmonellalar, Enterobacteriaceae familyasında yer alan, Gram negatif, spor oluşturmeyen, kapsülsüz, 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm boyutlarında çubuklardır. Salmonellalar Gram negatif olmalarına rağmen, metilen mavisi ve korbol fuksin boyaları ile boyanabilmektedir. Paratifoid suşların çoğu peritrik flagellaları vasıtasıyla hareketli olmasına karşın, tavuklardaki pullorum hastalığının etkeni *S. Pullorum* ve tavuk tifosunun etkeni *S. Gallinarum* hareketsizdir (Erol, 2010; İzgür, 2006).

Bu organizmalar diğer Gram negatif bakterilerden çok sayıda kültür ortamında üreyebilmeleri, katı besi yerlerinde 37°C'de 24 saat içerisinde görünebilen, küçük, yuvarlak, S tipi, yaklaşık 2-4 mm çapında ve parlak özellikle koloniler meydana getirmesi ile ayrılabilir. Bu etkenler, aynı zamanda sıvı besi yerlerinde homojen bir şekilde hafif bulanıklık meydana getirerek üremektedir (İzgür, 2006; Jay, 2000).

Salmonellalar, genellikle laktoz, sakkaroz ya da salisini fermente edemezken glikoz, mannitol, maltoz, dulsitol gibi bazı monosakkaritleri fermente ederek asit ve gaz oluştururlar. Bu organizmanın bazı serovarlarının laktozu da fermente ettiği bilinmektedir. Sitrata karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Normal koşullarda amino asitlerden azot kaynağı olarak faydalanmamalarına rağmen, *S. Typhimurium* nitrat, nitrit ve amonyağı da azot kaynağı olarak kullanmaktadır. Salmonellalar ayrıca H₂S, katalaz, lizin ve ornitin dekarboksilaz pozitif olup, nitratı nitrite indirgemekte, oksidaz, indol ve üreaz negatif sonuç vermektedir (Holt ve ark, 1994; Jay, 2000). Salmonellalara ait temel biyokimyasal özellikler Tablo 3'te gösterilmektedir.

Tablo 3. Salmonellaların temel biyokimyasal özellikleri (Bell ve Kyriakides, 2002)

Özellik	Reaksiyon
Katalaz	+
Oksidaz	-
Laktozdan asit üretimi	-
Glukozdan gaz üretimi*	+
İndol	-
Üreaz üretimi	-
Triple Sugar Iron agardan Hidrojen sülfid üretimi	+
Karbon kaynağı olarak sitrat kullanımı*	+
Metil Red	+
Voges Proskauer	-
Lizin dekarboksilasyonu	+
Ornitin dekarboksilasyonu	+

+ : pozitif reaksiyon; - : negatif reaksiyon

*Bu testlerde *S. Typhi* negatif reaksiyon gösterir.

Salmonellalar canlılık ve gelişim için bir takım faktörlere gereksinim duymaktadır. Bunlardan biri sıcaklıktır. *Salmonella*'nın gelişmesi için ihtiyaç duyduğu sıcaklık 5.0-45°C'ler arasında değişmektedir. Gelişmenin en uygun (optimum) olduğu sıcaklık 35-37°C'ler olup bu değerlerin dışında son derece yavaş gelişmektedir (Cliver, 1990). Bu bakteriler, 70°C'nin üzerindeki sıcaklıklara, özellikle pastörizasyona duyarlı iken kurumaya karşı dirençlidirler. Çiftlik koşullarında, kuru dışkıda, tozda ve tohum gibi kuru yemlerde uzun süre canlılıklarını sürdürebildikleri bilinmektedir. Dondurma işlemi ile salmonellaların sayısında azalma görülmesine karşın, bakteri dondurularak muhafaza koşullarında

uzun yıllar canlı kalabilmektedir (Cummings ve ark., 2009; Erol, 2010; Holley ve ark., 2006).

Gelişimi etkileyen diğer bir faktör pH değeridir. Salmonellalar pH 4.0-9.0 aralığındaki değerlerde gelişebilirken (Odumeru ve León-Velarde, 2012) optimum pH aralığı 6.6-8.2'dir. pH değerinin 4.0'un altında veya 9.0'un üzerinde olması bakteri üzerinde bakterisidal etki göstermektedir. İstisnai olarak bazı elma türlerinde pH'ın 3.7 değerinde bile organizmanın gelişebileceğini gösteren araştırmalar bulunmakla birlikte bu sonucun doğrulanması için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Organizmanın gelişebileceği minimum pH değeri; suşun çeşidi, inkübasyon sıcaklığı, ortamdaki asidin türüne bağlı olarak değişmektedir. Bazı suşlar diğerlerine göre asidik koşullara daha toleranslıdır. İnkübasyon sıcaklığının gelişim için en uygun olduğu derecelerde, organizmanın olumsuz pH koşullarına karşı toleransı artmaktadır. Ortamın pH değerinin hidroklorik asit ve sitrik asit gibi inorganik asitler kullanılarak ayarlanması ile pH 4.0'de genellikle salmonellalar gelişebilmektedir. Propiyonik asit, laktik asit, asetik asit ve bütirik asit gibi organik asitler ise mikroorganizmalara karşı daha bakteriyostatik etki göstermektedir. Örneğin, mayonez hazırlarken ilave edilen sirke (asetik asit) ile pH değeri ayarlanırken *Salmonella*, pH 5.0'in altında bile gelişmemektedir. Aynı zamanda, uygun olmayan pH koşullarında salmonellalar, flagella ve fimbria gibi bazı özelliklerini kaybetmektedir (Cliver, 1990; Erol, 2000; Jay, 2000).

Salmonellaların çoğu, 0.945-0.999 su aktivitesi (a_w) aralığında bulunan gıdalarda gelişebilmektedir. Diğer bakterilerde olduğu gibi, salmonellalar için de besin içeriği, sıcaklık dereceleri, pH ve su aktivitesi değerleri birbirleri ile ilişki içerisindedir. Su aktivitesi, bir organizmanın gelişebileceği pH aralığını belirlemede önemli bir faktördür. Nötr pH içeren ortamlarda, 0.94'ün altındaki a_w değerlerinde gelişme gözlenmekte iken pH değeri minimuma doğru düştükçe bakteri gelişimi için daha yüksek a_w değerlerine ihtiyaç duymaktadır (Cliver, 1990; Jay, 2000).

Gıdanın su aktivitesi veya ortamın nemi, *Salmonella*'nın sıcaklık ile inaktive olmasını etkilemektedir. Organizma, nemli bir ortama kıyasla kuru bir ortamda uygulanan ısı işleme daha toleranslıdır. Kurutulmuş yumurta akında *Salmonella*, sıvı haldeki yumurta akına kıyasla eş değer bir sıcaklıkta yaklaşık 650 kat daha fazla ısıya dayanıklı olduğundan, organizmanın inaktivasyonunda kuru ısıtma ve nemli

ısıtma arasında çok büyük bir fark olduğu bilinmektedir. Bunun dışında *Salmonella* suşları arasında da ısıya karşı dayanıklılık açısından farklılıklar bulunmaktadır. *S. Senftenberg 775W*'nin ısı uygulamasına diğer *Salmonella* suşlarından yaklaşık 10-20 kat daha dayanıklı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, yumurta gibi gıdalarda *Salmonella* inaktivasyonu için laboratuvarında uygulanacak sıcaklık-zaman kombinasyonları, bu *Salmonella* türü gibi atipik organizmalarda güvenli olmayabilmektedir. *Salmonella*'nın gıdalarda sıcaklık ile inaktivasyonunu etkileyen diğer bir faktör, gıdanın bileşimidir. Sakkaroz bir gıda maddesine eklendiğinde, organizmanın ısıya karşı olan direnci artmaktadır. Bütün (ak ve sarı birlikte) yumurtaların *S. Typhimurium* ile kontamine olması durumunda, D değeri 60°C'de yaklaşık 0,27 dakika olarak belirtilmekte, bu yumurtalara %10 sakkaroz eklendiğinde ise D değerinin yaklaşık 0,6 dakika daha arttığı belirtilmektedir. *Salmonella* yüksek tuz konsantrasyonlarına karşı tolerans gösterememektedir. Bununla birlikte, %9'un üzerindeki tuzlu suda organizmanın canlılığını yitirdiği bildirilmektedir (D'Aoust, 2001; Jay, 2000).

Oksidasyon-Redüksiyon potansiyeli gelişim için bir diğer önemli faktördür. *Salmonella* aerobik koşulların yanı sıra anaerobik koşullarda da gelişebilmesine rağmen, gelişme -30 mV'nin altındaki potansiyel değerlerde engellenebilmektedir.

Salmonellalar özel bir besin maddesine gereksinim duymamakta, basit glikoz-tuz ortamında gelişebilmektedir. Bununla birlikte, kompleks besi yerlerinde daha hızlı üreyebilmekte ve düşük pH değerlerine karşı daha toleranslı olabilmektedir. Bulduğu ortamdaki *Salmonella* sayısı da gelişimini ve üremesini etkilemektedir. Başlangıçtaki seviyesi 10 adet/g olan *Salmonella* sayısına göre 10⁷ adet/g sayısında bulunması *Salmonella*'nın daha düşük bir pH değerinde gelişebilmesine olanak sağlamaktadır (Cliver, 1990).

Salmonellalarda genel olarak 3 çeşit antijen bulunmaktadır. Bunlar; somatik 'O' antijenleri ve flagellar 'H' antijenleri ile yüzey 'Vi' antijenidir. Salmonellalar O antijenleri ile serogruplara, H antijenleri ile de serovarlara ayrılmaktadır. O somatik antijenleri, bakterilerin hücre duvarındaki lipopolisakkarit katmanının polisakkarit kısmından oluşmaktadır. Sıcaklık uygulamalarına, alkole ve asitlere karşı dirençlidir. Formol etkisi ile aktiviteleri kaybolmakta veya çok azalmaktadır. Hareketli veya hareketsiz tüm salmonellalar en az bir O antijeni taşımaktadır. Salmonellalardaki 'O'

antijenlerinin bazıları *Escherichia*, *Citrobacter*, *Shigella* ve *Proteus* türleri gibi başka bakterilerde de bulunabilmektedir. Somatik O antijenik yapısı, salmonellaların 60'dan fazla serogruba ayrılmasına neden olan değişik faktörler içermektedir. Bu faktörler; 1, 2, 3, 4, 5, ... gibi sayılarla ifade edilmekte ve ortak antijenik faktörleri içeren salmonellalar aynı grup içerisinde toplanarak grup adları alfabetik olarak (A, B,Z) isimlendirilmektedir. Şimdiye kadar 67 grup ortaya konulmuş olup harfler yeterli gelmediği için sonraki gruplar harf ve rakamla belirtilmiştir. Örneğin O somatik antijeninin 9 ve 12 faktörlerini ortak içeren *S. Typhi*, *S. Enteritidis*, *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* bu gruplandırma D1 serogrubunda yer almışlardır (İzgür, 2006).

Flagellar 'H' antijenleri ise protein yapısında olup 60°C'nin üzerinde sıcaklıklarda, alkol, asit ve proteolitik enzimlerin etkisi ile yıkılmaktadır. Ancak formole direnç göstermektedir. H antijenleri birbirlerinden ayrı yapı ve karakterde değişik komponentlerden oluşmaktadır. Bu antijenlerin bir kısmı salmonellalar için özgün olup değişmemektedir. Bunlara spesifik faz veya Faz-1 antijenleri adı verilir. Bu antijenik faktörler a, b, c'den, z'ye kadar küçük harflerle ve alfabe harfleri yeterli olmadığından z1, z2, olarak adlandırılmıştır. H antijenlerinin diğer bir kısmı ise kültürde üreme esnasında değişerek yerlerine yeni yapıda antijenler oluşmaktadır. Bu tür antijenler birçok *Salmonella*'da rastlanabildiklerinden bunlara non-spesifik veya Faz-2 antijenleri adı verilmektedir. Bunlar sayılarla (1, 2, 3, ...) ve bazen de harflerle gösterilmektedir (n, x gibi antijenler hem birinci hem de ikinci fazda bulunabilmektedir. Salmonellaların H antijen grubundan sadece bir çeşit faz antijen faktörünü içerenler monofazik; hem Faz-1 ve hem de Faz-2 antijenlerini birlikte taşıyanlar ise difazik olarak adlandırılmaktadır (Jay, 2000).

Salmonellalarda bulunan kapsüller 'Vi' antijeni, somatik O antijeninin en dışında glikolipid yapısında yüzeysel bir antijendir. Tüm salmonellalarda bulunmamaktadır. Bulunması halinde bakterilerin O antijenini maskeleyerek O-anti serumları ile aglütinasyonu önlemektedir. Bu antijen, 60°C'de 1 saat ısı işlem uygulaması ile bakterilerden ayrılarak etkinliğini kaybetmektedir.

Bunların dışında, Salmonellaların yüzeysel antijenlerinden polisakkarit yapıda olan M antijeni, nadir olarak mukoid koloni oluşturan *S. Schottmuelleri* kökenlerinde görülebilmektedir (Jay, 2000). Ayrıca pilus antijenleri (özellikle 'Tip-1

Fimbria' antijenleri) bazı *Salmonella* türlerinde bulunmakta olup bu antijenlere karşı antikor içeren aglütinan serumlarla bakterilerin aglütine olmaları nedeni ile O, H ve Vi antijenlerinin araştırılmasını engellemeleri yönünden önemlidir (İzgür, 2006).

2.4.Epidemiyoloji

Salmonellalar, yalnızca insanlarda infeksiyon oluşturanlar ve yalnızca hayvanlarda infeksiyon oluşturanlar yani konak spesifik olanlar ve konak spesifik olmayanlar olmak üzere 3 grupta sınıflandırılmaktadır. İnsanlarda sistemik infeksiyona neden olan tifo ve paratifo etkenlerinden (*S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* ve *C*, *S. Sendai* gibi) tifo etkeni, uzun inkübasyon süresine sahip olup yüksek ateş ve yüksek mortaliteyle seyretmektedir. Paratifo etkeni ise tifo etkeninden daha hafif seyirli infeksiyon oluşturmaktadır. Yalnızca hayvanlarda infeksiyon oluşturan serotipler (tavuklarda *S. Gallinarum*, sığırlarda *S. Dublin*, domuzlarda ise *S. Choleraesuis* gibi) hayvanlar için patojendir ve gıdalarda da bulunabilmektedir. Konak spesifik olmayan serovarlar ise hem insan, hem de hayvanlar için patojen olan ve gıda kaynaklı infeksiyonlara neden olan serovarların (*S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* gibi) çoğunu içermektedir (Agbaje, 2011; Erol, 2010; Jay, 2000).

Salmonella serovarları dünyada en yaygın gıda kaynaklı bakteriyel hastalık etkenleri arasında yer almaktadır. İnsanlarda Non-typhoidal *Salmonella* kaynaklı akut gastroenterit insidansının dünya çapında yılda 1,3 milyar vaka olduğu ve bu etkenin 3 milyon ölüme sebep olduğu tahmin edilmektedir (CDC, 2011). Salmonellaların gıda kaynaklı enfeksiyonlar içerisinde tüm dünyada yaygın olarak bulunmasının başlıca nedenleri arasında; etkenin zoonotik özellikte olması, çevresel koşullara direnci ve değişik tip gıdalarda uzun süre canlılığını koruyabilmesi yer almaktadır (Brichta-Harhay ve ark., 2011). Salmonellalar içerisinde gıda infeksiyonlarına neden olan en önemli alt tür *S. enterica* ve bu alt türe ait başlıca Agona, Choleraesuis, Derby, Enteritidis, Hadar, Heidelberg, Kentucky, Meleagridis, Newport ve Typhimurium serovarlarıdır (Helke ve ark., 2017).

Salmonellalardan kaynaklanan gıda infeksiyonlarının oluşum zincirinde kontamine yemler, çiftlik hayvanları, infekte yabani hayvanlar, kuşlar, fare, rodent ve insektler, kontamine sular ve özellikle uygun olmayan koşullarda üretilen hayvansal gıdalar bulunmaktadır. Salmonelloz vakalarında birincil kaynağın kanatlı hayvan etleri ve ürünleri iken ikincil kaynağın ise semptomatik veya asemptomatik taşıyıcı

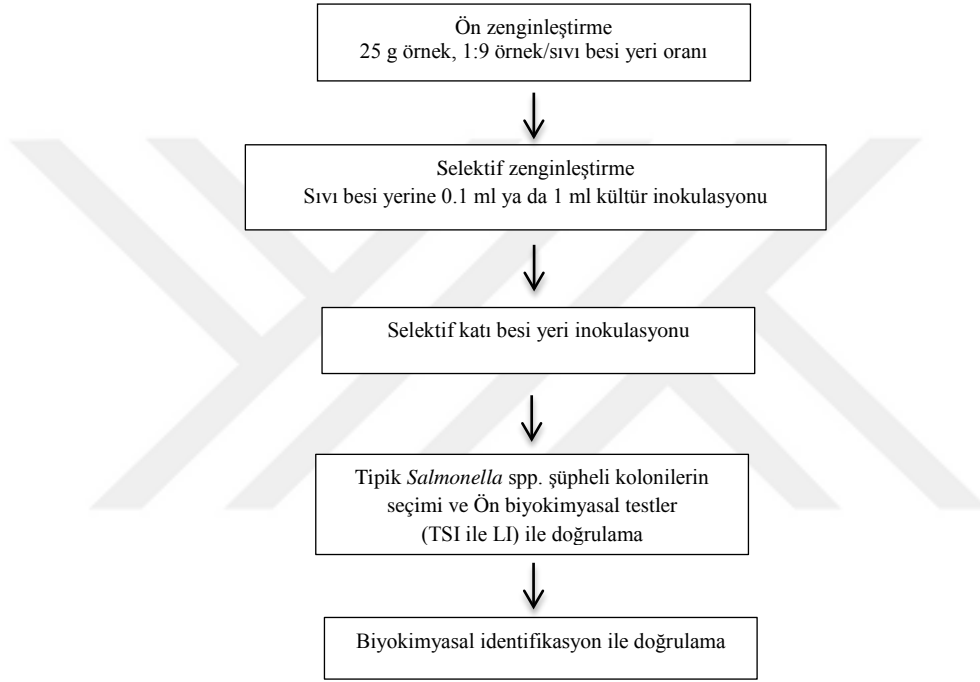
olabilen büyükbaş ve küçükbaş kasaplık hayvanlardan elde edilen kırmızı et ve ürünleri olduğu bilinmektedir (ECDC, 2011). Bunların dışında yumurta, balık, süt ve kabuklu deniz ürünleri de enfeksiyona sebep olan diğer hayvansal gıda kaynaklarını oluşturmaktadır (Helke ve ark., 2017). Özellikle kanatlı hayvanlar ve kasaplık hayvanlar, kesim öncesi/sırası/sonrası aşamalarında etkenin yayılımını kolaylaştırmaktadır. Bu mikroorganizma sıcak ya da soğukkanlı hayvanların sindirim sisteminde; safra kesesi ve bağırsaklarda asemptomatik olarak yer almakta ve çevreye dışkı ile yayılmaktadır. Ruminantlardan özellikle sığır ve koyunlar, *Salmonella* taşıyıcısı olmaları nedeni ile gıda zehirlenmelerinde karşılaşılan en önemli kaynaklardandır (Brichta-Harhay ve ark., 2011). Hayvanlar bu etkeni latent olarak mezenterial lenf yumrularında ve tonsillerinde taşımaktadır. Bazı hayvanlar klinik semptom göstermeksizin infekte olabilir ve dışkılarında az miktarda taşıdıkları salmonellalar ile yem ve suları kontamine ederek diğer hayvanların da infekte olmasına sebep olmaktadır. Hayvan hareketleri özellikle de buzağı ticareti, yemlerin açık alanlarda depolanması, gübre alımı, mevsim dışı buzağılama ve kolostrum havuzu oluşturulması gibi durumlar *Salmonella* enfeksiyonları için risk faktörü oluşturmaktadır (Cummings ve ark., 2009). Çok genç, gebe veya emziren hayvanlar klinik olarak en yaygın etkilenen ve duyarlı olan grupları oluşturmaktadır (Erol, 2010).

Besi veya süt sığırlarında *Salmonella*'ya bağlı olan enfeksiyon tablosunda en önemli klinik belirtiler, bulaşmadan 6-24 saat sonra görülen kötü kokulu, mukuslu veya kanlı ishal (özellikle genç hayvanlarda), 1-7 gün süren ateş, dehidratasyon, iştahsızlık, süt veriminde düşüştür. Ayrıca eklem enfeksiyonları, kronik zatürre, anoreksi ve septisemiden kaynaklı ani ölümler, endotoksemi ve abort gibi bulgular da gözlenmektedir. Bununla birlikte, Typhimurium, Kentucky, Montevideo, Anatum, Cerro ve 4,5,12:i serovarları sığırlarda kolonizasyona eğilim göstermekte, her zaman hastalık oluşturmadan asemptomatik olarak *Salmonella*'yı yaymaktadır. *S. enterica* serotype Cerro prevalansının özellikle süt sığırlarında ve buna bağlı olarak insanlarda görülen *Salmonella* enfeksiyonlarında artış olduğu bildirilmektedir. *Salmonella* serovarının patojenite genleri, organizmanın dozu ve konağın bağışıklığı gibi etkenler hastalığın ortaya çıkışını ve seyrini etkilemektedir (Helke, 2017).

2.5. *Salmonella* Tanı Yöntemleri

2.5.1. Geleneksel yöntemler

Salmonella'nın geleneksel izolasyon ve identifikasyonu, belirli bir ağırlık veya hacimdeki örneğin seçici olmayan bir ön zenginleştirme işlemini takiben selektif zenginleştirme basamağına geçişi, selektif katı besi yeri ortamına ekimi ve burada üreyen şüpheli kolonilerin biyokimyasal ve serolojik olarak doğrulanması aşamalarından oluşmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. *Salmonella* spp.'nin geleneksel izolasyon ve identifikasyonunda temel aşamalar

Salmonella izolasyon ve identifikasyonu için geliştirilen birçok standart metot esasen dört aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşamada yapılan ön zenginleştirme sayesinde zarar görmüş *Salmonella* hücrelerinin kendilerini yenilemesi ve sayıca az ise üreyerek sayılarının artması sağlanmaktadır. İkinci aşamada; selektif zenginleştirme ile diğer bakterilerin üremesi baskılanırken, *Salmonella* popülasyonunun artması hedeflenmektedir.

*Salmonella*ların biyokimyasal ve fiziksel özelliklerini kullanarak, ISO, Association of Official Analytical Chemists (AOAC), United States Department of Agriculture Food Safety Inspection Service (USDA-FSIS), American Public Health

Association (APHA), United States Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (US FDA BAM), Health Protection Branch-Canada (HPB), International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), National Academy of Sciences (NAS) gibi çeşitli kurumlar tarafından farklı *Salmonella* zenginleştirme yöntemleri geliştirilmiştir (Lee ve ark., 2015). Günümüzde geçerliliğini koruyarak ülkemizde referans metot olarak kullanılan ISO 6579:2002 yatay metodu, örneklerin Buffered Peptone Water (BPW) ile ön zenginleştirilmesini ve ardından Rapport-Vassiliadis Soya Peptone (RVS) ile Mueller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin (MKTTn) sıvı besi yerinde selektif zenginleştirilmesini içermektedir (ISO, 2002). Diğer kuruluşlar tarafından *Salmonella* tespiti için yayınlanan standart metotlar da esas olarak ISO 6579:2002'ye benzemektedir. Temel olarak salmonellaların tespit edilebilmesi için belirlenen geleneksel kültür yöntemleri aşağıdaki önemli aşamaları içerir:

Ön zenginleştirme (pre-enrichment) aşamasında, zarar görmüş *Salmonella* hücrelerini canlandırmak amacı ile selektif olmayan sıvı besi yerleri kullanılmaktadır. Ön zenginleştirme basamağında en çok kullanılan sıvı besi yeri BPW ve laktoz broth'dur.

İnkübe edilen ön zenginleştirme sıvı besi yeri daha sonra içerisinde safratuzları, brilliant green, thiosulphate, deoxycholate, malachite green, novobiocin, tetrathionate, cycloheximide, nitrofurantoin ve sulphacetamide gibi iki veya daha fazla inhibitör madde içeren selektif zenginleştirme (birincil zenginleştirme - primary enrichment) sıvı besi yerine transfer edilmektedir. Birincil zenginleştirmede, besi yerinde inhibitörlerin kullanılması, diğer bakterilerin çoğalmasını önleyip *Salmonella* sürekli olarak gelişmesini desteklemektedir. Rapport-Vassiliadis (RV) broth ve Tetrathionate (TT) broth; FDA-BAM ve Food Emergency Response Network (FERN) *Salmonella* yöntemi gibi onaylı standart metotlardaki selektif zenginleştirme sıvı besi yerleri olarak yer almaktadır. Bu zenginleştirme sıvı besi yerlerinin ortam seçiciliğinin ve *Salmonella* gelişiminin artırılması amacı ile modifiye edilen formülleri de bulunmaktadır (Lee ve ark., 2015).

Bir sonraki aşama olan katı besi yerinde selektif zenginleştirmede de diğer bakterilerin gelişiminin inhibisyonu amaçlanmaktadır. Sıklıkla kullanılan besi yerleri; Xylose-Lysine-Desoxycholate (XLD) agar, Xylose-Lysine-Tergitol4 (XLT4)

agar, Salmonella-Shigella agar, Brilliant Green agar, Bismuth-Sulfite agar, Hektoen Enteric agar'dır. Bazı besiyerlerinde farklı *Salmonella* serovarlarına ait koloniler, koliform bakterilerden besi yeri üzerinde oluşan koloni renkleri ile ayırt edilebilmektedir. Örneğin, SS agar üzerindeki *S. Typhi* kolonileri siyah merkezli renksiz koloniler şeklinde görülmektedir. Laktozu fermente eden *S. Arizonae* serovarları XLD üzerinde açık pembe-kırmızı etrafı zonlu koloniler oluşturabilirken, *S. Montevideo* ve *S. Virchow* gibi diğer laktozu fermente edebilen serovarlar bu agar üzerinde üremeyebilirler. Bununla birlikte; bazı serotiplerin ayırt edici özellikler göstermediği hatta XLD üzerinde üremediği için yanlış negatif sonuçlara sebep olabildiği bilinmektedir. Bu nedenle, iki veya daha fazla selektif katı besiyeri kullanılarak veya novobiocin, malachite green, thiosulphate ve sulphamethazine gibi uygun saplemanların besi yerine katılması ile ortamın *Salmonella* yönünden seçiciliğinin ve etkenin spesifik besi yerinde üreyebilme şansının artırılması sağlanmaktadır (Carrique-Mas ve Davies, 2008; Lee ve ark., 2015).

Ekim yapılan katı besi yerinde üreyen 3 veya 5 *Salmonella* şüpheli koloniden alınan kültürün, öncelikle üreaz negatif olduğu belirlendikten sonra ön biyokimyasal identifikasyonu için Triple Sugar Iron (TSI) agar ile Lysine Iron (LI) agarda üretilerek üçlü şeker fermentasyonu, protein deaminasyonu ve H₂S oluşumu ile lizin dekarboksilasyon reaksiyonları gözlemlenmektedir. *Salmonella* için tipik reaksiyon veren kültürler son aşamada, biyokimyasal ve serolojik identifikasyon testlerine tabi tutulmaktadır (Lee ve ark., 2015).

Serotiplendirme aşaması, antijenik yapının tanımlanması için aglütinasyon reaksiyonu kullanılarak kültürlerin serogruplarının tanımlanmasıdır. Bununla birlikte, aynı *Salmonella* serovarlarında, yüzey antijenlerinin değişimi veya kaybına bağlı olarak serolojik yöntemlerin hassasiyetinde azalma söz konusu olabilmektedir. *Salmonella* izolatlarının bu ve benzeri nedenler ile serotiplendirilemediği koşullarda, Değişken Alanlı Jel Elektrofrezisi (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE) ile karakterizasyon serolojik testlerin yerine kullanılabilir (Lee ve ark., 2015).

Geleneksel metotlar, yeni moleküler tabanlı teknolojilere kıyasla kullanım kolaylığı, sonuçların güvenilirliği, yüksek hassasiyet, özgünlük ve düşük maliyet özellikleri ile birçok gıda güvenliği ve halk sağlığı laboratuvarında temel analiz metotları olarak kullanılmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, bu metotlarda tam

izolasyon ve identifikasyona birkaç aşama ile 5 günden fazla zamanda gelinebilmekte, ayrıca rekabetçi floraya bağlı olarak yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Örnek sayısının çok fazla olduğu ve yanıtın en kısa sürede alınmasını gerektiren yüksek verimli tarama çalışmalarında ise, zahmetli ve zaman alıcı olan kültüre dayalı teknikler gereksinimi tek başına karşılayamayabilmektedir. Bu durumlarda *Salmonella* tanısının daha hızlı ve daha az emek harcanarak yapılabildiği selektif izolasyon, sayım ve spesifik identifikasyonu birlikte gerçekleştirebilen kromojenik ve florojenik besi yerleri kullanılarak geleneksel yöntemlere göre 1 gün daha erken sonuç alınabilmektedir (Alakomi ve Saarela, 2009; Lee et al., 2015).

2.5.2. Hızlı yöntemler

Günümüzde moleküler klonlama ve rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak geliştirilmiş olan birçok hızlı yöntem ticari kit olarak piyasada mevcuttur. Hızlı *Salmonella* tanı kitlerinin kullanımı sayesinde alınan yanıtın etkinliğinin artmasının yanında, geleneksel yöntem kullanımı ile sarf edilen malzeme kaybının da önüne geçilmektedir. Hızlı tanı teknikleri örneklerin *Salmonella* yönünden pozitif ya da negatif olduğunu birkaç saat ile bir gün içerisinde belirleyebilen güvenilir yöntemler olarak tanımlanmaktadır (Alakomi ve Saarela, 2009; Lee et al., 2015).

Günümüzde, *Salmonella* tespiti için mevcut hızlı teknikler, yeni selektif besiyeri ile modifiye edilmiş veya adapte edilmiş geleneksel prosedürleri, immünoloji tabanlı testleri ve nükleik asit bazlı testleri içeren birkaç farklı kategoride incelenebilir. Bu yöntemler içerisinde Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve PCR prosedürleri, geleneksel yöntemlerle karşılaştırılabilir derecede özgünlük ve duyarlılığa sahip olanlardır. Bu metotların duyarlılık ve deteksiyon limitlerinin ön zenginleştirme ve zenginleştirme besi yerlerinin modifikasyonu ve dilüsyonu ya da santrifügasyon, filtrasyon, kromatografi ve floresan hibridizasyon gibi teknikler ile geliştirildiği rapor edilmiştir (Alakomi ve Saarela, 2009).

I. İmmünoloji temelli uygulamalar

Çeşitli örnek tiplerinde *Salmonella* tespitinde spesifik mono veya poliklonal antikörlerin somatik veya flagellar antijenlere bağlanması prensibi ile çalışmaktadır. Bu uygulamalar içerisinde; ELISA (VIDAS, bioMerieux; TECRA *Salmonella*, Tecra), lateks aglütinasyon testleri (Bactigen, Wampole Labs; *Salmonella* Latex

Test, Oxoid; Serobact, REMEL), immunodifüzyon (Salmonella 1-2 Test, BioControl) ve immunokromatografi (Tecra Salmonella UNIQUE, Tecra) yer almaktadır. Rutin analiz teknikleri olarak bu uygulamalar, kültüre edilemeyen *Salmonella* hücrelerinin tespit edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Salmonellaların immunolojik tabanlı testlerle tanısı için kullanılan en önemli metot ELISA olup otomatize edilmiş ELISA temelli hızlı test sistemlerinin, çok sayıda örneğin bir arada analiz edilebilmesi ile hızlı yanıt elde edilmesi avantajının bulunduğu bildirilmektedir. Günümüzde ELISA tabanlı ticari sistemler olan EIAFoss (Foss Electronics, Hillorod, Denmark) ve VIDAS (Biomerieux), kanatlı endüstrisinde ve kanatlı etlerinde bakteriyel kontaminasyon varlığının belirlenmesinde kullanılmaktadır. *Salmonella* tespitinde antijen-antikor reaksiyonu temeline dayalı bir diğer uygulama da Immunomanyetik Separasyon (IMS)'dur. Selektif katı besiyerine ekimden önce IMS kullanımı, yem, kloakal svap, yumurta kabuğu, kanatlı eti ve doku örneklerindeki *Salmonella* kontaminasyonunu geleneksel selektif zenginleştirmeden daha yüksek bir hassasiyetle belirleyebilmektedir. IMS aynı zamanda hem kültür hem de ELISA ile yumurta içeriğindeki düşük sayıdaki *S. Enteritidis* kontaminasyonunu belirlemek için de kullanılmaktadır (Uyttendaele ve ark., 2003).

II. Nükleik asit temelli uygulamalar

Bu uygulamalar, *Salmonella*'nın spesifik nükleik asit hedef sekansını kullanarak tespitine dayanmaktadır. Son 10 yıl içerisinde geliştirilerek yoğun kullanım alanı bulan bu uygulamaların, geleneksel *Salmonella* tanı metodları ile karşılaştırıldığında, duyarlılık, özgünlük, saf olmayan kültürlerden dahi hızlı identifikasyon gibi birçok avantajları bulunmaktadır. Bu uygulamalarda kullanılan 2 önemli temel teknikten ilki direkt hibridizasyon (DNA probu) (Gene-Trak, Neogen; GeneQuence, Neogen) diğeri ise amplifikasyon (Polymerase Chain Reaction, PCR) (LightCycler, Roche; ABI Prism 7500, Applied Biosystems; BAX Salmonella PCR, Dupont Qualicon)'dur (Lee ve ark., 2015).

1. Polymerase Chain Reaction (PCR) uygulamaları

Salmonellaların belirlenmesinde spesifik DNA segmentlerinin yine spesifik primerler kullanılarak in vitro enzimatik amplifikasyonunu içeren kültürel olmayan bir metot olarak bilinmektedir. PCR uygulamaları sıcaklığa dayanıklı DNA

polimeraz enzimi kullanılarak 2-3 saat içerisinde spesifik tek bir gen sekansının bir milyon kat çoğaltılabilmesi esasına dayanmaktadır. Amplifiye edilen ürün, jel bazlı sistemler ve gerçek zamanlı (real time-r) PCR gibi çeşitli şekillerde tespit edilebilmektedir. Bu teknik, bir örnekteki bir molekül hedef DNA'nın dahi spesifik olarak tespit edilebileceği duyarlılık ve özgünlükte olabilmektedir. Bu tür sistemlerin etkini düşük oranda da olsa tespit edebilme kabiliyeti, zenginleştirme süresinin diğer uygulamalar ile kıyaslandığında nispeten daha kısa olmasını sağlamaktadır. PCR uygulamaları, ISO tarafından belirlenen genel esaslar ve gereklilikler göz önünde bulundurularak geliştirilmiş, valide ve standardize edilmiştir. Ticari kit bazlı olarak geliştirilen PCR teknolojileri, endüstride ve acil cevap alınması gereken laboratuvarlarda rutin *Salmonella* taramalarında başarı ile kullanılmaktadır. Bu ticari kit ve sistemlerin farklı duyarlılık ve özgünlükte olmaları kullanımları sırasında göz önünde bulundurulmalıdır (Eyigör ve ark., 2002).

a) Real time PCR (r-PCR) sistemleri

Sistem, içerisinde yer alan floresan dedektör ve sisteme bağlı real time thermocycler kullanılarak artan floresan ışımının izlenmesi ile oluşan PCR ürününün tespit edilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu sistemlerde meydana gelen ürünün kapalı bir ortamda ve oluşumu sırasında tespit ediliyor olması ampikon kontaminasyonu nedeni ile ortaya çıkabilecek yanlış pozitif sonuçların oluşumunu engellemektedir. Yine internal kontrol kullanılarak yanlış pozitif sonuç oluşumunun ve inhibitöre bağlı olası negatif sonuç alınmasının önüne geçilmektedir. r-PCR sistemleri, endüstride ve acil yanıt alınması gereken laboratuvarlarda farklı çeşitteki örnek tiplerinden *Salmonella* identifikasyonunda; DNA ekstraksiyonu, amplifikasyonu ve tespitinin otomatize bir şekilde yapılmasına imkan sağlamaktadır. Hedef *Salmonella* sekanslarının tanısında maliyeti düşük ve kullanımı kolay çeşitli floresan teknikler geliştirilmiş ve r-PCR sistemleri ile birleştirilmiştir (Maurer, 2011).

III. Minyatürize biyokimyasal testler

Geleneksel biyokimyasal testler ile karşılaştırıldıklarında kullanılan solüsyonlar, besi yerleri ve malzemelerin minimum düzeyde kullanımı ile daha ekonomik ve hızlı identifikasyona olanak sağlamaları nedeni ile bu tür testler (API 20E, bioMeriuex; Vitek 2, bioMeriuex; Tri Panel, DifcoPasca Laboratories)

geleneksel biyokimyasal yöntemlere göre çok daha fazla kullanılmaktadır (Lee ve ark., 2015).

IV. Biyosensörler

Bu sistemde öncelikle molekül/molekül grupları (reseptör) fizikokimyasal bir dönüştürücü yüzeyinde immobilize edilmektedir. Daha sonra bu sistemde, spesifik bir analit ‘biyolojik tanıma elementine’ bağlandığında ‘tanıma sinyali’ üretmekte ve sinyal kütlede, oksijen tüketiminde, potansiyel farkında, refraktif indekste, pH’ta, akımda ve diğer parametrelerde değişiklik olarak kaydedilebilmektedir. Biyosensördeki ‘biyolojik tanıma elementleri’ enzimler, nükleik asitler, antikorlar, tüm hücre veya dokulardan oluşabilmektedir (Lee ve ark., 2015).

2.6. Salmonellalarda Tiplendirme Metotları

2.6.1. Fenotipik metodlar

I. Biyotiplendirme

Selektif katı besi yerinde 37°C’de 24 saat inkübasyon sonrasında üreyen tipik kolonilerin identifikasyonunda öncelikle saf kültürden Gram boyama ve hareket muayenesi sonrasında yapılan bazı biyokimyasal testler dekstroza, laktoza, sükröze, mannitol, maltoza, dulcitol, malonat, jelatin, üre, sitrat kullanımı, ornitin dekarboksilaz, Metil-Red ve Voges-Proskauer, Potasyum siyanür (KCN) ve O-nitrophenyl-beta-D-galaktopyranoside (ONPG) oluşumu, indol, hidrojen sülfür testleridir (İzgür, 2006).

II. Serotiplendirme

Salmonella’nın tipik biyokimyasal özelliklerini gösteren bir izolatının serotiplendirilmesi, yapısındaki O ve H antijenlerinin belirlenmesi ile olmaktadır. İdentifikasyonda öncelikle O grubu antiserumların karışımı kabul edilen *Salmonella* polivalan antiserumları ile yapılan lam aglütinasyon testinde pozitif sonuç elde edilirse, incelenen etkenin *Salmonella* spp. olduğu kabul edilmektedir. Sonrasında O-spesifik Grup antiserumları (A, B, C, D,) ile bu etken tekrar aglütinasyona tabi tutulmaktadır. Hareketli salmonellalarda bu testlere ilaveten Faz 1 ve Faz 2’ye ait antiserumlar da kullanılarak tüp aglütinasyon testleri ile serovar düzeyinde identifikasyon gerçekleştirilmektedir. Tiplendirme metodları arasında aglütinasyon testleri oldukça eski olup, reaksiyonlarda yanlış pozitif, zayıf ve nonspesifik sonuçlar görülebilmektedir. Bunun sonucu olarak, epidemiyolojik önemi olan izolatların

tiplendirilememesi gibi durumlarla karşılaşılmaktadır. Serotiplendirme, fingerprinting ve filogenetik analizler kadar güçlü bir metot olmayıp tüm işlemler için 150'nin üzerinde spesifik antiseruma, çok dikkatli ve tecrübeli personele gereksinim duymaktadır. Tüm bunlara rağmen serotiplendirme, alt tiplendirme amaçlı temel bilgiyi veren ve yaygın bir şekilde kullanılan 'referans metot' olarak yerini korumaktadır (İzgür, 2006; Wattiau ve ark., 2011) .

III. Faj tiplendirme

Faj tiplendirme, *Salmonella* serovarlarının birbirinden ayrılmasında kullanılan diğer bir metot olup, ilk olarak *S. typhi* suşlarının tiplendirilmesinde kullanılmıştır. Faj tipi, seçilen bazı bakteriyofajların litik aktivitesine duyarlı hücrelerin verdiği yanıt olarak belirlenmektedir. Bu metot, günümüzde halk sağlığı yönünden önemli *Salmonella* serovarlarında (*S. paratyphi* B, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. agona*, *S. hadar* ve *S. virchow*) kullanılmaktadır. Faj tiplendirme önceleri geçici-provisional faj tipi (PT) ve kesin-definitive faj tipi (DT)'ni içeren ve isimlendirme durumunu belirten şekilde yapılmakta iken, 1950-1970'li yıllar arasında artan faj tipi nedeniyle buna son verilmiş, genel olarak bütün faj tiplerine bir PT ismi atanarak ve numaralandırılarak identifikasyonun yapılmasına karar verilmiştir. 1970'lerden sonra ise konunun daha iyi anlaşılması ve deneyim kazanılması ile oluşturulan şemalar sayesinde kesin sayısal isimler (definitive numerical designation-DT) kullanılabilir hale gelmiştir. Faj tiplendirme günümüzde gıda kaynaklı *Salmonella* salgınlarının izlenmesinde ve epidemiyolojik çalışmalarda ana metot olarak kullanılmaktadır (Bell ve Kyriakides, 2002; Malorny ve ark., 2011).

IV. Multi Locus Enzyme Electrophoresis (MLEE)

Multi Lokus Enzim Elektroforezi, aynı alttür veya serovar içerisindeki salmonellaların evolüsyonlarının araştırılmasında kullanılmıştır. MLEE, belli bir suştaki bir enzimin elektromorflarının (allozymelarının) belirlenmesi ile özellikle housekeeping genleri gibi genlerde allelik çeşitliliğin ortaya çıkarılmasını sağlamaktadır. Belirlenen allel profilleri (multilokus enzim genotipleri) elektroforetik tipler (ET) olarak isimlendirilmektedir (Bell ve Kyriakides, 2002).

V. Hızlı fenotipik parmak izi teknolojileri

1. Pyrolysis mass spektrometri

Vakum altında bakteri hücreleri gibi kompleks sistemlerin termal degradesyonunu sonrasında daha küçük ve uçucu fragmanların (pirolizat) ayrılması ve kütle spektroskopisinde incelenerek hücrenin parmak izinin çıkarılması temeline dayanmaktadır (Malorny ve ark., 2011).

2. Matrix-assisted laser desorption/ionization Time Of Flight Mass Spektromety (MALDI-TOF MS)

Bakteriyolojik identifikasyonda tüm hücrenin Matriks Aracılı Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi ile parmak izinin çıkarılması, hücrede çok fazla miktarda bulunan düşük molekül ağırlıklı proteomik bileşenlerin bu sistemle deteksiyonu temeline dayanmaktadır (Malorny ve ark., 2011).

3. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektroskopisi

Fourier transform infrared spektroskopisi, bakteriyel türler ve suşlar arasında hücre duvarı polisakkaritleri, lipidleri ve proteinleri gibi hücresel bileşenler bazında yapısal ve sayısal farklılıklara bağlı olarak her bir bakteri için tipik FT-IR spektrum ayrımı yapılabilmesini sağlamaktadır (Malorny ve ark., 2011).

4. Raman spektroskopisi

Raman spektroskopisi, tek renkli ışığın bir örneğin lazer ile uyarılması sonrasında görünür, infrarede yakın veya ultraviyole aralığında esnemez saçılımına dayalı bir sistemdir. Tüm hücre Raman parmak izi, hücrenin tam spektra ya da tam kimyasal bileşimini vermektedir (Imen ve ark., 2012).

2.6.2. Moleküler metodlar (Genom bazlı)

I. Plazmid profili

Plazmid profili, en eski DNA tabanlı alt tiplendirmelerden biridir. Plazmidlerin çoğu virulans ve antimikrobiyal direnç özelliklerini *Salmonella*'da taşıdığı için bu özellikle önemlidir. Aynı serovar içerisindeki konakçının plazmid içeriği, elde edilen profile göre farklılaşmayı ortaya koymaktadır (plazmidlerin sayısı ve moleküler boyutları). Bir serovar içerisindeki farklı plazmid profil noktaları, plazmid kazanarak veya kaybederek lateral transfer yapmaktadır. *Salmonella*'da bulunan plazmid, farklı işlevselliklere sahip 2-200 kb boyutlarında farklılık

göstermektedir. Saptama yöntemi agar jel elektroforez ile izole edilen plazmid izolasyonuna dayanır. Plazmid profilinde farklı protokoller kullanılabilir. Plazmid deseni görüntülemek için, agar jel etidyum bromür çözeltisi ile boyanmalıdır ve daha sonra UV ışığı altında görselleştirilmelidir (Imen ve ark., 2012).

II. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

PFGE, moleküler tiplendirme yöntemleri arasında altın standart olarak bilinmektedir. PFGE’de bakteriyel DNA restriksiyon endonükleazlarla kesilerek belirli aralıklarla polariteyi değiştiren darbeli akımları kullanan özel elektroforez ayırıştırma tekniği ile büyük DNA fragmanları 12000 kb’ye kadar ayrılmakta ve böylece suşlara özgü paternler elde edilmektedir. *Salmonella* suşları arasındaki moleküler ilişkiyi belirlemek için PFGE genellikle seçilecek ilk yöntem olarak düşünülmektedir. Bu yöntem nispeten yavaş olup, çoğunlukla tamamlanması 3 gün alır ve pahalı özel ekipman, yüksek kaliteli kimyasallar ve sistem hazırlığında deneyimli personele gereksinim duyulmaktadır. Bu teknik konvansiyonel serotiplendirme metoduna göre daha ekonomik bir metot olup salgınlarda izolatların fingerprinting ile tiplendirilmesi için kullanılmaktadır. PFGE metodunun farklı serovarlara ait *Salmonella* infeksiyon kaynaklarının tespitinde başarılı bir şekilde kullanıldığını bildiren araştırmalar bulunmaktadır. Ancak, PFGE’in zaman alıcı ve farklı serovarlara karşı aynı hassasiyeti gösteremeyebildiğini ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur. Bunlara ek olarak analizlerin tekrarlanabilirliğinin sağlanabilmesi için standart bir protokole ihtiyaç duyulmaktadır. Laboratuvarlar arası PFGE paternlerinin karşılaştırılması PulseNet network (2016) tarafından yürütülmektedir (Wattiau ve ark., 2011).

III. Ribotiplendirme

Ribotiplendirme, rRNA’yı kodlayan dizilerin rDNA’ya spesifik problemler ile daha önceden kesilmiş DNA fragmanlarının hibridizasyonu sonucu ortaya çıkarılan bir fingerprinting yöntemidir. RNA operonunun çoklu kopyaları *Salmonella* kromozomunda bulunmaktadır. RNA genleri, bu kopyalar ve izolatlar arasında oldukça homolog bir yapıda olmalarına rağmen araya giren dizilerin uzunluk ve nükleotid bileşimlerinde farklılıklar bulunmaktadır. Ribotiplendirme, endonükleazla kesilmiş kromozomal DNA’nın agaroz jelde ayrılması sonrasında DNA’nın

membrana aktarılması, fragmanların 16S ve 23S rRNA'yı tanıyan problemlerle hibridize edilmesi aşamalarından oluşmaktadır (Imen ve ark., 2012).

IV. İnsersiyon dizisi (IS) tiplendirme

Birçok *Eubacteria* cinsinde (*Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Vibrio*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Helicobacter*, *Actinobacillus*) bulunan çok küçük (707-711 bp) diziler olup tek bir gen içeren IS200 elementleri nadiren transpoze olmaktadır. Bu dizilerin bakterilerdeki sayılarının sabit kalması, IS200 elementinin epidemiyolojik ve ekolojik çalışmalarda uygun bir moleküler marker olarak kullanılabilirliğini sağlamaktadır. IS200 tiplendirmesi, *Salmonella* izolatları arasındaki moleküler ilişkinin belirlenmesi amacı ile kullanılmıştır (Imen ve ark., 2012).

V. Randomly Amplified Polimorphic DNA (RAPD)

RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) ilk defa 1990'da rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve PCR'ı temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. RAPD yönteminin temel prensibi, ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş tek bir 9-10 bp oligonükleotidin düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile çoğaltma yapması olarak bilinmektedir. Tekniğin devamında elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenmektedir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilmektedir (Williams ve ark., 1990).

VI. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Çoğaltılan parça uzunluğu polimorfizmi, nadir kısaltma bölgesi PCR olarak tanımlanabilir. AFLP analizi, adaptör spesifik primerlerle yapılan PCR amplifikasyonunun ardından genomik restriksiyon fragmanlarına problemlerin bağlanmasına dayanan bir yöntemdir (Imen ve ark., 2012).

VII. DNA dizileme tabanlı analizler (Multi Locus Sekans Tiplendirmesi-MLST)

Birçok lokusun tiplendirilmesinin bir arada yapıldığı, çeşitli yapısal (housekeeping) genlerin 450-500 bp'lik internal parçalarındaki DNA dizilerinin kullanımı ile gerçekleştirilen bir analiz yöntemidir. Farklı bakteri türlerinde her yapısal gen için farklı diziler farklı alellerde bulunmaktadır. Bu nedenle her izolat için lokuslardaki aleller, allelik profili ve sekans tipini belirlemektedir.

Salmonellalarda ilk MLST şeması 7 housekeeping gen fragmanına özgü olarak 2002 yılında *Salmonella* Typhi ile *S. enterica* alt türünü birbirlerinden ayırmak için oluşturulmuştur. Bu housekeeping genler (aroC, dnaN, hemD, hisD, purE, sucA ve thrA) kromozom üzerinde yayılmış pozisyonlarda bulunan ve bakterilerin çeşitlilik profillerini en iyi gösteren bölgeler olarak bilinmektedir. MLST şemalarına <http://pubmlst.org/databases.shtml> (2016) adresinden ulaşılabilen ve MLST bilgisi bu internet kaynağına veri girilerek tiplendirme bilgileri edinilebilmektedir. Tüm gen parçaları için aynı allel bilgilerine ait olan izolatlar öncelikle yaygın olarak bulunan sekans tiplerine (ST) atanmaktadır. ST'ler ST-bazlı klonal kompleks içinde bir veya iki olarak gruplandırılmaktadır (eBurst) (Malorny ve ark., 2011; Turner ve Feil, 2007).

VIII. DNA mikroarray tabanlı analizler

Son 10 yıl içinde hızlı bir gelişme göstermiş olan bu analiz sistemlerinde biyolojik problemler minyatürize gridler üzerinde bir yüzeye bağlanmış şekilde üretilmektedir. Bu şekilde çeşitli *Salmonella* DNA dizilerinden elde edilen problemlerin kullanımı ile geliştirilerek üretilmiş olan mikroarrayler (tüm genom mikroarrayleri) bulunmaktadır (Bell ve Kyriakides, 2002).

IX. PCR tabanlı analizler

1. Multipleks PCR

Multipleks PCR aynı reaksiyonda iki ya da daha fazla lokusun aynı anda amplifiye edildiği bir PCR çeşididir. 1988'deki ilk tanımlanmasının ardından yöntem, delesyon, mutasyon ve polimorfizm analizleri ile kantitatif ve reverse transkripsiyon PCR'da başarı ile kullanılmıştır (Imen ve ark., 2012).

2. Luminex teknolojisi

Belirlenmiş spektral renge sahip mikro düzeydeki boncuklar olan mikrokürelerin kullanıldığı bir teknoloji olarak bilinmektedir. Bu sistemde 100 farklı renkte, spektral tanımı olan boncuklar kullanılmaktadır. Bu sayede bir kuyucukta 100 analite kadar multipleks bir çalışma tasarlanabilmektedir. Her bir boncuk seti O antijeni veya H antijenini kodlayan genlere spesifik oligonükleotid prob seti ile eşleştirilebilmektedir (Imen ve ark., 2012; Malorny ve ark., 2011).

3. Premitest

Bu testin temeli multipleks hale getirilmiş bağlanma deteksiyonu (ligation detection reaction-LDR) ile dairesel DNA molekülleri üreterek bunların PCR ile amplifikasyonuna dayanmaktadır. Amplifiye olan moleküller daha sonra düşük yoğunluktaki prob-spesifik komplementer oligonükleotidleri içeren DNA-mikroarrayleri ile hibridize edilmektedir. Pozitif hibridizasyon fotometrik olarak detekte edilmektedir (Malorny ve ark., 2011).

4. Repetitive sequence based-PCR (Rep-PCR)

Tekrarlı dizi temelli PCR, bakteriyel kromozom üzerinde tekrar eden ve kodlama yapmayan bölgeler arasındaki dizilerin amplifikasyonuna dayalı hızlı bir bakteriyel tiplendirme metodudur (Imen ve ark., 2012).

5. Multi Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA)

Çok Lokuslu Değişken Sayılı Tekrar Dizisi Analizi (MLVA) bakterilerin alt tiplendirilmesinde yeni bir yaklaşımdır. Tekrar eden dizilerin varlığı tüm genomların temel özelliğidir. Bu yaklaşım, tekrar dizilerinin aynı türün farklı suşlarındaki kopya sayısında farklılıkların olması ile suşlar arası ayrımın yüksek duyarlılıkta yapılabilmesini sağlamaktadır. *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Typhi*, *S. Infantis* gibi farklı serovarların identifikasyonu amaçlı bazı karşı MLVA tabanlı tiplendirme çalışmaları bulunmaktadır. Bu metodun yakın genomik ilişkili izolatları ayırma kapasitesi ve çıkan salgınların araştırılmasında ve belirlenmesinde faydalı olduğu bildirilmektedir (Malorny ve ark., 2011; Ross ve Heuzenroeder, 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örnekler

Bu çalışmada, Nisan 2013-Haziran 2014 tarihleri arasında, Bursa'da faaliyet gösteren yüksek kesim kapasitesine sahip 1 özel kombina ve 1 belediye mezbahasında kesilen 100 adet sığırdan rastgele örnekleme ile 15 aylık süre içerisinde örnekler toplandı. Kesilen her bir hayvandan karkas (K) ve dışkı (D) örnekleri olmak üzere 2 tip ve toplam 200 adet örnek steril örnek alma koşulları göz önünde bulundurularak alındı.

3.1.2. Standart suşlar

Salmonella izolasyon, identifikasyon ve serotiplendirme işlemleri ile *Salmonella* spp. spesifik r-PCR analizlerinde, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) 64K (M.Y. Popoff, Institut Pasteur, Paris Cedex 15, France) ve *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) NCTC 12416 (Refik Saydam, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara) standart bakteri suşları pozitif kontrol olarak kullanıldı.

3.1.3. Antiserumlar

Serogruplandırma (Somatik-O antijenik yapıların belirlenmesi), ve serotiplendirme (Flagellar-Faz 1 ve Faz 2 antijenik yapıların belirlenmesi) için ticari anti-serumlar:

I. O antiserumları

1. Polivalan antiserumlar: *Salmonella* O Antiserum Poly A (Grup A, B, D, E₁, E₂, E₃, E₄, L); Poly B (Grup C₁, C₂, F, G, H); Poly C (Grup I, J, K, M, N, O);

2. Grup faktör antiserumları: *Salmonella* O Antiserum Grup A Faktör 1, 2, 12; Grup B Faktör 1, 4, 5, 12; Grup B Faktör 1, 4, 12, 27; Grup C₁ Faktör 6, 7; Grup C₂ Faktör 6, 8; Grup C₃ Faktör (8), 20; Grup D₁ Faktör 1, 9, 12; Grup D₂ Faktör (9), 46; Grup E Faktör 1, 3, 10, 15, 19, 34; Grup E₁ Faktör 3, 10; Grup E₂ Faktör 3, 15; Grup E₃ Faktör (3), (15), 34; Grup E₄ Faktör 1, 3, 19; Grup F Faktör 11; Grup G Faktör 13, 22, 23, (36), (37); Grup G₁ Faktör 13, 22 (36); Grup G₂ Faktör 1, 13, 23,

(36), (37); Grup H Faktör 1, 6, 14, 24, 25; Grup I Faktör 16; Grup J Faktör 17; Grup K Faktör 18; Grup L Faktör 21; Grup M Faktör 28; Grup N Faktör 30; Grup O Faktör 35;

3. Single faktör antiserumları: *Salmonella* O Antiserum Faktör 2; Faktör 4; Faktör 4,5; Faktör 5; Faktör 7; Faktör 8; Faktör 9; Faktör 10; Faktör 12; Faktör 14; Faktör 15; Faktör 19; Faktör 20; Faktör 22; Faktör 23; Faktör 25; Faktör 27; Faktör 34;

II. Vi antiserumu

Salmonella Vi Antiserum;

III. H antiserumları

1. Spicer-Edwards Antiserumları: *Salmonella* H Antiserum Spicer-Edwards 1 (a, b, c, d, eh, G Kompleks, i); Spicer-Edwards 2 (a, b, c, k, r, y, z₂₉); Spicer-Edwards 3 (a, d, eh, k, z, z₄ Kompleks, z₂₉); Spicer-Edwards 4 (b, d, G Kompleks, k, r, z, z₁₀);

2. Kompleks Antiserumları: *Salmonella* H Antiserum EN Kompleks (e, n, x; e, n, z₁₅); G Kompleks (f, g; f, g, t; g, m; g, m, q; g, m, s; g, m, s, t; g, p; g, p, u; g, s, t; g, t; m, t); L Kompleks (l, v; l, w; l, z₁₃; l, z₂₈; l, z₄₀); Z₄ Kompleks (z₄, z₂₃; z₄, z₂₄; z₄, z₃₂); 1 Kompleks (1, 2; 1, 5; 1, 6; 1, 7);

3. Single Faktör Antiserumları: *Salmonella* H Antiserum Single Faktör 2; 5; 6; 7;

4. Diğer H Antiserumları: a; b; c; d; eh; f; h; i; k; m; p; r; s; t; w; x; y; z; z₆; z₁₀; z₁₃; z₁₅; z₂₃; z₂₈; z₂₉; z₃₂ kullanıldı.

IV. Kalite kontrol antijenleri

1. QC Antijen *Salmonella* O Grup A; B; C₁; C₂; D; E₁; E₂; E₄; F; G₁; H; I;

2. QC Antijen *Salmonella* Vi pozitif kontrol olarak kullanıldı (BD, 2017).

3.1.4. Cihazlar

- Hassas terazi (Precisa, 220 M SCS)
- Deiyonize ve ultra saf su sistemleri (Milipore Mili-Q Q-Gard 1)
- pH metre (inoLab pH720)
- Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (Ikamag RH)
- Su banyosu (Nüve, RT 400)
- Otoklav (Thermo Scientific, 18102A-1CE)

- Stomacher (Seward, 400 C)
- Vorteks (Stuart, SA8)
- Biyogüvenlik kabineti Tip II (Esco, AC2-4E1)
- Densimat (Biomerieux, 21250)
- İnkübatör (Thermo Scientific, Heratherm IGS100)
- Buzdolabı (Arçelik)
- -20°C'lik derin dondurucu (Arçelik)
- Blok ısıtıcı (Techne, DB-2D-FDB02DD)
- Nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, ND-1000)
- Santrifüj (Thermo Scientific, MicroCL 17)
- PCR kabineti (Esco)
- Light Cyler PCR cihazı ve sistemi (Roche Diagnostics, 03531414201)

3.2. Yöntem

3.2.1. Örnek alma

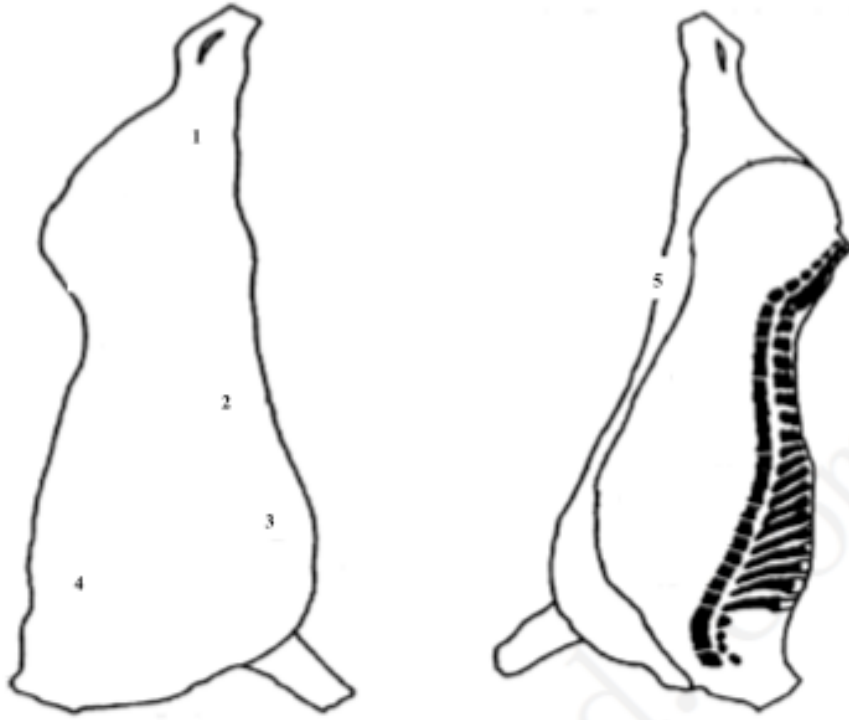
Örnek alma, TKG Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği (2011b)'nin Ek-2 (Üretim Hijyeni Kriterleri, 2.1. Et ve et ürünleri, 2.1.3. Sığır, koyun, keçi ve at karkası: *Salmonella*) ile Ek-4 (Numune alma kuralları ve analiz numunesinin hazırlanması, 4.2. Kesimhane ve kıyma, hazırlanmış et karışımları, mekanik olarak ayrılmış et ve çiğ etin üretildiği işletmelerden mikrobiyolojik numune alma kuralları, 4.2.1. Sığır, domuz, koyun, keçi ve at karkaslarından numune alma kuralları, 4.2.4. Karkas, kıyma, hazırlanmış et karışımları, mekanik olarak ayrılmış et ve çiğ kanatlı eti için numune alma sıklığı) ilgili bilgileri göz önünde bulundurularak gerçekleştirildi.

Bu amaçla, kesimin yoğun olduğu günler seçilerek ayda 2-3 kez gidilen 1 özel kombina ve 1 belediye mezbahasında, rastgele ve tarafsız örnekleme için farklı sürülere ait sığırlardan, 3 dönem ve 15 parti halinde karkas ve aynı hayvana ait dışkı örnekleri olmak üzere 2 tip örnek alındı.

3.2.1.1. Karkastan örnek alınması

Karkaslardan örnek alınmasında, ISO 17604:2003 (2003a) Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Carcass Sampling for Microbiological Analysis (Gıda ve Hayvan Yemleri Mikrobiyolojisi-Mikrobiyolojik Analiz için Karkaslardan

Örnek Alma) Standart gereklilikleri göz önünde bulunduruldu. Bu standardın 7.3. Tahrip Edici Olmayan Metot (Non-Destructive Method) olarak geçen 7.3.2. Sünger Örnekleme Metodu (Sponge Sampling Method) uygulandı. Buna göre aynı standardın Ek A'sında en yüksek sayıda mikroorganizma ile sürekli kontamine 'örnek alma bölgesi' olarak bildirilen yerlerden her bir bölgenin alanı 100 cm² (10 cmx10 cm) olacak şekilde sırasıyla dış yüzeyden; (1) but-nuar, (2) böğür-pençata, (3) döş, (4) ön kaburga, iç yüzeyden ise; (5) kasıktan örnek alındı (Şekil 2). Örnek alınan her bir bölge BPW-ISO (Oxoid, CM1049) ile ıslatılmış steril süngerle (Whirl Pak, B01351WA) yaklaşık 10 kez dikey 10 kez yatay olarak silindi, sonrasında sünger steril torbasına geri konularak üzerine 25 ml'ye tamamlanacak şekilde BPW ilave edildi. Örnekler +4°C'deki saklama kutularında laboratuvara getirilerek en fazla 1 saat içerisinde *Salmonella* spp. varlığı yönünden incelemeye alındı.



a) Dış Yüzey

b) İç Yüzey

- | |
|------------------|
| 1. But-Nuar |
| 2. Böğür-Pençata |
| 3. Döş |
| 4. Ön Kaburga |
| 5. Kasık |

Şekil 2. Sığır karkastan örnek alma bölgeleri (ISO, 2003a)

3.2.1.2. Dışkıdan örnek alınması

Dışkıdan örnek alınmasında, Ransom ve ark. (2002) ile Milnes ve ark. (2008)'nin bildirdiği şekilde, kolon bölgesinden itibaren bağırsak rektuma kadar sağılarak anüsten dışarı akıtılıp karıştırıldıktan sonra yaklaşık 25-50 g olarak alınan örnek, steril örnek alma poşetine aktarıldı. Örnekler +4°C'deki saklama kutularında laboratuvara getirilerek en fazla 1 saat içerisinde *Salmonella* spp. varlığı yönünden incelemeye alındı.

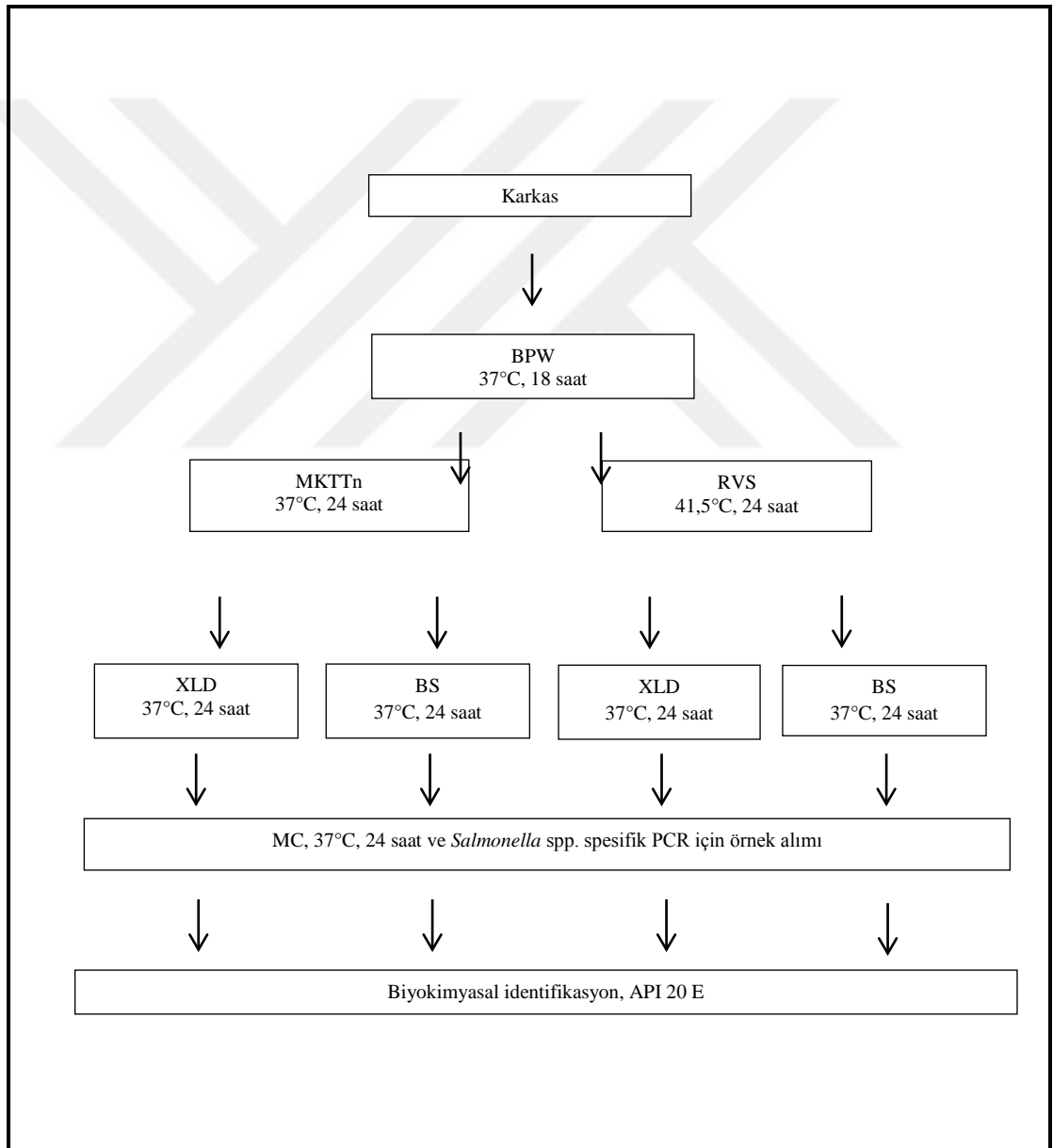
3.2.2. İzolasyon ve identifikasyon

3.2.2.1. Karkas örneklerinden ISO 6579:2002 ile *Salmonella* izolasyon ve identifikasyonu

Şekil 3'de belirtildiği gibi karkastan alınan 25 ml BPW içerisindeki sünger örneği, ön zenginleştirme için; içerisinde 225 ml BPW bulunan 500 ml'lik steril stomacher poşetine (LP Italiana, L177538) konularak, Stomacher (Seward, 400 C)'de 230 rpm'de 2 dakika homojenize edildikten sonra 37°C'de 18 saat inkübe edildi. Selektif zenginleştirme için; (a) BPW'dan 1 ml alınarak içerisine Novobiocin Supplement (Oxoid, SR0181) ilave edilmiş 10 ml MKTTn broth (Oxoid, CM1048)'a geçildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. (b) BPW'dan 0,1 ml alınarak 10 ml RVS broth (Oxoid, CM0866)'a geçildi ve 41,5°C'de 24 saat inkübe edildi. Katı besi yerinde selektif zenginleştirme amacı ile MKTTn broth ve RVS broth'dan hem XLD (Oxoid, CM0469) agara hem de *Salmonella* Selective Supplement (Oxoid, SR0194) ilave edilmiş Brilliance *Salmonella* (BS) (Oxoid, CM1092) agara 20 µl ekim yapıp plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında *Salmonella* şüpheli kolonilerden 1-5 adedi seçilerek doğrulama amaçlı hem *Salmonella* spp. spesifik r-PCR uygulanması için örnekleme hem de biyokimyasal identifikasyon amacı ile Mac Conkey (MC) agar (Oxoid, CM0115)'da saf olarak üretildi. PCR için MC agarda üretilmiş olan saf kültürden bir öze dolusu alınarak ve eppendorf tüpü içerisinde 500 µl steril PCR-grade suda Vorteks (Stuart, SA8) yardımı ile homojenize edildi ve -20°C derin dondurucuda saklandı.

Biyokimyasal identifikasyon için MC agarda üretilmiş olan saf kültürden Brain Heart Infusion (BHI) broth (Oxoid, CM1135)'a transfer edilen örnekler 37°C'de 18-20 saat inkübe edildikten sonra öncelikle üreaz aktivitesi (Ürea Agar

Base, Oxoid, CM0053), üçlü şeker fermentasyonu ve H₂S üretimi (Triple Sugar Iron Agar, Oxoid, CM0277), lizin dekarboksilaz (Lysine Iron Agar, Oxoid, CM0381) aktivitesi belirlendi ve sonrasında API 20 E (Biomérieux, 20100) yapılarak elde edilen profil sonuçları değerlendirildi. Biyokimyasal identifikasyon sonucunda *Salmonella* spp. pozitif çıkan örneklerle ait izolatlar BHI broth ve %50 steril gliserol (Sigma Aldrich, 15524) içeren stokta -20°C derin dondurucuda saklandı. Tüm izolasyon ve identifikasyon işlemleri biyogüvenlik kabinesi Tip II (Esco, AC2-4E1) içerisinde gerçekleştirildi.

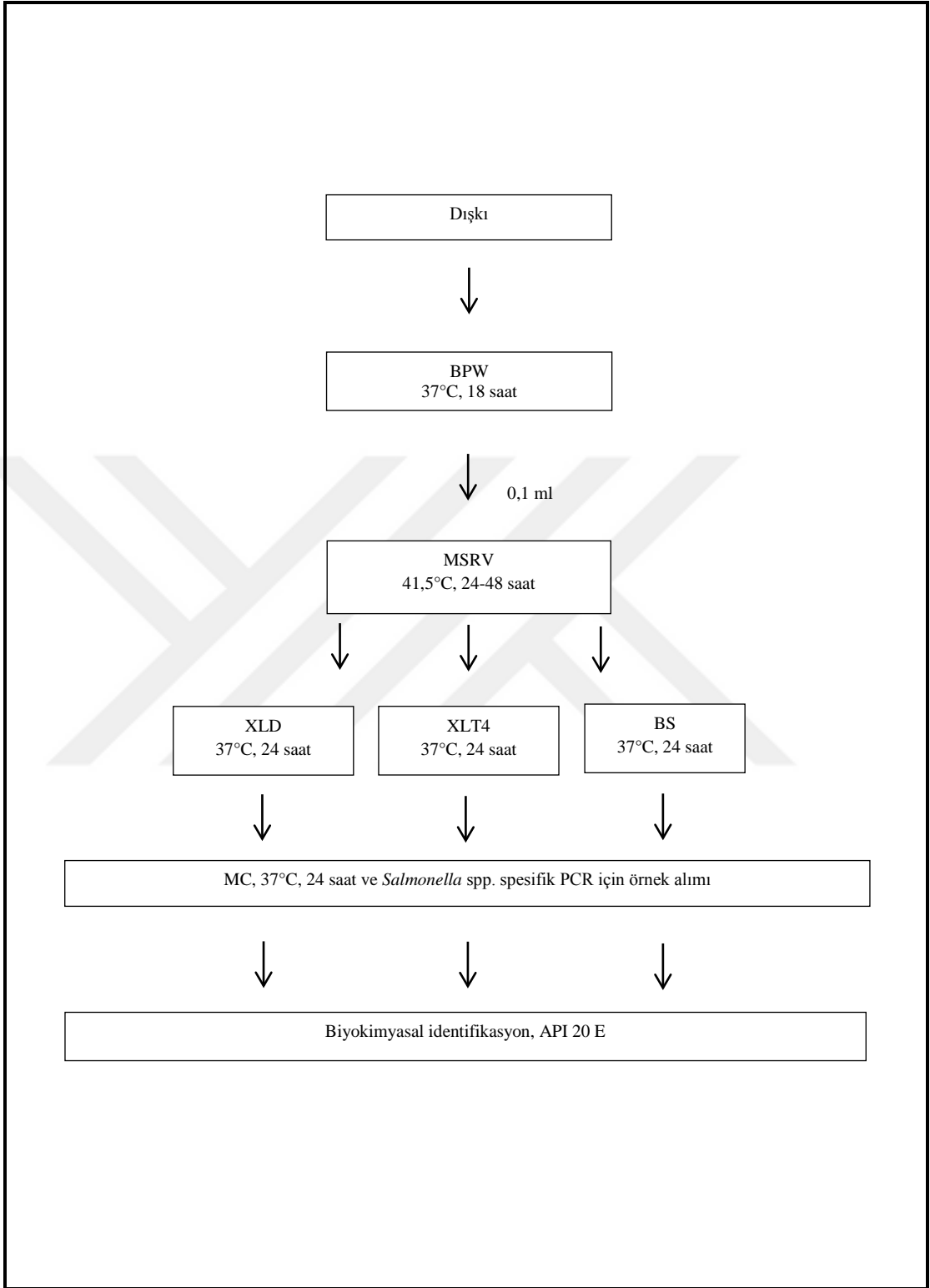


Şekil 3. ISO 6579:2002 ile *Salmonella* izolasyon ve identifikasyonu akış şeması ve *Salmonella* spp. spesifik r-PCR için örnekleme (ISO, 2002)

3.2.2.2. Dışkı örneklerinden ISO 6579/A1:2007 ile *Salmonella* izolasyon ve identifikasyonu

Şekil 4'te belirtildiği gibi steril örnek alma poşetinde 25-50 g arasında alınan dışkıdan 500 ml'lik stomacher poşetine 25 g tartıldıktan sonra üzerine 225 ml BPW konularak, Stomacher'de 230 rpm'de 2 dakika homojenize edilip 37°C'de 18 saat inkübe edildi. Ön zenginleştirme sonrasında BPW'daki kültürden 0,1 ml alınarak Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) (Oxoid, CM1112) agara selektif zenginleştirme için ekim yapıldı ve 41,5°C'de 24 saat inkübe edildi. Zon oluşumuna göre gerekli görüldüğü durumlarda inkübasyon süresi 24 saat daha uzatıldı. Katı besi yerinde selektif zenginleştirme amacı ile MSRV Medium'dan XLD agara ve içerisine XLT4 Selective Supplement (Oxoid, SR0237) ilave edilerek hazırlanan XLT4 agar (Oxoid, CM1061)'a ayrıca *Salmonella* Selective Supplement ilave edilmiş BS agara 20 µl ekim yapıp plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında *Salmonella* şüpheli kolonilerden 1-5 adedi seçilerek doğrulama amaçlı hem *Salmonella* spp. spesifik r-PCR uygulanması için örnekleme hem de biyokimyasal identifikasyon amacı ile MC agarda saf olarak üretildi. PCR için MC agarda üretilmiş olan saf kültürden bir öze dolusu alınarak ve eppendorf tüpü içerisinde 500 µl steril PCR-grade suda vorteks yardımı ile homojenize edildi ve -20°C derin dondurucuda saklandı.

Biyokimyasal identifikasyon için MC agarda üretilmiş olan saf kültürden BHI broth'a transfer edilen örnekler 37°C'de 18-20 saat inkübe edildikten sonra öncelikle üreaz aktivitesi, üçlü şeker fermentasyonu ve H₂S üretimi, lizin dekarboksilaz aktivitesi belirlendi ve sonrasında API 20 E yapılarak elde edilen profil sonuçları değerlendirildi. Biyokimyasal identifikasyon sonucunda *Salmonella* spp. pozitif çıkan örnekler için izolatlar BHI broth ve %50 steril gliserol içeren stokta -20°C derin dondurucuda saklandı. Tüm izolasyon ve identifikasyon işlemleri biyogüvenlik kabineti Tip II içerisinde gerçekleştirildi.



Şekil 4. ISO 6579/A1:2007 ile *Salmonella* izolasyonu ve identifikasyonu akış şeması ve *Salmonella* spp. spesifik r-PCR için örnekleme (ISO, 2007)

3.2.3. *Salmonella* spp. spesifik r-PCR için templeyt hazırlama

Templeyt hazırlama amacı ile Carlı ve ark. (2001)'nin hücre patlatma metodu modifiye edilerek uygulandı. Eppendorf tüpleri içerisinde -20°C derin dondurucuda saklanan izolatlar, oda sıcaklığında eritilerek vorteksle homojenize edildikten sonra 95°C blok ısıtıcıda (Techne, DB-2D - FDB02DD) 10 dakika inkübe edildi ve sonrasında 18,000 × g'de 3 dakika santrifüje (Thermo Scientific, MicroCL 17) edildi. Tüpte üstte kalan sıvı r-PCR'da templeyt olarak kullanılmak üzere steril DNaz içermeyen bir eppendorf tüpüne ayrıldı. İzole edilen DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu Nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, ND-1000) kullanılarak ölçüldü. Miktarı 20 ng/μl, ABS260/ABS280 değeri 1,6-2,0 aralığında olan DNA izolatları analizlerde kullanıldı.

3.2.4. *Salmonella* spp. spesifik r-PCR

Doğrulama amaçlı olarak yapılacak *Salmonella* spp. spesifik r-PCR için Malorny ve ark. (2004) ile Malorny ve ark. (2007) tarafından geliştirilmiş olan r-PCR temel alındı. *Salmonella* patojenite adası 2 sentrizom 30,5 yakınında yer alan *ttrRSBCA* lokusu-spesifik olarak tasarlanmış olan primerler ve prob dizi bilgileri ile r-PCR'da kullanılan Internal Amplifikasyon Kontrol (IAC) dizisi, buna ait primerler ile prob dizi bilgileri sırasıyla:

- *ttr-6* (forward) 5' – CTCACCAGGAGATTACAACATGG – 3',
- *ttr-4* (reverse) 5' – AGCTCAGACCAAAAGTGACCATC – 3',
- *ttr-5* (hedef prob) 5' – FAM-CACCGACGGCGAGACCGACTTT-TAMRA – 3'.
- IAC dizisi (*Escherichia coli* Lambda faj spesifik)
CGTCAGTGTGAAGCGGTTATAAATCTGCTCTTTCGCGGTATCCGTACCG
ATTTCGGTAAAGTAAACCCGTTTTTGTTCGCTTACGTGGCAT,
- IAC (forward) 5' – CGTCAGTGTGAAGCGGTTATAA – 3',
- IAC (reverse) 5' – ATGCCACGTAAGCGAAACA – 3',
- IAC (hedef prob) 5' – HEX-TGCTCTTTCGCGGTATCCGTACCGAT-TAMRA – 3' olarak belirlendi (Way2Gene, BN 15-0001-01, Genmar, Türkiye).

PCR kabineti (Esco) içerisinde hazırlanan r-PCR reaksiyon karışımı (Way2Gene, BN 15-0001-01, Genmar, Türkiye) toplam 10 μl olup; 2,5 μl *Salmonella* detection mix (primerler ve problemleri içeren parametre-spesifik reaktifler), 1μl IAC DNA'sı, 2 μl PCR-grade su, 2 μl enzim karışımı (enzim, dNTP mix,

reaksiyon tampon solüsyonu) ve 2,5 µl templeyt DNA (pozitif kontrol ve örnekler için DNA, negatif kontrol için PCR grade su)'dan oluştu. LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, 03531414201) cihazında gerçekleştirilen reaksiyonun parametreleri 11 dakika 95°C'de ön denaturasyon sonrasında, 40 siklus 95°C'de 10 saniye denaturasyon, 58°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 5 saniye uzama olarak belirlendi. *Salmonella* hedef DNA'sı floresan sinyali 530 nm kanalında, IAC floresan sinyali ise 560 nm kanalında tespit edilerek okundu.

3.2.5. Serolojik tiplendirme

İzolasyon, identifikasyon ve *Salmonella* spp. spesifik r-PCR ile *Salmonella* olduğu doğrulanan izolatlar serolojik tiplendirme yapıldı. Bu amaçla, White-Kauffmann-Le Minor Şeması (Grimont ve Weill, 2007) ve Guibourdenche ve ark. (2010) temel alınarak, serogruplandırma (Somatik-O antijenik yapılarının belirlenmesi) ve serotiplendirme (Flagellar-Faz 1 ve Faz 2 antijenik yapıların belirlenmesi) işlemleri, ticari antiserumlar kullanılarak gerçekleştirildi. Somatik antijen analizleri için lam aglütinasyon testi, flagellar faz antijen analizleri için ise tüp aglütinasyon testi uygulandı.

3.2.5.1. Aglütinasyon reaksiyonlarının değerlendirilmesi

Lam ve tüp aglütinasyon işlemleri üretici firma protokolüne uygun şekilde; +4 (%100 aglütinasyon; zemin açık veya yok denecek kadar puslu), +3 (%75 aglütinasyon; zemin çok az puslu), +2 (%50 aglütinasyon; zemin orta dereceli puslu), +1 (%25 aglütinasyon; zemin tam puslu) ve aglütinasyon negatif şeklinde değerlendirilerek değerlendirme yapıldı. Pozitif kontrolde kullanılan standart bakteri suşları ile Kalite Kontrol Antijenleri +3 ve üzeri derecede aglütinasyon verdi. Negatif kontrolde aglütinasyon görülmedi. Test edilen izolatların +3 ve üzeri aglütinasyonları pozitif, +2 ve altı aglütinasyonları ile aglütinasyon süresi 1 dakikayı geçenler negatif olarak değerlendirildi.

3.2.5.2. İzolatların otoaglütinasyon özelliğinin test edilmesi

Serogruplandırma işlemlerinden önce izolatların otoaglütinasyon özelliklerinin test edilmesi amacı ile, Nutrient Agar (Oxoid, CM0003)'da saf olarak üretilen izolattan bir öze dolusu alınarak lam üzerine daha önceden damlatılmış olan 1 damla %0,85'lik NaCl (Merck, K25659900.925) içerisinde emülsifiye edildi. Lam 1 dakika dairesel hareketlerle çevrildikten sonra, aglütinasyon olup olmadığı

incelendi. Aglutinasyon meydana geldiğinde (otoaglutinasyon), bu izolatın kültürü 'Rough' (R) olarak kabul edildi ve serogruplandırmaya geçilmeyerek, test tekrar edildi. Tekrar sonrasında aglutinasyon oluşması durumunda, kültür saflaştırılarak identifikasyon işlemleri tekrarlandı. Otoaglutinasyon göstermeyen izolatlar ise direkt serogruplandırmada kullanıldı.

3.2.5.3. Serogruplandırma

Serogruplandırma işlemleri ve Vi antijen tespiti lam aglutinasyon testi ile yapıldı. Bir lam üzerine 1 damla antiserum konulduktan sonra Nutrient Agar üzerinde üreyen izole koloniden bir öze dolusu alındı ve antiserum ile karıştırıldı. Negatif kontrolde bir damla antiserum, 1 damla %0,85'lik NaCl ile; pozitif kontrolde 1 damla antiserum 1 damla uygun Kalite Kontrol Antijeni ile karıştırıldı. Lamlar 1 dakika dairesel hareketlerle çevrildikten sonra aglutinasyon olup olmadığı incelendi ve 1 dakika içerisinde görülen aglutinasyonlar pozitif olarak değerlendirildi.

Serogruplandırmada ilk olarak izolatın Salmonella Polivalan O Antiserumları ile aglutinasyonu test edildi. Öncelikle Poly A ve Poly B Antiserumları ile test edilen izolat, eğer bunlardan biri ile aglutinasyon verdiyse, pozitif aglutinasyon veren Polivalan Antiserumun kapsadığı Grup Faktör Antiserumları ile tek tek test edildi. Gerektiği durumlarda ilgili grupların altında yer alan Faktör Antiserumları kullanılarak serogruplandırma işlemi tamamlandı.

Salmonella Poly A ve Poly B Antiserumları ile test edilen izolat, bu 2 Polivalan Antiserum ile aglutinasyon vermediği zaman Salmonella Vi Antijeninin Somatik Antijen aktivitesini maskeleyiği göz önünde bulundurularak Salmonella Vi Antiserumu ile test edildi. Test sonrasında pozitif aglutinasyon gözlenmesi halinde ısıya duyarlı olan Salmonella Vi Antijenini (zarf antijeni) yıkımlamak için izolat ısı işlem uygulandıktan sonra yeniden aynı antiserum ile test edildi. İzolatın ısı işlem sonrasında Salmonella Vi Antiserumu ile aglutinasyon vermemesi beklendi. Sonrasında Poly A ve Poly B Antiserumları ile test tekrar edildi. Bu aşamada yine negatif sonuç gözlendiği takdirde Poly C Antiserumu ile test edildi. Bu sonuçlardaki pozitifliğe göre Grup Faktör Antiserumları ve Faktör Antiserumları ile de test edilerek izolatın hangi serogruba ait olduğu belirlendi (Grimont ve Weill, 2007; Guibourdenche ve ark., 2010).

3.2.5.4. Serotiplendirme

Serogruplandırması tamamlanan izolatların Faz 1 ve Faz 2 antijenlerinin belirlenmesi amacı ile yapılacak olan serotiplendirme işlemleri tüp aglutinasyon testi ile yapıldı. Serotiplendirmede ilk olarak izolatın Faz 1 antijenlerinin belirlenmesi için en sık izole edilen *Salmonella* serotiplerinin tespitine yönelik olarak Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards ile aglutinasyonu test edildi.

Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards aglutinasyon testi öncesinde, Nutrient Agar'da saf olarak üretilen izolattan bir öze dolusu alınarak, içerisinde Craigie tüpü yerleştirilen ve Motility GI Medium (Becton Dickinson, 286910) bulunan tüpe (Craigie tüpünün iç kısmına ve üst yüzeyine) inokule edildi. Tüpler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İzolatların hareketliliğinin artırılması amacı ile bir kaç kez pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Hareketliliği gözlenen tüplerden (Craigie tüpünün dış kısmından ve üst yüzeyinden) bir öze dolusu alınan izolat, BHI Broth'da 35°C'de 4-6 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası içerisinde %0,6 formalinize %0,85'lik NaCl bulunan tüpe BHI broth'da üreyen kültür aktarılarak turbiditesi McFarland No.3 olacak şekilde densimat (Biomerieux, 21250) ile ölçülerek suspanse edildi.

Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards aglutinasyon testi için, üretici firma protokolüne uygun şekilde dilue edilmiş (1:1000) ve 4 farklı tüpte hazırlanmış olan 0,5'er ml antiserumlar (Spicer-Edwards 1, 2, 3 ve 4) üzerine test edilecek izolatın turbiditesi ayarlanmış olan kültüründen her bir tüp içerisine 0,5'er ml ilave edilerek 50±2°C'deki su banyosunda 1 saat inkübe edildi. Tüplerin su banyosu içerisinde veya su banyosundan çıkarılma esnasında ve okunmadan önce sallanmamasına veya çalkalanmamasına dikkat edildi. İnkübasyon sonunda tüplerde gözlenen pozitif ve negatif aglutinasyon sonuçları, üretici firma protokolünde belirtilen tablo göz önünde bulundurularak değerlendirildi (Tablo 4). Değerlendirme sonucunda Faz 1 antijenleri belirlenen izolatlara gerektiği durumlarda (G Kompleks ve z₄ Kompleks antijenleri ise) ilgili Salmonella H Kompleks Antiserumları ve diğer Salmonella H Antiserumları kullanılarak tüp aglutinasyon testi yapıldı ve serotiplendirmenin ilk aşaması tamamlandı.

Tablo 4. Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards ile aglütinasyon tanımlaması (BD, 2017)

H Antijen(ler)	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards				H Antijen(ler)	Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards			
	1	2	3	4		1	2	3	4
a	+	+	+	-	k	-	+	+	+
b	+	+	-	+	r	-	+	-	+
c	+	+	-	-	y	-	+	-	-
d	+	-	+	+	z	-	-	+	+
e, h	+	-	+	-	z ₄ Kompleks**	-	-	+	-
G Kompleks*	+	-	-	+	z ₁₀	-	-	-	+
i	+	-	-	-	z ₂₉	-	+	+	-

*Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards 1 ve 4'ün G Kompleks bileşeni, f, g; f, g, s; f, g, t; g, m; g, m, q; g, m, s; g, m, s, t; g, m, t; g, p; g, p, s; g, p, u; g, q; g, s, t; g, t; m, p, t, u ve m, t antijenleri ile reaksiyon verir.

** Salmonella H Antiserum Spicer-Edwards 3'ün z₄ Kompleks bileşeni, z₄, z₂₃; z₄, z₂₄ ve z₄, z₃₂ ile reaksiyon verir.

Faz 2 antijenlerinin belirlenmesi için gerekli olan faz döndürme işleminde, belirlenen Faz 1 antijenine ait antiserumun 1:10'luk dilüsyonundan 1 ml alınarak steril petri kabına aktarıldı. Üzerine faz dönüşümü için hazırlanan Motility GI Medium'dan 25 ml ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Hazırlanan besi yerinin orta kısmına Nutrient Agar'da saf olarak üretilen izolattan bir öze dolusu alınarak inokule edildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Örneğin, *S. Typhimurium*'un Faz 1 antijeni [i] olduğu için içerisinde [i] antiserumu olan besi yerine *S. Typhimurium* inokule edilerek Faz 2 antijenlerinin [1,2] üremesi ve yayılması sağlandı. Gerektiğinde izolatın hareketliliğinin artırılması amacı ile bir kaç kez pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Hareketliliği gözlenen izolatın besi yeri üzerinde inoküle edildiği bölgeye en uzak olan kısımdaki üremeden bir öze dolusu alınarak BHI broth'a ekim yapıldı ve 35°C'de 4-6 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası içerisinde %0,6 formalinize %0,85'lik NaCl bulunan tüpe BHI broth'da üreyen kültür aktarılarak turbiditesi McFarland No.3 olacak şekilde densimat (Biomerieux, 21250) ile ölçülerek suspanse edildi.

Salmonella H Kompleks Antiserumları, Salmonella H Single Faktör Antiserumları ve diğer Salmonella H Antiserumları kullanılarak tüp aglütinasyon testleri yapıldı. Tüp aglütinasyon testinde, üretici firma protokolüne uygun şekilde dilue edilmiş (Salmonella H Kompleks Antiserumları, Salmonella H Single Faktör Antiserumları ve Diğer Salmonella H Antiserum x, z₁₃, z₁₅ ve z₂₈ dışında kalan

Salmonella H Antiserumları için 1:1000; Diğer Salmonella H Antiserumları x, z₁₃, z₁₅ ve z₂₈ için ise 1:500) ve 0,5'er ml tüplere aktarılmış antiserumlar üzerine test edilecek izolatın türbiditesi ayarlanmış olan kültüründen her bir tüp içerisine 0,5'er ml ilave edilerek 50±2°C'deki su banyosunda 1 saat inkübe edildi. Tüplerin su banyosu içerisinde veya su banyosundan çıkarılma esnasında ve okunmadan önce sallanmamasına veya çalkalanmamasına dikkat edildi. İnkübasyon sonunda tüplerde gözlenen pozitif ve negatif aglütinasyon sonuçları değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda Faz 2 antijenleri belirlenerek izolatın serotiplendirme işlemi tamamlandı (Grimont ve Weill, 2007; Guibourdenche ve ark., 2010).

3.2.6. İstatistiksel analiz

Karkas ve dışkı örneklerinde ISO ve r-PCR yöntemleri kullanılarak elde edilen sonuçların relatif doğruluk, duyarlılık, özgünlük değerleri ISO 16140 (2003b) protokolünde belirtildiği şekilde hesaplandı. Karşılaştırılan analizler arasındaki uyumun güvenilirliği Cohen'in kappa (κ) testi ile belirlendi (Landis ve Koch, 1977).

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Nisan 2013-Haziran 2014 tarihleri arasında, Bursa'da faaliyet gösteren 1 özel kombina ve 1 belediye mezbahasında kesilen 100 adet sığıra ait karkas ve dışkı örnekleri *Salmonella* prevalansı yönünden ve serotip dağılımının belirlenmesi amacı ile analiz edilmiştir.

4.1. Örnekleme Sonuçları

Alınan örneklere ait bilgiler Tablo 5’de verilmiştir.

4.2. Karkas Örneklerinde *Salmonella* spp. İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları

Alınan örnekler öncelikle uluslararası ‘Gold Standart’ olan ISO yöntemleri ile *Salmonella* spp. varlığı yönünden analiz edilmiştir. Tablo 6’da görüldüğü gibi ISO 6579:2002 (2002) yöntemi ile 100 adet karkas örneğinin 2 (K53 ve K61) tanesinin (%2) *Salmonella* spp. yönünden pozitif olduğu saptanmıştır.

4.3. Dışkı Örneklerinde *Salmonella* spp. İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları

ISO 6579/A1:2007 (2007) yöntemi kullanılarak analiz edilen 100 adet dışkı örneğinin 2 (D73 ve D97) tanesinin (%2) *Salmonella* spp. yönünden pozitif olduğu saptanmıştır (Tablo 7). *Salmonella* pozitif olarak sonuç veren karkas ve dışkı örnekleri incelendiğinde aynı hayvana ait olmadıkları görülmüştür.

4.4. ISO ve *Salmonella* spp. Spesifik r-PCR Yöntemlerine Ait Sonuçlar

ISO yöntemi ile izolasyonda kullanılan farklı selektif besi yerlerinden izole edilen karkas örneklerinde 28 adet ve dışkı örneklerinde 11 adet *Salmonella* spp. şüpheli izolata doğrulama amacı ile yapılan identifikasyon (ISO) ve *Salmonella* spp. spesifik r-PCR yöntemlerine ait sonuçlar Tablo 8’de verilmiştir. Karkas izolatlarının ISO yöntemi ile 7 tanesinin, spesifik r-PCR ile 10 tanesinin, dışkı izolatlarının ise her iki yöntemle de 2 tanesinin *Salmonella* spp. pozitif olduğu belirlenmiştir. Analiz edilen toplam 39 izolatın 9’u ve 12’si sırasıyla ISO ve r-PCR ile *Salmonella* spp. pozitif olarak doğrulanmıştır. Ayrıca 9 izolatın her iki yöntemle de pozitif bulunurken, 27 izolatın her iki yöntemle de negatif sonuç verdiği, 3 izolat (K73-MX, K73-MB, K81-MX) dışında ISO ve r-PCR yöntemlerinin sonuçları arasında tam bir uyum olduğu görülmüştür. r-PCR ile *Salmonella* spp. pozitif olarak doğrulanan 4 karkas (K53, K61, K73 ve K81) ve 2 dışkı (D73 ve D97) örneğinden elde edilen

toplam 9 adet izolata ait amplifikasyon eğrilerini içeren spesifik r-PCR grafikleri Şekil 5 ve Şekil 6'da sunulmuştur.

4.5. *Salmonella* spp.'lerin Serolojik Tiplendirme Sonuçları

Salmonella spp. izolatlarının serolojik tiplendirilmesi amacı ile gerçekleştirilen serogruplandırma ve serotiplendirme işlemlerine ait aşamalar ve sonuçlar Tablo 9'da sunulmuştur. Karkas örneklerinden, K53 örneğine ait 3 izolat ve K61 örneğine ait 4 izolat olmak üzere toplam 7 adet *Salmonella* spp. izolatının 7'si de *S. Typhimurium* olarak tiplendirilmiştir. Dışkı örneklerinden, D73 örneğine ait 1 izolatın *S. Enteritidis* iken D97 örneğine ait 1 izolatın ise *S. Albany* olduğu belirlenmiştir. Çalışmada incelenen örnek tipine göre *Salmonella* serovar dağılımı; 7 adet karkas izolatının tümü (%100) *S. Typhimurium*, 2 adet dışkı izolatının 1 tanesi *S. Enteritidis* (%50), diğeri ise *S. Albany* (%50) olarak bulunmuştur.

4.6. İstatistiksel Analiz Sonuçları

ISO 16140 (2003b)'a göre yapılan istatistiksel analizler sonrasında karkas ve dışkı örneklerinde doğrulama amacı ile yapılan r-PCR ile ISO yöntemleri karşılaştırıldığında yöntemler arasındaki relatif doğruluk %92,30, duyarlılık %100 ve özgünlük %90 değerlerinde bulundu. İki yöntem arasındaki uyumun güvenilirliğini ölçen Cohen'in kappa (κ) katsayısı 0,81 olarak belirlendi. Bu sonuç, her iki test arasındaki uyumun neredeyse mükemmel (0,81-1,00) olduğu şeklinde yorumlandı (Tablo 10).

Tablo 5. Karkas ve dışkılarından alınan örneklere ait bilgi tablosu

Örnekleme Dönemi	Parti No	Tarih	Kesim Yeri	Hayvan Sayısı	Örnek Türü	Örnek Sayısı
1. Dönem						
	1	15.04.2013	Kombina	5	Karkas ve dışkı	10
	2	29.04.2013	Kombina	5	Karkas ve dışkı	10
	3	06.05.2013	Kombina	7	Karkas ve dışkı	14
	4	13.05.2013	Kombina	10	Karkas ve dışkı	20
	5	20.05.2013	Kombina	10	Karkas ve dışkı	20
	6	03.06.2013	Mezbaha	4	Karkas ve dışkı	8
	7	17.06.2013	Kombina	10	Karkas ve dışkı	20
Ara Toplam				51		102
2. Dönem						
	8	15.07.2013	Kombina	10	Karkas ve dışkı	20
	9	18.11.2013	Kombina	5	Karkas ve dışkı	10
	10	25.11.2013	Kombina	5	Karkas ve dışkı	10
	11	20.01.2014	Kombina	7	Karkas ve dışkı	14
Ara Toplam				27		54
3. Dönem						
	12	17.03.2014	Mezbaha	4	Karkas ve dışkı	8
	13	24.03.2014	Mezbaha	3	Karkas ve dışkı	6
	14	19.05.2014	Mezbaha	5	Karkas ve dışkı	10
	15	09.06.2014	Mezbaha	10	Karkas ve dışkı	20
Ara Toplam				22		44
Toplam				100		200

Tablo 6. Karkas örneklerinde ISO 6579 yöntemi ile *Salmonella* spp. izolasyon ve identifikasyonuna ait sonuçlar

ISO 6579											
Örnek No	Örnek Adı	İzolasyon					İdentifikasyon			Sonuç	
		MK-XLD	MK-BS	RV-XLD	RV-BS	MC	İzolat Adı/Nosu	Biyokimyasal	API 20E		
1	K1	+	+	-	-	MX	-				
						MB	+	K1-MB/1	-	-	-
2	K2	+	-	-	-	MX	+	K2-MX/2	+	-	-
3	K3	-	+	+	+	MB	+	K3-MB/3	-	-	-
						RX	+	K3-RX/4	-	-	-
						RB	-				
4	K4	-	+	+	+	MB	-				
						RX	+	K4-RX/5	-	-	-
						RB	+	K4-RB/6	-	-	-
5	K5	-	+	-	-	MB	-				
6	K6	-	-	+	-	RX	-				
7	K7	+	+	-	+	MX	-				
						MB	-				
						RB	-				
8	K8	+	+	-	-	MX	-				
						MB	-				
9	K9	+	+	+	-	MX	-				
						MB	-				
						RX	+	K9-RX/7	-	-	-
10	K10	-	-	-	+	RB	+	K10-RB/8	-	-	-
11	K11	-	+	-	-	MB	+	K11-MB/9	-	-	-
12	K12	-	-	-	-						
13	K13	-	-	-	-						

ISO 6579										
Örnek No	Örnek Adı	İzolasyon					İdentifikasyon			
		MK-XLD	MK-BS	RV-XLD	RV-BS	MC	İzolat Adı/Nosu	Biyokimyasal	API 20E	Sonuç
14	K14	-	-	-	-					
15	K15	-	+	-	-	MB	-			
16	K16	+	-	-	-	MX	-			
17	K17	-	-	-	-					
18	K18	-	-	-	-					
19	K19	-	+	-	+	MB	-			
						RB	-			
20	K20	-	-	-	-					
21	K21	-	-	-	-					
22	K22	-	-	-	-					
23	K23	-	-	-	-					
24	K24	-	+	-	-	MB	-			
25	K25	-	-	-	-					
26	K26	-	-	-	-					
27	K27	-	+	-	-	MB	-			
28	K28	+	-	-	+	MX	-			
						RB	-			
29	K29	-	-	-	-					
30	K30	-	-	-	-					
31	K31	-	-	-	-					
32	K32	-	-	-	+	RB	+	K32-RB/10	-	-
33	K33	-	-	-	-					
34	K34	-	-	-	-					
35	K35	-	-	-	+	RB	-			
36	K36	-	-	-	-					

ISO 6579											
Örnek No	Örnek Adı	İzolasyon						İdentifikasyon			
		MK-XLD	MK-BS	RV-XLD	RV-BS	MC	İzolat Adı/Nosu	Biyokimyasal	API 20E	Sonuç	
37	K37	+	-	-	-	MX	-				
38	K38	-	-	-	-						
39	K39	-	-	-	+	RB	-				
40	K40	-	-	-	-						
41	K41	-	-	-	-						
42	K42	-	-	-	-						
43	K43	-	+	-	-	MB	-				
44	K44	-	-	-	-						
45	K45	-	-	-	-						
46	K46	-	-	-	-						
47	K47	+	-	-	-	MX	-				
48	K48	-	-	-	-						
49	K49	-	-	-	-						
50	K50	-	-	-	-						
51	K51	-	-	-	-						
52	K52	+	+	-	-	MX	+	K52-MX/11	-	-	-
						MB1	+	K52-MB1/12	-	-	-
						MB2	+	K52-MB2/13	-	-	-
53	K53	+	-	+	+	MX	+	K53-MX/14	+	+	+
						RX	+	K53-RX/15	+	+	
						RB	+	K53-RB/16	+	+	

ISO 6579											
Örnek No	Örnek Adı	İzolasyon						İdentifikasyon			
		MK-XLD	MK-BS	RV-XLD	RV-BS	MC	İzolat Adı/Nosu	Biyokimyasal	API 20E	Sonuç	
54	K54	-	-	-	-				+	-	-
55	K55	-	-	-	-						
56	K56	-	+	-	-	MB	+	K56-MB/17			
57	K57	-	+	-	-	MB	+	K57-MB/18	+	-	-
58	K58	-	-	-	-						
59	K59	-	-	-	-						
60	K60	-	-	-	-						
61	K61	-	+	+	+	RX	+	K61-RX/19	+	+	+
						RX2	+	K61-RX2/20	+	+	
						RB	+	K61-RB/21	+	+	
						RB2	+	K61-RB2/22	+	+	
62	K62	-	-	-	-						
63	K63	-	-	-	-						
64	K64	-	-	-	+	RB	-				
65	K65	-	-	-	-						
66	K66	+	-	-	-	MX	-				
67	K67	-	-	-	-						
68	K68	-	-	-	-						
69	K69	-	-	-	-						
70	K70	-	-	-	-						
71	K71	-	-	-	-						
72	K72	-	-	-	-						

ISO 6579											
Örnek No	Örnek Adı	İzolasyon						İdentifikasyon			
		MK-XLD	MK-BS	RV-XLD	RV-BS	MC	İzolat Adı/Nosu	Biyokimyasal	API 20E	Sonuç	
73	K73	+	+	-	-	MX	+	K73-MX/23	-	-	-
						MB	+	K73-MB/24	-	-	-
74	K74	-	+	-	+	MB	+	K74-MB/25	-	-	-
						RB	+	K74-RB/26	-	-	-
75	K75	-	-	-	-						
76	K76	-	-	-	-						
77	K77	-	-	-	-						
78	K78	-	-	-	-						
79	K79	-	-	-	-						
80	K80	-	-	-	-						
81	K81	+	-	+	-	MX	+	K81-MX/27	-	-	-
						RX	+	K81-RX/28	-	-	-
82	K82	-	-	-	-						
83	K83	-	-	-	-						
84	K84	-	+	-	-	MB	-				
85	K85	-	-	-	-						
86	K86	-	-	-	-						
87	K87	-	-	-	-						
88	K88	-	-	-	-						
89	K89	-	-	-	-						
90	K90	-	-	-	-						
91	K91	-	-	-	-						

ISO 6579										
Örnek No	Örnek Adı	İzolasyon					İdentifikasyon			
		MK-XLD	MK-BS	RV-XLD	RV-BS	MC	İzolât Adı/Nosu	Biyokimyasal	API 20E	Sonuç
92	K92	-	-	-	-					
93	K93	-	-	-	-					
94	K94	-	-	-	-					
95	K95	-	-	-	-					
96	K96	-	-	-	-					
97	K97	-	-	-	-					
98	K98	-	-	-	-					
99	K99	-	-	-	-					
100	K100	-	-	-	-					
Toplam	100									2 pozitif

Tablo 7. Dışkı örneklerinde ISO 6579/A1 yöntemi ile *Salmonella* spp. izolasyon ve identifikasyonuna ait sonuçlar

		ISO 6579/A1								
Örnek No	Örnek Adı	İzolasyon				İdentifikasyon			Sonuç	
		MsR-XLD	MsR-XLT4	MsR-BS	MC	İzolat Adı/Nosu	Biyokimyasal	API 20E		
1	D1	-	-	-						
2	D2	-	-	+	MsRB	+	D2-MsRB/29	-	-	-
3	D3	-	-	-						
4	D4	-	-	+	MsRB	-				
5	D5	-	-	+	MsRB	+	D5-MsRB/30	-	-	-
6	D6	+	-	-	MsRX	-				
7	D7	+	-	-	MsRX	-				
8	D8	-	-	-						
9	D9	-	-	-						
10	D10	-	-	-						
11	D11	-	-	-						
12	D12	-	-	-						
13	D13	-	-	-						
14	D14	-	-	-						
15	D15	-	-	-						
16	D16	-	-	-						
17	D17	-	-	-						
18	D18	-	-	-						
19	D19	-	-	-						
20	D20	+	-	-	MsRX	-				
21	D21	-	-	-						
22	D22	-	-	-						

ISO 6579/A1									
Örnek No	Örnek Adı	İzolasyon				İdentifikasyon			
		MsR-XLD	MsR-XLT4	MsR-BS	MC	İzolat Adı/Nosu	Biyokimyasal	API 20E	Sonuç
23	D23	-	-	-					
24	D24	-	-	-					
25	D25	-	-	-					
26	D26	-	-	-					
27	D27	-	-	-					
28	D28	-	-	-					
29	D29	-	-	-					
30	D30	-	-	-					
31	D31	-	-	-					
32	D32	-	-	-					
33	D33	-	-	-					
34	D34	-	-	-					
35	D35	-	+	-	MsRXT	+	D35-MsRXT/31	-	-
36	D36	+	-	-	MsRX1	+	D36-MsRX1/32	-	-
					MsRX2	+	D36-MsRX2/33	-	-
					MsRX3	+	D36-MsRX3/34	-	-
37	D37	+	-	-	MsRX	+	D37-MsRX/35	-	-
38	D38	-	-	-					
39	D39	-	-	-					
40	D40	-	-	+	MsRB	-			
41	D41	-	-	-					
42	D42	-	-	-					
43	D43	-	-	-					
44	D44	-	-	-					
45	D45	-	-	-					

ISO 6579/A1										
Örnek No	Örnek Adı	İzolasyon				İdentifikasyon				
		MsR-XLD	MsR-XLT4	MsR-BS	MC	İzolat Adı/Nosu	Biyokimyasal	API 20E	Sonuç	
46	D46	-	-	-						
47	D47	-	-	-						
48	D48	-	-	-						
49	D49	-	-	-						
50	D50	-	-	-						
51	D51	-	-	-						
52	D52	-	-	-						
53	D53	-	-	+	MsRB	+	D53-MsRB/36	+	-	-
54	D54	-	-	+	MsRB	-				
55	D55	+	-	-	MsRX	+	D55-MsRX/37	-	-	-
56	D56	-	-	-						
57	D57	-	-	-						
58	D58	-	-	-						
59	D59	-	-	+	MsRB	-				
60	D60	-	-	-						
61	D61	-	-	-						
62	D62	-	-	-						
63	D63	-	-	-						
64	D64	-	-	-						
65	D65	-	-	-						
66	D66	-	-	-						
67	D67	-	-	-						
68	D68	-	-	-						
69	D69	-	-	-						
70	D70	-	-	-						

ISO 6579/A1									
Örnek No	Örnek Adı	İzolasyon				İdentifikasyon			Sonuç
		MsR-XLD	MsR-XLT4	MsR-BS	MC	İzolat Adı/Nosu	Biyokimyasal	API 20E	
71	D71	-	-	-					
72	D72	-	-	-					
73	D73	-	-	+	MsRB	+	D73-MsRB/38	+	+
74	D74	-	-	-					
75	D75	-	-	-					
76	D76	-	-	-					
77	D77	-	-	-					
78	D78	-	-	-					
79	D79	-	-	-					
80	D80	-	-	-					
81	D81	-	-	-					
82	D82	-	-	-					
83	D83	-	-	-					
84	D84	-	-	-					
85	D85	-	-	-					
86	D86	-	-	-					
87	D87	-	-	-					
88	D88	-	-	-					
89	D89	-	-	-					
90	D90	-	-	-					
91	D91	-	-	-					
92	D92	-	-	-					
93	D93	-	-	-					
94	D94	-	-	-					
95	D95	-	-	-					

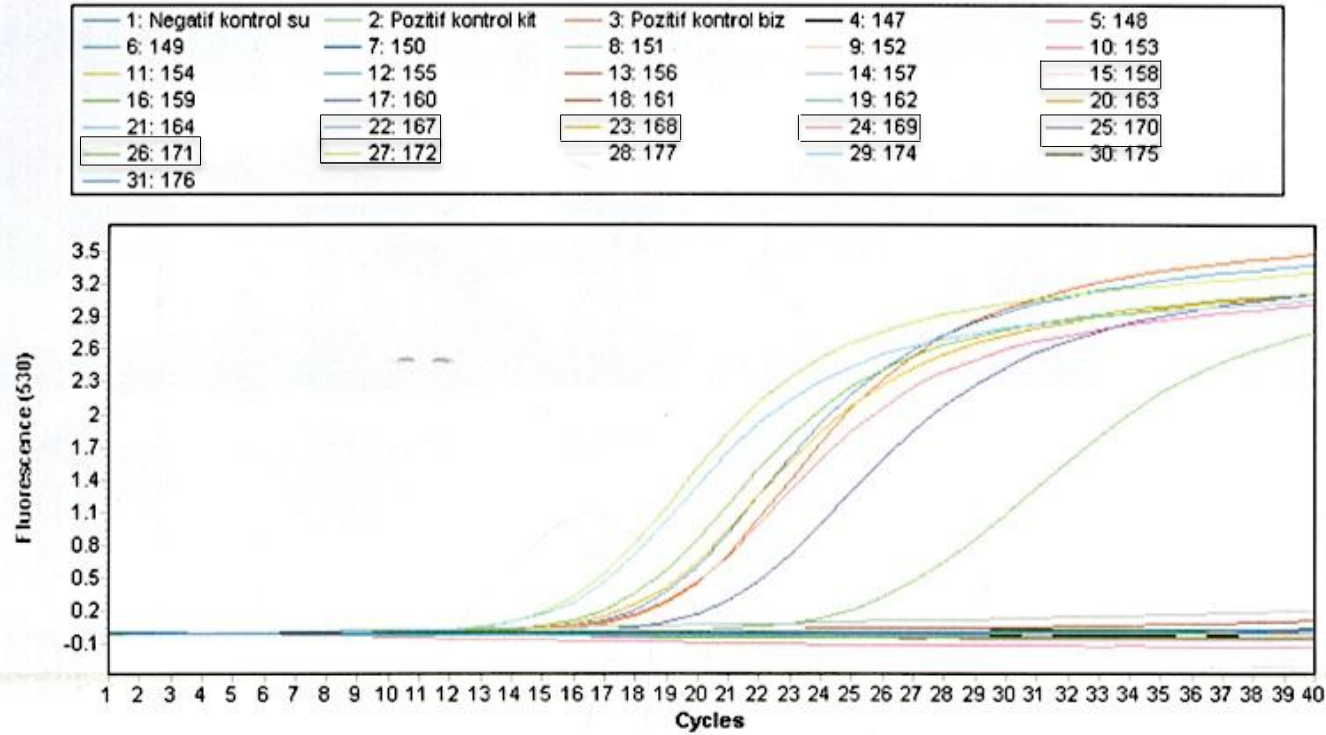
ISO 6579/A1										
Örnek No	Örnek Adı	İzolasyon				İdentifikasyon			Sonuç	
		MsR-XLD	MsR-XLT4	MsR-BS	MC	İzolat Adı/Nosu	Biyokimyasal	API 20E		
96	D96	-	-	-						
97	D97	-	-	+	MsRB	+	D97-MsRB/39	+	+	+
98	D98	-	-	-						
99	D99	-	-	-						
100	D100	-	-	-						
Toplam	100									2 pozitif

Tablo 8. Karkas ve dışkı örneklerinden elde edilen *Salmonella* spp. şüpheli izolatlara ait ISO ve r-PCR sonuçları

Örnek Tipi	İzolat No	İzolat Adı	ISO	r-PCR
	1	K1-MB	-	-
	2	K2-MX	-	-
	3	K3-MB	-	-
	4	K3-RX	-	-
	5	K4-RX	-	-
	6	K4-RB	-	-
	7	K9-RX	-	-
	8	K10-RB	-	-
	9	K11-MB	-	-
	10	K32-RB	-	-
	11	K52-MX	-	-
	12	K52-MB1	-	-
	13	K52-MB2	-	-
	14	K53-MX	+	+
	15	K53-RX	+	+
	16	K53-RB	+	+
	17	K56-MB	-	-
	18	K57-MB	-	-
	19	K61-RX	+	+
	20	K61-RX2	+	+
	21	K61-RB	+	+
	22	K61-RB2	+	+
	23	K73-MX	-	+
	24	K73-MB	-	+
	25	K74-MB	-	-
	26	K74-RB	-	-
	27	K81-MX	-	+
	28	K81-RX	-	-
Karkas	28	Ara toplam	7 pozitif	10 pozitif
	29	D2-MsRB	-	-
	30	D5-MsRB	-	-
	31	D35-MsRXT	-	-
	32	D36-MsRX1	-	-
	33	D36-MsRX2	-	-
	34	D36-MsRX3	-	-
	35	D37-MsRX	-	-
	36	D53-MsRB	-	-
	37	D55-MsRX	-	-
	38	D73-MsRB	+	+
	39	D97-MsRB	+	+
Dışkı	11	Ara toplam	2 pozitif	2 pozitif
	39	TOPLAM	9 pozitif	12 pozitif

User Developed or Modified Test Method

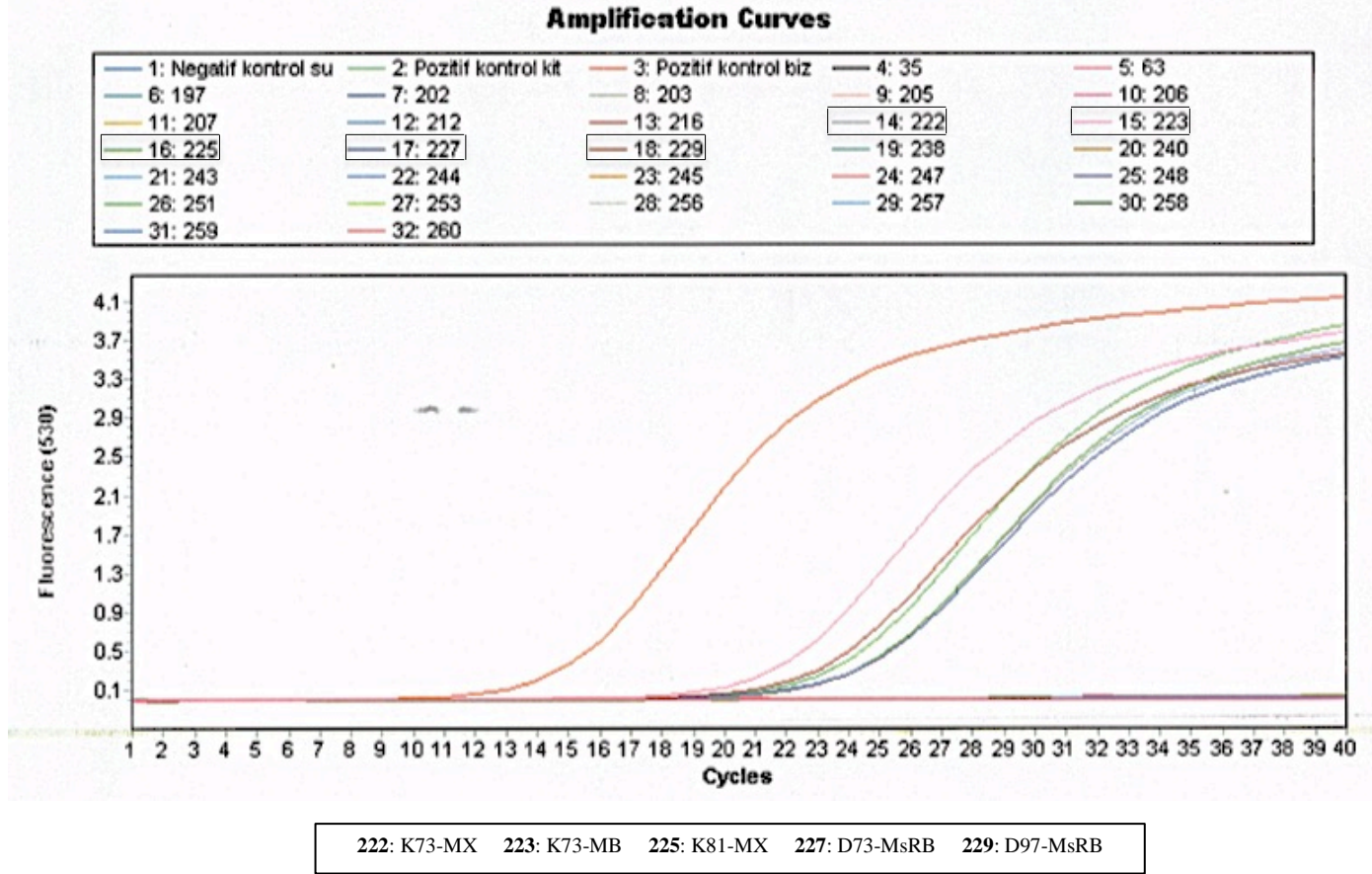
Amplification Curves



158: K53-MX 167: K53-RX 168: K53-RB 169: K61-RX 170: K61-RX2 171: K61-RB 172: K61-RB2

Şekil 5. Pozitif K53 ve K61 nolu karkas örneklerinin amplifikasyon eğrilerini içeren *Salmonella* spp. spesifik r-PCR grafiği

User Developed or Modified Test Method



Şekil 6. Pozitif K73, K81, D73, D97 nolu karkas ve dışkı örneklerinin amplifikasyon eğrilerini içeren *Salmonella* spp. spesifik r-PCR grafiği

Tablo 9. Karkas ve dışkı örneklerinden elde edilen *Salmonella* spp. izolatlarına ait serogruplandırma ve serotiplendirme aşamaları ve sonuçları

Serogruplandırma					Serotiplendirme					
Örnek Tipi	İzolat Adı/Nosu	Polivalan Antiserum	Grup Faktör Antiserum	Somatik (O) Antijen	Spicer-Edwards Antiserum	Flagellar (H) Antijen	Kompleks Antiserum	Single Faktör Antiserum	Flagellar (H) Antijen	Serovar
						Faz 1			Faz 2	
Karkas	K53-MX/14	Poly A	B	<u>1</u> , 4, [5], 12	1	i	1 Kompleks	2	1, 2	Typhimurium O:4
	K53-RX/15	Poly A	B	<u>1</u> , 4, [5], 12	1	i	1 Kompleks	2	1, 2	Typhimurium O:4
	K53-RB/16	Poly A	B	<u>1</u> , 4, [5], 12	1	i	1 Kompleks	2	1, 2	Typhimurium O:4
	K61-RX/19	Poly A	B	<u>1</u> , 4, [5], 12	1	i	1 Kompleks	2	1, 2	Typhimurium O:4
	K61-RX2/20	Poly A	B	<u>1</u> , 4, [5], 12	1	i	1 Kompleks	2	1, 2	Typhimurium O:4
	K61-RB/21	Poly A	B	<u>1</u> , 4, [5], 12	1	i	1 Kompleks	2	1, 2	Typhimurium O:4
	K61-RB2/22	Poly A	B	<u>1</u> , 4, [5], 12	1	i	1 Kompleks	2	1, 2	Typhimurium O:4
Serogruplandırma					Serotiplendirme					
Dışkı	İzolat Adı/Nosu	Polivalan Antiserum	Grup Faktör Antiserum	Somatik (O) Antijen	Spicer-Edwards Antiserum	Kompleks Antiserum	Diğer H Antiserum	Flagellar (H) Antijen		Serovar
								Faz 1	Faz 2	
	D73-MsRB/38	Poly A	D1	<u>1</u> , 9, 12	1 ve 4	G Kompleks	m	g, m	-	Enteritidis O:9
Serogruplandırma					Serotiplendirme					
	İzolat Adı/Nosu	Polivalan Antiserum	Grup Faktör Antiserum	Somatik (O) Antijen	Spicer-Edwards Antiserum	Kompleks Antiserum	Diğer H Antiserum	Flagellar (H) Antijen		Serovar
								Faz 1	Faz 2	
	D97-MsRB/39	Poly B	C ₂ -C ₃	8, [20]	3	Z ₄ Kompleks	Z ₂₄	Z ₄ , Z ₂₄	-	Albany O:8

Tablo 10. *Salmonella* spp. spesifik r-PCR yönteminin relatif doğruluk, duyarlılık ve özgünlük sonuçları

Referans Metot		Alternatif Metot		Doğruluk (%)	Duyarlılık (%)	Özgünlük (%)	κ
ISO		r-PCR					
Pozitif	Negatif	Yanlış _{negatif}	Yanlış _{pozitif}				
9	27	0	3	92,30	100	90	0,81

κ: Cohen kappa katsayısı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çeşitli ülkelerde ve ülkemizde kasaplık sığırlardaki *Salmonella* prevalansı ile serotip dağılımının araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen karkas ve dışkı prevalans oranları ve serotip dağılımları ile çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular karşılaştırılarak tartışılmıştır.

5.1. Karkas Örneklerinde Bulunan *Salmonella* spp. Prevalansı ve Serotipleri

Çalışmamızda Tablo 5’de sunulduğu şekilde alınan ve *Salmonella* spp. yönünden incelenen 100 karkas örneğinin 2’sinin (%2) pozitif olduğu belirlenmiştir (Tablo 6). Bunlardan K53 örneğinin izolasyonunda kullanılan farklı besi yerlerinden elde edilen 3 ayrı izolatın (K53-MX, K53-RX, K53-RB) yapılan geleneksel serotiplendirme sonrasında *S. Typhimurium* olduğu bulunmuştur. Diğer *Salmonella* pozitif olan K61 örneğine ait 4 izolatın da (K61-RX, K61-RX2, K61-RB, K61-RB2) benzer bir şekilde *S. Typhimurium* olduğu tespit edilmiştir (Tablo 9).

Fegan ve ark. (2005), Avusturalya’da kesimhanelerde soğutma öncesi ve soğutma sonrası sığır karkaslarındaki *Salmonella* varlığının IMS ile güçlendirilmiş geleneksel kültür yöntemi kullanılarak karşılaştırılması amacı ile yaptıkları çalışma sonucunda, 100 adet soğutma öncesi karkas örneğinin 2 adedinde (%2), 100 adet soğutma sonrası karkas örneğinin ise 3 (%3)’ünde *Salmonella* spp. izole etmişlerdir. Geleneksel serotiplendirme, faj tipendirme ve PFGE ile yapılan serotiplendirme sırasında, *S. Bredeney*, *S. Give*, *S. Mbandaka* ve *S. Muenchen* serovarlarını belirlemişlerdir.

Bohaychuck ve ark. (2011)’nin Kanada’da sığır karkaslarında *Salmonella* prevalansını inceledikleri çalışmalarında, USDA/FSIS metodu kullanılarak yapılan izolasyon sonrasında, inceledikleri 1036 adet karkas örneğinin 1 (%0,1) tanesinde *Salmonella* spp. izole ettiklerini rapor etmişlerdir.

Aynı yıl, Brichta-Harhay ve ark. (2011)’nin Amerika Birleşik Devletleri’nde de yaptıkları çalışmada, iç organ çıkarma öncesi ve sonrası aşamalarından alınan karkas örneklerinde *Salmonella* prevalansı (IMS ve selektif zenginleştirme sonrası PCR ile) sırasıyla %50,2 ve %0,8 olarak bulunmuştur. İzole edilen salmonellaların PFGE ile tiplendirilmesi sonucunda, *Salmonella enterica* serovarlarını *S. Newport*

(%53,1), *S. Typhimurium* (%16,6), *S. Uganda* (%10,9), *S. Agona* (%5,9), *S. Anatum* (%4,2), *S. Reading* (%3,3) ve *S. Dublin* (%1,4) olarak identifiye etmişlerdir.

Sibhat ve ark. (2011) benzer amaçla yaptıkları çalışmalarında, svap yöntemi ile topladıkları 100 karkas örneğini ISO konvansiyonel kültür metodu kullanarak analiz etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda, pozitif olarak buldukları 2 örnekten (%2) izole edilen salmonellaların serotiplerini *S. Eastbourne* ve *S. Urbane* olarak bildirmişlerdir.

Alemu ve Zewde (2012) tarafından gerçekleştirilen bir diğer araştırmada, 186 karkas örneği ISO 6579 metodu kullanılarak test edilmiş ve *Salmonella* prevalansı %4,8 olarak belirlenmiştir.

Polonya'da 2013 yılında yapılan çalışmada ISO 6579 metodu kullanılarak incelenen 406 adet sığır karkasının 5'inde %1,2 oranında *Salmonella* bulmuşlardır. Bulunan *Salmonella* spp.'lerin PFGE ile serotiplendirilmeleri sonrasında, *S. Schleissheim* (%4), *S. Enteritidis* (%4) ve *S. Typhimurium* (%2) olarak belirlemişlerdir (Wieczorek ve Osek, 2013).

İrlanda'da 2014 yılında, sığırlardaki *Salmonella* prevalansı ve özelliklerinin incelendiği çalışmada, 400 karkas örneğinin 1'inde (%0,25) *Salmonella* tespit edilmiş olup bu izolatin tiplendirilmesi sonrasında *S. Dublin* olduğu rapor edilmiştir (Khen ve ark., 2014).

Dong ve ark. (2014), Çin'de 4 kesimhaneden topladıkları sığır karkaslarında *Salmonella* prevalansı ve profilini IMS ile güçlendirilmiş geleneksel kültür yöntemi kullanılarak araştırdıkları çalışmalarında, %1,3 oranında izole edilen salmonellaların konvansiyonel serotiplendirilmesi ile tümünün *S. Agona* olduğunu bildirmişlerdir.

Aynı yıl içerisinde Pacheco da Silva ve ark. (2014), Brezilya'da kesimhanelerden alınan sığır karkaslarında *Salmonella* varlığını araştırmışlar ve *Salmonella* izolasyon oranını ISO 6579 ile %3,3 olarak tespit etmişlerdir. Bu izolatların geleneksel yöntem ile serotiplendirilmesi sonucunda *S. Newport* (%50), *S. Saintpaul* (%33,3) ve *S. Anatum* (%16,7) serovarlarını saptamışlardır.

2016'da Amerika Birleşik Devletleri'nde Stipetic ve ark., (2016) gıda patojenlerinin hayvanlardaki taşıyıcılığı ile ilgili yapılan diğer bir çalışmada, sığır karkaslarında %2 oranında BAX sistemi ile tespit ettikleri salmonellaların geleneksel serotiplendirme kullanılarak *S. Typhimurium* olduğu belirlenmiştir.

Ülkemizdeki mezbahalarda kesilen sığır karkaslarındaki *Salmonella* kontaminasyonu ve serotip dağılımını belirlemek üzere Küplülü (1999)'nün yaptığı çalışmada, Ankara ve çevresinde 3 ayrı mezbahadaki 180 sığır karkas örneği (3 farklı bölgeden olmak üzere toplam 540 svap örneği) *Salmonella* spp. yönünden analiz edilmiştir. Sonuç olarak örneklerin 9'u (%5) *Salmonella* pozitif olarak bulunmuştur. Ayrıca karkaslardan elde edilen tüm izolatlardan *S. Anatum* serotipi identifiye edilmiştir.

Ülkemizdeki sığır kesimhanelerinde karkas kalitesinin ve *Salmonella* spp. varlığının araştırıldığı çalışmalardan Alisharlı ve ark., (2001) Van bölgesindeki mezbahalardan elde edilen sığır karkaslarından %2 oranında *Salmonella* spp. izole etmiştir.

Çalıcıoğlu ve ark. (2005)'nin Elazığ'da karkas yüzey kontaminasyonunun belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, sığır karkaslarından eksizyon yöntemi ile aldıkları toplam 44 adet örneği *Salmonella* varlığı yönünden analiz etmişler ve sonuç olarak örneklerin hiç birinde (%0) *Salmonella* izole edilmediğini bildirmişlerdir.

Benzer şekilde *Salmonella* prevalansının nispeten daha yüksek bulunduğu çalışmalardan birinde, 2002 yılında Ransom ve ark. (2002), Amerika Birleşik Devletleri'nde sünger metodu ile elde ettikleri 120 karkas örneğini FDA-BAM metodu kullanarak *Salmonella* spp. yönünden analiz etmişlerdir. İncelenen örneklerin 2 tanesinde (%6,7) *Salmonella* spp. izole edildiğini bildirmişlerdir.

Aynı ülkede bir başka araştırmacı grubu tarafından 2007 yılında, FDA-BAM metodu kullanılarak karkastan svap ile alınan örneklerden *Salmonella* spp. analizi sonucunda örneklerin % 8,3'ünün *Salmonella* yönünden pozitif olduğu bulunmuştur. Geleneksel serotiplendirme sonrasında bulunan serovarlar en yüksek orandan en düşük orana doğru *S. Munster* (%27,4), *S. Cerro* (%18,6), *S. Montevideo* (%13,7), *S. Kentucky* (%12,7), *S. Anatum* (%4,9), *S. Mbdanka* (%2,9), *S. Muenchen* (%1) şeklinde belirtilmiştir (Fluckey ve ark., 2007).

Meksikada yapılan Perez-Montano ve ark. (2012)'nin çalışmasında ise USDA/FSIS protokolü kullanarak test edilen 505 sığır karkas örneğinin %15,4 oranında *Salmonella* spp. taşıdığı ve geleneksel serotiplendirme ile izolatların *S. Give* (%24,4), *S. Typhimurium* (%17,9) olduğu, kalan izolatların ise (%14,1) B serogrubu içerisinde yer aldığı rapor edilmiştir.

Aynı ülkede bir yıl sonra, Varela-Guerrero ve ark. (2013)'nin izolasyon ve identifikasyonunda Mexican Official Standart NOM-114-SSA1-1994'ı ve ayrıca hızlı tanıda multipleks PCR'ı kullanarak yaptıkları araştırmalarında, 327 sığır karkasının 27'sinde (%8,3) *Salmonella* spp. tespit edilmiştir.

Prevalans çalışmaları içerisinde karkas *Salmonella* oranının oldukça yüksek bulunduğu çalışmalardan 2013 yılında Meksika'da başka bir araştırmacı grubu tarafından kesimhanelerdeki sığırlara ait örneklerdeki salmonellaların bulunuşu ve serotip dağılımının incelenmesi amacı ile, 68 sığır karkas örneğinin 18 adedinin (%26,5) *Salmonella* spp. ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Karkas örneklerinden elde edilen izolatların moleküler tiplendirmesinin PFGE ile yapıldığı bu çalışmada, 18 izolatın 12 adedinin *S. Kentucky* (%66), 3 adedinin *S. Anatum* (%16), 1 adedinin *S. Reading* (%5), 1 adedinin ise *S. Meleagridis* (%5) olarak tiplendirildiği, 1 izolatın da tiplendirilemediği rapor edilmiştir (Gragg ve ark., 2013).

Maradiga ve ark. (2015), Honduras'da sığır karkaslarında *Salmonella* prevalansını kapalı platform PCR sistemi kullanarak %7,8 oranında bulmuşlar ve en yaygın serovar olarak *S. Typhimurium* ve bunu takiben *S. Derby*'nin olduğunu rapor etmişlerdir.

2016 yılında Madoraba ve ark. (2016), Güney Afrika'da kasaplık sığırlarda *Salmonella* kontaminasyonu ve serovarlarını araştırdıkları çalışmada, 100 karkas örneğinin 30'unda (%30) *Salmonella*'yı pozitif olarak bulmuşlardır. *Salmonella* pozitif izolatlara yapılan geleneksel serotiplendirme ile her biri %1 oranında olmak üzere *S. Enteritidis*, *S. Cardoner*, *S. Mbandaka*, *S. Nigeria* ve *S. Seftenberg* serovarları saptanmıştır.

Ülkemizde Ege bölgesi mezbahalarında 1995'te svap kullanarak alınan 139 adet karkas rneğinde, *Salmonella* prevalansı %20,8 olarak belirlenmiştir (Altuğ ve ark., 1995).

Sığır karkaslarında *Salmonella* varlığı ile ilgili ülkemizde ve diğer ülkelerde yapılan prevalans çalışmaları içerisinde Fegan ve ark. (2005), Sibhat ve ark. (2011), Stipetic ve ark. (2016) ile Alişarlı ve ark. (2001) tarafından bildirilen sonuçlar (%2) çalışmamızda elde edilen bulgu (Tablo 6) ile tam bir uyum göstermektedir. Bununla birlikte bulgularımızdan farklı olarak en az %0 ve en çok %30 aralığında değişen oranlarda *Salmonella* bulunduğunu bildiren birçok çalışma ile de bulgumuz uyum

göstermemektedir (Alemu ve Zewde, (2012); Altuğ ve ark., 1995; Bohaychuck ve ark., 2011; Brichta-Harhay ve ark., 2011; Çalıcıoğlu ve ark., 2005; Dong ve ark., 2014; Fluckey ve ark., 2007; Gragg ve ark., 2013; Khen ve ark., 2014; Küplülü, 1999; Madoraba ve ark., 2016; Maradiga ve ark., 2015; Pacheco da Silva, 2014; Perez-Montano ve ark., 2012; Ransom ve ark., 2002; Wieczorek ve Osek, 2013; Varela-Guerrero ve ark., 2013). Yapılan çalışmalar incelendiğinde prevalans oranlarındaki bu farklılıkların temel olarak; örnek sayısı, örnekleme yapılan kesimhanelerdeki hijyen uygulamalarının etkinliği, *Salmonella*'nın sığır karkaslarından elde edilmesinde kullanılan örnek alma, izolasyon ve identifikasyon metotlarındaki değişkenlik (geleneksel kültür yöntemlerinin kendi içlerindeki farklılıklar veya hızlı tanı yöntemlerinin kullanımı) ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda 2 *Salmonella* spp. pozitif karkas örneğine (K53 ve K61) ait farklı besi yerlerinden elde edilen 7 izolatın geleneksel serotiplendirme sonrasında tümünün *S. Typhimurium* olduğu bulunmuştur (Tablo 9). Diğer araştırmacılar tarafından yapılan *Salmonella* serotip/serovarlarının incelendiği çalışmalar değerlendirildiğinde, *S. Typhimurium*'u en prevalan serotiplerden biri olarak rapor eden Brichta-Harhay ve ark. (2011), Montano ve ark. (2012), Perez- Maradiga ve ark. (2015), Stipetic ve ark. (2016) ve Wieczorek ve Osek (2013)'in bulguları ile uyum göstermektedir. Bulgularımızdan farklı olarak, sığır karkaslarında *S. Typhimurium* dışında en yaygın olarak rapor edilen serovarlar; *S. Anatum*, *Mbdanka*, *Give*, *Muenchen*, *Newport*, *Agona*, *Reading*, *Dublin*, *Enteritidis*, *Kentucky* olup bunlardan daha az olarak; *Bredeney*, *Uganda*, *Eastbourne*, *Urbane*, *Saintpaul*, *Muenster*, *Cerro*, *Montevideo*, *Derby*, *Meleagridis*, *Cardoner*, *Schleissheim*, *Nigeria* ve *Seftenberg* şeklinde belirtilmiştir (Dong ve ark., 2014; Fegan ve ark., 2005; Fluckey ve ark., 2007; Gragg ve ark., 2013; Khen ve ark., 2014; Küplülü, 1999; Madaroba ve ark., 2016; Pacheco da Silva, 2015; Sibhat ve ark., 2011). Çalışmalarda rapor edilen serovar farklılıklarının; özellikle örnek olarak kullanılan canlı hayvana ait kontrol edilemeyen parametrelere (ırk, yaş, yetiştirme yöntemi, besleme, aşılama, taşıyıcılık gibi), örnek sayısına, örneklemenin yapıldığı coğrafi bölgelere, uygulanan *Salmonella* izolasyon ve identifikasyon metotları ile birlikte serovar identifikasyonunda kullanılan yöntemlerdeki farklılıklara (fenotipik ve genotipik

identifikasyon), testlerin özgünlük ile duyarlılığına bağlı olarak gözlemlendiği düşünülmektedir.

5.2. Dışkı Örneklerinde Bulunan *Salmonella* spp. Prevalansı ve Serotipleri

Çalışmamızda Tablo 5’de sunulduğu şekilde alınan ve *Salmonella* spp. yönünden incelenen 100 adet dışkı örneğinin 2 adedinin (%2) (D73, D97) pozitif olduğu belirlenmiştir (Tablo 7). Bunlardan D73 örneğine ait bir izolatın (D73-MsRB) *S. Enteritidis*, D97 örneğine ait diğer izolatın (D97-MsRB) ise *S. Albany* olduğu tespit edilmiştir (Tablo 9).

Madden ve ark. (2007)’nin Kuzey İrlanda’da sığır dışkılarında *Salmonella* prevalansını inceledikleri çalışmalarında, BS EN 12824:1998 ile ISO 6579 yöntemlerini kullanarak 220 adet sığır dışkı örneğinin 16 (%3)’sında *Salmonella* spp. izole etmişlerdir. Çalışmada elde edilen *Salmonella* izolatlarının 5’ini *S. Chandans* (%83,3) ve 1’ini *S. Liverpool* (%16,7) olarak konvansiyonel serotiplendirme ile tiplendirmişlerdir.

Büyük Britanya’da bir yıl sonra Milnes ve ark. (2008), sığır dışkılarında ISO 6579 metodu kullanarak %1,4 oranında *Salmonella* spp. izole etmişler ve konvansiyonel serotiplendirme ile belirlenen serovarları *S. Typhimurium*, *S. Mbandaka*, *S. Dublin*, *S. Derby* ve *S. London* olarak bildirmişlerdir.

Sibhat ve ark. (2011) Etiyopya’da gerçekleştirdikleri çalışmalarında, 100 adet sığır sekal örneğini ISO 6579 yöntemini kullanarak analiz etmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda örneklerin 6’sında (%6) *Salmonella* spp. tespit etmişlerdir. İzole edilen salmonellalar konvansiyonel serotiplendirme ile 2 adet *S. Anatum* (%33,3), 2 adet *S. Newport* (%33,3), 1 adet *S. Typhimurium* (%16,7), 1 adet *S. II 40:B:-* (%16,7) olarak tiplendirilmiştir.

2012 yılında Alemu ve Zewde (2012), ISO 6579 metodu kullanarak yaptıkları çalışmada, *Salmonella* prevalansını %5,9 olarak bildirmişlerdir. Bağırsak içeriğinden elde edilen izolatlardan konvansiyonel serotiplendirme ile 3 adedinin *S. Newport* (%27,3), 2 adedinin (%18,2) *S. Infantis*, 1’er adedinin *S. Typhimurium* (%9), *S. Haifa* (%9), *S. Heidelberg* (%9), *S. Mishmarhaemek* (%9) olduğunu ve 2 tanesinin ise tiplendirilemediğini (%18,2) belirlemişlerdir.

Avrupa ve ABD’deki araştırmacıların ortak bir şekilde aynı yıl içerisinde yaptıkları çalışmada, sağlıklı hayvanlardan alınan 1624 sığır bağırsak içeriği

örneğinde, *Salmonella* prevalansını %2 olarak bulmuşlardır (Anno de Jong ve ark. 2012).

İsveç'te yapılan *Salmonella* ile enfekte sığır sürülerinin coğrafi dağılımının konvansiyonel serotiplendirme ile araştırıldığı bir diğer çalışmada, 200 dışkı örneğindeki en yaygın *Salmonella* serovarını *S. Dublin* (%62), ikinci yaygın serovarı ise *S. Typhimurium* (%22,5) olarak bildirmişlerdir. (Lewerin ve ark., 2011).

Benzer bir şekilde Jiménez ve ark. (2011) Meksika'da, 120 tane asemptomatik sığırdan aldıkları taze dışkı örneklerinde konvansiyonel kültür yöntemi ile %32,5 oranında *Salmonella* spp. izole etmişlerdir. Bu izolatların serotiplendirilmesi ile en yaygın 3 serovarin *S. Give* (%17,9), *S. Minnesota* (%15,4) ve *S. Oranienburg* (%13) olduğunu rapor etmişlerdir.

Bir yıl sonra Navarro-Gonzalez ve ark. (2012)'nin İspanya'da sığır dışkılarında ISO 6579/A1:2007 metodu kullanarak yaptıkları izolasyon sonucunda *Salmonella* prevalansını %21,9 bulduklarını bildirmişlerdir. Elde edilen izolatların tiplendirilmesinde geleneksel ve faj tiplendirme kullanarak 10 izolatı *S. Anatum*, 4 izolatı *S. Meleagridis*, 1 izolatı *S. Othmarschen* olarak bulmuşlardır.

Gragg ve ark. (2013) kasaplık sığırlarda *Salmonella* çeşitliliğini araştırmak üzere 68 hayvana ait bağırsağın rektum-kolon kısmından dışkı örnekleri toplamışlar ve konvansiyonel kültür yöntemi ile *Salmonella* prevalansını %94,1 olarak tespit etmişlerdir. Elde edilen 18 adet *Salmonella* spp. izolatlarının geleneksel ve PFGE ile serotiplendirilmesi sonucunda, 12'si *S. Kentucky*, 3'ü *S. Anatum*, 1'i *S. Reading*, 1'i *S. Meleagridis* olarak tiplendirilirken, 1 izolat tiplendirilememiştir.

Çin'de 2014'de kesimhane hattında *Salmonella* prevalansı ve profilinin belirlenmesine yönelik çalışmalarında, dışkı örneklerindeki (70 adet) IMS ile güçlendirilmiş konvansiyonel kültür yöntemi ile *Salmonella* prevalansı %18,6 ve en dominant serovar konvansiyonel serotiplendirme kullanılarak *S. Agona* olarak bulunmuştur (Dong ve ark., 2014).

Bosilevac ve ark. (2015)'nin Suudi Arabistan'daki bir kesimhanede sığır dışkılarından aldıkları 206 örnekte *Salmonella* prevalansını % 11,2 olarak bildirmişlerdir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2011 yılında sığır dışkılarındaki konvansiyonel kültür yöntemi kullanarak belirledikleri *Salmonella* prevalansını 2016

yılında yayınladıkları araştırmalarında, Dargatz ve ark. (2016) %9,1 olarak ve geleneksel serotiplendirme ile en yaygın serovarları (%18,1) *S. Anatum*, (%17,2) *S. Montevideo*, (%15,2) *S. Kentucky*, (%6,7) *S. Idikan*, (%6,1) *S. Cerro* ve daha az oranda olmak üzere *S. Mbandaka*, *S. Meleagridis*, *S. Typhimurium*, *S. Muenster*, *S. Newport* şeklinde rapor etmişlerdir.

2016 yılında Madoraba ve ark. (2016), Güney Afrika'da kasaplık sığırlarda *Salmonella* kontaminasyonu ve serovarlarını araştırdıkları çalışmada, 400 dışkı ve 62 bağırsak içeriği örneğinde sırasıyla %2,75 ve %17,74 oranlarında *Salmonella*'yı pozitif bulmuşlardır. *Salmonella* pozitif izolatları yapılan geleneksel serotiplendirme ile serotiplendirilebilen dışkı izolatlarının tümünün *S. Enteritidis*, bağırsak içeriğine ait izolatların ise en dominant *S. Enteritidis* (%36,4) daha az sıklıkta olmak üzere *S. Aberdeen*, *S. Hayindongo*, *S. Heidelberg* ve *S. Ottmarchen* serovarları saptanmıştır.

Ülkemizde konu ile ilgili yapılan çalışmalardan birinde, Akbarut (1997) sığırlardan aldığı 119 adet dışkı ve 75 adet rektal svap örneğinde, *Salmonella* spp. izole edilmediğini bildirmiştir.

Küplülü (1996)'nün Ankara ve çevresinde 3 ayrı mezbahadaki 180 sığır bağırsak içeriği örneğini *Salmonella* kontaminasyonu ve serotip dağılımını belirlemek üzere yaptığı geleneksel kültür yöntemini kullandığı çalışmada, örneklerin 26'sını (%14,4) *Salmonella* pozitif olarak bulmuştur. Konvansiyonel serotiplendirme ile bu izolatların 14'ü (%53,8) *S. Anatum*, 8'i (%30,8) *S. Typhimurium* ve 4'ü (%15,4) *S. Telaviv* olduğu bulunmuştur.

Genç (2002) tarafından Kars'ta yapılan çalışmada; 250 adet sığır dışkısının 3 adetinde (%1,2) *Salmonella* spp. izole edilmiştir. İzole edilen suşların *S. Enteritidis* oldukları rapor edilmiştir.

2007 yılında Canpolat (2007) tarafından çeşitli hayvan dışkılarında *Salmonella* etkenlerinin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle saptanması amacıyla yapılan çalışmada, Ankara bölgesine ait mezbahalardan aldıkları 106 adet sığır dışkı örneğinden 1 adet örneğin (%0,94) *Salmonella* yönünden pozitif ve bu izolatın B serogrubuna ait olduğu bildirilmiştir.

2016 yılında Aden (2016) tarafından farklı illerdeki sığır ve koyunlarda *Salmonella* serotiplerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, mezbahalardan

aldıkları 196 adet sığır dışkı örneğinden 11 adet örneğin (%0,55) *Salmonella* spp. yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir.

Sığır dışkılarında *Salmonella* varlığı ile ilgili ülkemizde ve diğer ülkelerde yapılan prevalans çalışmaları içerisinde Anno de Jong ve ark. (2012) tarafından bildirilen sonuç (%2) ile çalışmamızda elde edilen bulgu (Tablo 7) tam bir uyum göstermektedir. Bununla birlikte bulgularımızdan farklı olarak en az %0 ve en çok %94,1 aralığında değişen oranlarda *Salmonella* bulunduğunu bildiren birçok çalışma ile de bulgumuz uyum göstermemektedir (Aden, 2016; Alemu ve Zewde, 2012; Bosilevac ve ark., 2015; Canpolat, 2007; Dargatz ve ark., 2016; Dong ve ark., 2014; Genç, 2002; Gragg ve ark., 2013; Jiménez ve ark., 2011; Küplülü, 1996; Lewerin ve ark., 2011; Madden ve ark., 2007; Madoraba ve ark., 2016; Milnes ve ark., 2008; Navarro-Gonzalez ve ark., 2012; Sibhat ve ark., 2011).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde dışkı örneklerindeki prevalans oranlarında görülen geniş aralığın temel olarak; örnek tipi (ileal, sekal, rektal içerik ve dışkı), miktarı ve sayısı, *Salmonella*'nın izolasyon ve identifikasyon metotlarındaki farklılıklar ayrıca örnekleme yapılan çiftliklerdeki biyogüvenlik ile kesimhanelerdeki hijyen uygulamalarının da etkili olduğu düşünülmektedir.

Salmonella spp. pozitif olarak belirlediğimiz 2 dışkı örneğine (D73 ve D97) ait elde edilen 2 izolatın geleneksel serotiplendirme sonrasında birinin *S. Enteritidis*, diğerinin ise *S. Albany* olduğu saptanmıştır (Tablo 9). Benzer amaç ile *Salmonella* serotip/serovarlarının araştırıldığı çalışmalar içerisinde, *S. Enteritidis* bulgumuza paralel olarak Genç (2002) ve Madoraba ve ark. (2016)'nın bulguları uyum göstermektedir. Çalışmamızda diğer dışkı serovarı olarak belirlediğimiz *S. Albany* serovarına bulgumuzun aksine, bilgimiz dahilinde yapılan benzer araştırmalarda identifiye edilen serovarlar içerisinde rastlanılmamıştır. Bulgumuzun bu yönden orijinal olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca, bulgularımızdan farklı olarak, sığır dışkı örneklerinde en yaygın olarak bildirilen serovarlar; *S. Typhimurium*, *Anatum*, *Mbdanka*, *Newport*, *Kentucky*, *Meleagridis*, *Dublin*, *Heidelberg*, *Give*, *Muenchen*, *Muenster*, *Cerro*, *Montevideo*, *Othmarchen* olup bunlardan daha az yaygın olarak; *Candans*, *Liverpool*, *Derby*, *London*, *Infantis*, *Haifa*, *Mishmarhaemek*, *Orion*, *Seftenberg*, *Zanzibar*, *Minnesota*, *Oranienburg*, *Reading*, *Idican*, *Aberdeen*, *Hayindonga* ve

Telaviv şeklinde belirtilmiştir (Alemu ve Zewde, 2012; Dargatz ve ark., 2016; Dong ve ark., 2014; Gragg ve ark., 2013; Jiménez ve ark., 2011; Küplülü, 1996; Lewerin ve ark., 2011; Madden ve ark., 2007; Milnes ve ark., 2008; Navarro-Gonzalez ve ark., 2012; Sibhat ve ark., 2011).

Günümüze dek bilğimiz dahilinde yapılan çalışmalarda, karkas ve dışkıdan izole edildiği bildirilen ortak *Salmonella* serovar/serotiplerin olmasının yanı sıra çalışmamızda olduğu gibi sadece karkas ya da sadece dışkıdan izole edildiği rapor edilenlerin de bulunduğu görülmektedir. Ayrıca, dışkı örneklerinde çalışmamızda bulunan ve diğer araştırmacıların belirttikleri serovarlar arasındaki farklılıklar ile ilgili olarak, daha önce karkas örneklerindeki serovarların farklılığında belirttiğimiz nedenlere bağlı olarak gözlemlendiği düşünülmektedir.

5.3. ISO ve *Salmonella* spp. Spesifik r-PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması

Çalışmamızda serotiplendirme aşamasından önce ISO yöntemi ile farklı selektif besi yerlerinden izole edilen 39 izolata doğrulama amacı ile ISO yönteminde belirtilen şekilde identifikasyon yapılmış ve *Salmonella* spp. spesifik r-PCR ile test edilmiştir. Yirmi sekiz karkas izolatinın 10'u ISO ile 7'si r-PCR ile, 11 dışkı izolatinın ise her iki yöntemle de 2'si *Salmonella* spp. pozitif olarak bulunmuştur. İncelenen toplam 39 izolat içerisinde 9 izolat her iki yöntemle de pozitif bulunurken, 27 izolatin her iki yöntemle de negatif sonuç verdiği, 3 izolatin (K73-MX, K73-MB ve K81-MX) ise ISO ile negatif r-PCR ile pozitif olduğu belirlenmiştir (Tablo 8). Kültür negatif/PCR pozitif olarak belirlenen bu durumun açıklanmasında çalışmamızda izolasyon ve identifikasyonun hangi aşamasından r-PCR için örnek alındığının üzerinde durulması gerekmektedir. Bu çalışmada, ISO tarafından belirlenmiş selektif besi yerleri üzerinde üreyen tipik koloniler seçilerek MC agara saflaştırılmak üzere pasajı yapılmıştır. MC agarda saf üreyen koloniler aynı anda hem biyokimyasal identifikasyon hem de r-PCR çalışması için DNA izolasyonunda kullanılmıştır. Bu 3 izolat katı besi yeri üzerinde tipik koloni morfolojisi göstermelerine rağmen biyokimyasal test sonuçlarında *Salmonella* türlerine ait bir profil oluşturmamış, serotiplendirme işleminde de istenilen yanıt alınamamıştır. Bunun yanında, bu izolatlar biyokimyasal ve serolojik yönden atipik *Salmonella* spp. olma olasılıkları nedeni ile PCR'da pozitif olmalarına rağmen kültür ile *Salmonella* olarak identifiye edilememişlerdir. Bulgumuza paralel olarak Hoorfar ve ark. (1999)

ve Sørensen ve ark. (2004)'nin çalışmalarında da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu durumda, izolatların daha detaylı olarak karakterizasyonunun yapılması gerektiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, ISO ve r-PCR yöntemleri arasındaki yüksek relatif doğruluk %92,30, duyarlılık %100 ve özgünlük %90 değerleri ile iki yöntem arasındaki neredeyse mükemmel olan uyum, r-PCR'ın ISO kültür yöntemi yanında *Salmonella*'nin hızlı tanısında güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir (Temelli ve ark., 2012) (Tablo 10).

Bu çalışmada, Bursa'da faaliyet gösteren kombina ve mezbahalarda kesilen sığır karkas ve dışkı örneklerinin %2 oranında *Salmonella* ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Bilgimiz dahilinde ülkemizde yapılan çalışmaların çoğu kanatlı hayvanlar ile ilgili olup semptomatik veya asemptomatik taşıyıcı olabilen büyükbaş kasaplık hayvanlarda *Salmonella* varlığının araştırıldığı çalışmalar yetersiz sayıda bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda örnekleme, izolasyon ve identifikasyonda uluslararası kabul görmüş Gold Standart kültür yöntemleri (karkas örnekleri için ISO 6579:2002 ve dışkı örnekleri için ISO 6579/A1:2007) ve valide bir r-PCR ile elde edilen bulgular, var olan bu eksikliğin giderilmesi açısından güncel bir veri oluşturmaktadır.

Çalışmamızda, kasaplık sığırlardaki *Salmonella* serovarları karkaslarda *S. Typhimurium* (%100) ve dışkıda *S. Enteritidis* (%50) ile *S. Albany* (%50) olarak bulunmuştur. Bu veriler öncelikle ülkemizdeki sığırlarda bulunan *Salmonella* serovarları açısından güncel bir veri oluşturulmasına temel sağlamıştır. Bununla birlikte, kanatlı hayvanlarda sık rastlanılan *Salmonella* serovarlarından biri olan *S. Enteritidis*'in ülkemizde sığırlarda da belirlenmiş olması bu serovar açısından kırmızı et ve et ürünlerinin de halk sağlığı yönünden değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Ayrıca sığırlarda *S. Typhimurium*'un diğer ülkeler ile paralel olarak karkaslardaki varlığı yanı sıra *S. Albany*'nin dışkıdan ilk defa izole edilmiş olması da epidemiyolojik yönden önem taşımaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Aden MMA (2016) Sığır ve koyunlarda *Salmonella* serotiplerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
2. Agbaje M, Begum RH, Oyekunle MA et al (2011) Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. *Folia Microbiologica* 56: 497-503.
3. Akbarut M (1997) Bursa bölgesindeki sığırlardan izole edilen *Salmonella* türleri üzerine bakteriyolojik ve serolojik çalışmalar. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
4. Akoachere JTK, Tanih NF, Ndip LM et al (2009) Phenotypic characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from food-animals and abattoir drains in Buea, Cameroon. *Journal of Health, Population and Nutrition* 27(5): 612-618.
5. Alakomi HL, Saarela M (2009) *Salmonella* importance and current status of detection and surveillance methods. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* 1: 142-152.
6. Alemu S, Zewde BM (2012) Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella enterica* serovars isolated from slaughtered cattle in Bahir Dar, Ethiopia. *Tropical Animal Health Production* 44: 595-600.
7. Alişarlı M, Akkaya L, Alemdar S (2001) Sığır kesim hattında tehlike analizleri: Kesimhane koşullarının sığır karkas kalitesi üzerine etkileri. TÜBİTAK TARP-2350 Projesi, Van.
8. Altuğ Ö, Ergün A, Denizli AN, Gökçen S, Erturun H (1995) Ege bölgesi mezbahalarında tehlike analizi kritik kontrol noktası uygulamasında mikrobiyolojik kontrol. TÜBİTAK VHAG-963 Projesi, İzmir.
9. Anar Ş (2010) Et ve Et Ürünleri Teknolojisi. Dora Yayınevi, Bursa, s: iii.
10. Anno de Jong (2012) Pan-European monitoring of susceptibility to human-use antimicrobial agents in enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67: 638-651.
11. Arslan A (2013) Et Muayenesi ve Et Ürünleri Teknolojisi. Medipres Yayıncılık, Malatya, s: 38-39.
12. BD. Becton Dickinson. Difco Antiserum Solutions <http://www.bd.com/ds/> (09.01.2017)
13. Bell C, Kyriakides A (2002) *Salmonella*: A Practical Approach to The Organism and Its Control in Foods. First published, UK, p: 1-25.
14. Bhan MK, Bahl R, Bhatnagar (2005) *S. typhoid* and paratyphoid fever. *Lancet* 366: 749-762.
15. Bohaychuk VM, Gensler GE, Barrios PR (2011) Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada. *Canadian Veterinary Journal* 52: 1095-1100.
16. Bolton DJ, O'Neill CJ, Fanning S (2012) A preliminary study of *Salmonella*, verocytotoxigenic *Escherichia coli*/*Escherichia coli* O157 and *Campylobacter* on four mixed farms. *Zoonoses and Public Health* 59: 217-228.

17. Bosilevac JM, Gassem MA, Al Sheddy IA et al (2015) Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in camels, cattle, goats, and sheep harvested for meat in Riyadh. *Journal of Food Protection* 78(1): 89-96.
18. Brands DA (2006) *Deadly Diseases and Epidemics Salmonella*. First published, Chelsea House Publishers p:16
19. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ et al (2000) *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 38(7): 2465-2467.
20. Brichta-Harhay DM, Arthur TM, Bosilevac JM et al (2011) Diversity of multidrug-resistant *Salmonella enterica* strains associated with cattle at harvest in the United States. *Applied and Environmental Microbiology* 77(5):1783-1796.
21. Canpolat S (2007) Çeşitli hayvan dışkılarında *Salmonella* etkenlerinin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle saptanması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
22. Carli KT, Unal CB, Caner V et al (2001) Detection of *Salmonella* in chicken feces by combination of tetrathionate broth enrichment, capillary PCR, and capillary gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1871-1876.
23. Carrique-Mas JJ, Davies RH (2008) Sampling and bacteriological detection of *Salmonella* in poultry and poultry premises: A review. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 27: 665-667.
24. CDC (2011) Vital signs: Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food-foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 1996-2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 60: 749-755.
25. Cliver DO (1990) *Foodborne Diseases*. Academic Press, Inc. p: 185-208
26. Cornell J, Neal KR (1998) Protracted outbreak of *Salmonella* Typhimurium definite phage type 170 food poisoning related to tripe, 'pig bag', and chitterlings. *Communicable Disease and Public Health* 1: 28-30.
27. Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH (1973) Molecular relationships among the *Salmonellae*. *Journal of Bacteriology* 115: 307-315.
28. Cumbul D (1994) Ülkemiz koşullarında mezbaha ve kombinalardaki hijyenik durumun araştırılması. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
29. Cummings KJ, Warnick LD, Alexander KA et al (2009) The duration of fecal *Salmonella* shedding following clinical disease among dairy cattle in the northeastern USA. *Preventive Veterinary Medicine* 92(1): 134-139.
30. Çalıcıoğlu M, Öksüztepe GA, İlhak Oİ ve ark (2005) Elazığ'da sığır karkaslarının yüzey kontaminasyonunun belirlenmesi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 19: 69-73.
31. D'Aoust JY (2001) *Salmonella*. Editor: LABBE RG, GARCIA S, *Guide to Foodborne Pathogens*. 2nd Edition, Wiley Blackwell, pp: 163-191.
32. Dargatz DA, Koprak CA, Erdman MM et al (2016) Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from cattle feces in United States feedlots in 2011. *Foodborne Pathogens and Disease* 13(9): 483-489.
33. Dong P, Zhu L, Mao Y et al (2014) Prevalence and profile of *Salmonella* from samples along the production line in Chinese beef processing plants. *Food Control* 38: 54-60.

34. ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2011. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC: 2011.
35. Erol, İ (2010) *Salmonella* enfeksiyonlarının zoonotik önemi. Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Science 1(2): 105-113.
36. Eyigor A, Carlı KT, Unal CB (2002) Implementation of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of *Salmonella* detection in poultry. Letters in Applied Microbiology 34: 37-41.
37. FAO. Food and Agricultural Organisation.
<http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS> (20.11.2016)
38. Fegan N, Vanderlinde P, Higgs G et al (2005) A study of the prevalence and enumeration of *Salmonella enterica* in cattle and on carcasses during processing. Journal of Food Protection 68(6): 1147-1153.
39. Fluckey WM, Loneragan WG, Warner R et al (2007) Antimicrobial drug resistance of *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from cattle feces, hides, and carcasses. Journal of Food Protection 70(3): 551-556.
40. Genç O (2002) Kars yöresinde evcil hayvanlardan salmonellaların izolasyonu, identifikasyonu ve serotiplendirilmesi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 8: 23-30.
41. Gökalp HY (1984) Genel Et Bilimi ve Teknolojisi. Atatürk Üniversitesi yayınları, Erzurum s: 1-18.
42. Grag SE, Loneragan GH, Nightingale KK et al (2013) Substantial within-animal diversity of *Salmonella* recovered from lymph nodes, feces and hides of cattle at slaughter. American Society for Microbiology 79(15): 4744-4750.
43. Grimont PAD, Weill F (2007) Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars: White-Kauffmann-Le Minor Scheme, 9th Edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Available at www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms-index.html (03.11.2016).
44. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M et al (2010) Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Research in Microbiology 161(1):26-29.
45. Hardy A (2015) *Salmonella* Infections, Networks of Knowledge, and Public Health in Britain, 1880-1975. First edition, Oxford University Press, UK, p: 4-5.
46. Helke KL, McCrackin MA, Galloway AM et al (2017) Effects of antimicrobial use in agricultural animals on drug-resistant foodborne salmonellosis in humans: A systematic literature review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 57(3): 472-488.
47. Holley RA, Arrus KM, Ominski KH et al (2006) *Salmonella* survival in manure-treated soils during simulated seasonal temperature exposure. Journal of Environmental Quality 35: 1170-1180.
48. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA et al (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Lippincott Williams and Wilkins, 9th Edition.
49. Hoorfar J, Baggesen DL, Porting PH (1999) A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates. Journal of Microbiological Methods 35: 77-84.
50. Imen BS, Ridha M, Manjoub A (2012) Laboratory Typing Methods for Diagnostic of *Salmonella* Strains, the "Old" Organism that Continued Challenges.

Editör: MAHMOUD BSM, *Salmonella*-A Dangerous Foodborne Pathogen. InTech, Chapters published, p: 353-365.

51. ISO. International Organization for Standardization (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. ISO 6579:2002. Geneva, Switzerland.
52. ISO. International Organization for Standardization (2003a). British Standards. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Carcass sampling for microbiological analysis. ISO 17604:2003, Geneva, Switzerland.
53. ISO. International Organization for Standardization (2003b). British Standards. Microbiology of food and animal feeding stuffs protocol for the validation alternative methods ISO 16140:2003, Geneva, Switzerland.
54. ISO. International Organization for Standardization (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Amendment 1:Annex D: Detection of *Salmonella* spp. In animal faeces and in environmental samples from the primary production stage. ISO 6579:2002/A1:2007, Geneva, Switzerland.
55. İzgür M (2006) *Salmonella* İnfeksiyonları. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar) Ankara İlke-Emek Yayınları, s: 116-121.
56. Jay JM (2000) Modern Food Microbiology. 6th Edition, An Aspen Publication, Maryland, p: 511-524.
57. Jimenez M, Martinez-Urtaza J, Chaidez C (2011) Geographical and temporal dissemination of *Salmonella* isolated from domestic animal host in the Culiacan Valley. Microbial Ecology 61: 811-820.
58. Kauffmann F, Edwards PR (1952) Classification and nomenclature of Enterobacteriaceae. International Bulletin. Bacteriological Nomenclature and Taxonomy. 2: 2-8.
59. Khen BK, Lynch OA, Carrol J et al (2014) Prevalence and characteristics of *Salmonella* in the beef chain in the Republic of Ireland. Zoonoses and Public Health 61(8): 534-536.
60. Küplülü Ö (1999) Sığır karkaslarında *Salmonella* kontaminasyonu ve serotip dağılımı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 46: 25-34.
61. Landis JR, Koch GG (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 33(1): 159-74.
62. Le Minor L, Popoff MY (1987) Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. Nov., nom., rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. International Journal of Systematic Bacteriology 37(4): 465-468.
63. Le Minor L, Veron M, Popoff MY (1982) A proposal for *Salmonella* nomenclature. Annals Microbiology 133: 245-254.
64. Lee KM, Ruyon M, Herrman TJ et al (2015) Review of *Salmonella* detection and identification methods: A aspects of rapid emergency response and food safety. Food Control 47: 264-276.
65. Lewerin SS, Skog L, Frössling J et al (2011) Geographical distribution of *Salmonella* infected pig, cattle and sheep herds in Sweden 1993-2010. Acta Veterinaria Scandinavica 53: 51.
66. Lin-Hui Su MS, Cheng-Hsun Chiu, MD (2006) Salmonella: Clinical importance and evolution of nomenclature. Chang Gung Medical Journal 30(3): 210-218.

67. Madden RH, Murray KA, Gilmour A (2007) Carriage of four bacterial pathogens by beef cattle in Northern Ireland at time of slaughter. *Letters in Applied Microbiology* 44: 115-119.
68. Madoroba E, Kapeta D, Gelaw AK (2016) *Salmonella* contamination, serovars and antimicrobial resistance profiles of cattle slaughtered in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 26; 83(1): e1-e8.
69. Malorny B, Paccassoni E, Fach P, Bunge C, Martin A, Helmuth R (2004) Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 7046-7052.
70. Malorny B, Made D, Teufel P, Berghof-Jager C, Huber I, Anderson A, Helmuth R (2007) Multicenter validation study of two blockcycler and one capillary based real-time PCR methods for the detection of *Salmonella* in milk powder. *International Journal of Food Microbiology* 117: 211-218.
71. Malorny B, Hauser E, Dieckmann R (2011) New Approaches in Subspecies-Level *Salmonella* Classification. Editor: POWOLLIK S. *Salmonella* from Genom to Function. Caister Academic Press, UK, p: 1-23.
72. Maradiaga M, Miller MF, Thompson L et al (2015) *Salmonella* in beef and produce from Honduras. *Journal of Food Protection* 78(3): 498-502.
73. Maurer JJ (2011) Rapid detection and limitations of molecular techniques. *Annual Review of Food Science and Technology* 2: 259-279.
74. Milnes AS, Stewart I, Clifton-Hadley FA et al (2008) Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. *Epidemiology & Infection* 136: 739-751.
75. MLST. Multilocus Sequence Typing Schemes. <http://pubmlst.org/databases.shtml> (30 Ekim 2016)
76. Navarro-Gonzalez N, Mentaberre G, Porrero CM et al (2012) Effect of cattle on *Salmonella* carriage, diversity and antimicrobial resistance in free-ranging wild boar (*Sus scrofa*) in Northeastern Spain. www.plosone.org. (27.09.2016)
77. Odumeru JA, León-Velarde CG (2012) *Salmonella* Detection Methods for Food and Food Ingredients. Editor: MAHMOUD BSM, *Salmonella-A Dangerous Foodborne Pathogen: In Tech*. Chapters published, p: 373-392.
78. Pacheco da Silva FF, Horvath MB, Silveira JG et al (2014) Occurrence of *Salmonella* spp. and genetic *Escherichia coli* on beef carcasses sampled at a Brazilian slaughterhouse. *Brazilian Journal of Microbiology* 45(1): 17-23.
79. Perez-Montano JA, Gonzalez-Aguilar D, Barba J et al (2012) Frequency and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco State, Mexico. *Journal of Food Protection* 75(5): 867-73.
80. Pulsenet Network. <http://www.Cdc.gov/pulsenet> (23 Aralık 2016).
81. Ransom JR, Belk KE, Bacon RT et al (2002) Comparison of sampling methods for microbiological testing of beef animal rectal/colonic feces, hides, and carcasses. *Journal of Food Protection* 65(4): 621-626.
82. Ross IL, Heuzenroeder MW (2008) A comparison of three molecular typing methods for the discrimination of *Salmonella enterica* serovar Infantis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 53: 375-384.
83. Saucier L (1999) Meat Safety: Challenges for the future. *Outlook on Agriculture* 28 (2): 77-82.

84. Sibhat B, Zewde BM, Zerihun A et al (2011) *Salmonella* serovars and antimicrobial resistance profiles in beef cattle, slaughterhouse personnel and slaughterhouse environment in Ethiopia. *Zoonoses and Public Health* 58: 102-109.
85. Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA (1980) Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 30: 225-420.
86. Small A, James C, James S et al (2006) Presence of *Salmonella* in the red meat abattoir lairage after routine cleansing and disinfection and carcasses. *Journal of Food Protection* 69(10): 2342-2351.
87. Sørensen LL, Alban L, Nielsen B et al (2004) The correlation between *Salmonella* serology and isolation of *Salmonella* in Danish pigs at slaughter. *Veterinary Microbiology* 101: 131-141.
88. Stipetic K, Chang YC, Peters K et al (2016) The risk of carriage of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in food animals in dynamic populations. *Veterinary Medicine and Science* 2: 246-254.
89. Temelli S, Eyigor A, Carli KT (2012) *Salmonella* detection in poultry meat and meat products by the Vitek immunodiagnostic assay system easy *Salmonella* method, a LightCycler polymerase chain reaction system, and the International Organization for Standardization method 6579. *Poultry Science* 91: 724-731.
90. TGK. Türk Gıda Kodeksi. Zoonozlar ve Zoonotik Etkenler, İlgili Antimikrobiyal Direnç ve Gıda Kaynaklı Salgınların İzlenmesi Yönetmeliği (2011a). Resmi Gazete 23.12.2011-28151.
91. TGK. Türk Gıda Kodeksi. Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği (2011b) Resmi Gazete 29.12.2011-28157.
92. Turner KM, Feil EJ (2007) The secret life of the multilocus sequence type. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29: 129-135.
93. TÜİK. Türkiye İstatistik Kurumu. <https://biruni.tuik.gov.tr> (02.12.2016).
94. Uğur M, Nazlı B, Bostan K (2003) Gıda Hijyeni. Teknik Yayınevi, İstanbul, s: 37-40.
95. Uyttendaele M, 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*. *Letters in Applied Microbiology* 37: 386-391.
96. Varela-Guerrero JA, Talavera-Rojas M, Gutierrez-Castillo Adel C et al (2013) Phenotypic-genotypic resistance in *Salmonella* spp. isolated from cattle carcasses from the north central zone of the State of Mexico. *Tropical Animal Health and Production* 45(5): 995-1000.
97. Wattiau P, Boland C, Bertrans S (2011) Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: Gold standards and alternatives. *Journal of Applied Environmental Microbiology* 77: 7877-7885.
98. Wieczorek K, Osek J (2013) Prevalence and characterisation of *Salmonella* in slaughtered cattle and beef in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 57(4): 607-611.
99. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ et al (1990) Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
100. Yücel A (1978) Yerde ve askıda yüzülen sığır gövde etlerinin mikrobiyel kontaminasyon durumları ile ilgili araştırmalar. *Gıda Bilimi ve Teknolojisi Dergisi* 1: 20-29.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Adenin
aW	: Su aktivitesi
BHI	: Brain Heart Infusion
BPW	: Buffered Peptone Water
BS	: Brilliance Salmonella
C	: Sitozin
CDC	: Center for Disease Control and Prevention
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
dNTP	: Deoksi Nükleotit Trifosfat
ECDC	: European Centre for Disease Prevention and Control
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
G	: Guanin
g	: Gram
H ₂ S	: Hidrojen Sülfür
IAC	: Internal Amplification Control
IMS	: Immunomagnetic Separation
ISO	: International Organization for Standardization
kb	: Kilobase
Kg	: Kilogram
LI	: Lysine Iron
MC	: Mac Conkey
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
MKTTn	: Mueller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin
MSRV	: Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis
ng	: Nanogram
PCR	: Polimerase Chain Reaction
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
r-PCR	: Real time PCR
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RVS	: Rappaport-Vassiliadis
T	: Timin
TT	: Tetrathionate
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TSI	: Triple Sugar Iron
US FDA BAM	: United States Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual
WHO-Salm	: World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on <i>Salmonella</i>
XLD	: Xylose Lysine Deoxycholate
XLT4	: Xylose Lysine Tergitol-4

20.12.2012

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BAŞKANLIĞINA

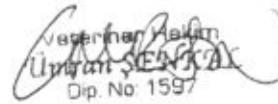
Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora Programında danışmanlığımı Prof. Dr. Seran Temelli'nin yaptığı Doktora öğrencisi Ece Çetin'in Enstitünüz'e bildirdiği " Kasaplık Sığırlarda Salmonella Taşıyıcılığının ve Serotip Dağılımının Belirlenmesi" isimli tez çalışması ile ilgili olarak ihtiyaç duyulan sığır karkas ve dışkılarından örnek alma işlemlerinin işletmemizde gerçekleştirilmesi tarafımızca uygun bulunmaktadır.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Veteriner Hekim Ümran Şenkal

Çimet Et Entegre Lokantacılık Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti.

İşletme Sorumlu Veteriner Hekimi


Veteriner Hekim
Ümran ŞENKAL
Dip. No: 1597

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresinde bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan kaçınmayan, her konuda yardım ve desteklerini esirgmeden sabırla yanımda olan, akademik yönden yetiştirilmem hususunda gösterdiği büyük özveri ve sonsuz katkıları için çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Seran TEMELLİ'ye başta olmak üzere, her zaman danışman hocam ile birlikte çalışmalarında ve her türlü problemimde maddi ve manevi yanımda olan Prof. Dr. Ayşegül EYİĞÖR hocama, laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan arkadaşlarım Doktora öğrencisi Evren ERKÖSE ve Doktora öğrencisi Talha ŞERBETÇİOĞLU'na, eğitimim süresince her konuda desteğini esirgemedi, gösterdikleri sabır ve verdikleri manevi güç için hocam, abim Doç. Dr. Artun YIBAR ve çalışma arkadaşım, kıymetli ablam Nedret GÜÇLÜ'ye, Anabilim Dalımızın saygıdeğer hocalarına, tez çalışmamın finansman desteğini sağlayan U.Ü. Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Birimine, yoğun çalışmalarım sırasında her konuda gönülden destek olan hayat arkadaşım, sevgili eşim Araş. Gör. İsmail ÇETİN'e, varlığı ve sabrı ile her zaman huzur veren biricik kızım Ece Zeynep'e, tüm hayatım boyunca olduğu gibi, doktora eğitimim süresince de kızımın bakım ve yetiştirilmesinde gösterdiği özeni, olağanüstü sabrı ve manevi desteği ile yanımda olan çok kıymetli annem Kadriye DURMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ece ÇETİN

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Ürgüp Nevşehir’de dünyaya gelen Ece ÇETİN, ilk öğretimini Hacı Mustafa Gazioğlu İlk Öğretim Okulu’nda, orta öğretimini 50. Yıl Dedeman Ortaokulu’nda, lise öğrenimini Kayseri Lisesi’nde tamamlamıştır. Lisans eğitimini Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde yapmış olup, 2010 yılında Veteriner Hekim olarak mezun olmuştur. 2011 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başlamış, 2013 yılının Aralık ayında Araştırma Görevli’liğine atanmıştır. Halen aynı Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışan Ece ÇETİN evli ve kız çocuğu annesidir.