



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



SİĞİR VE KOYUNLARDA SALMONELLA SEROTİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Mohamed Mukhtar Ali ADEN

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

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

**ANKARA
2016**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIĞIR VE KOYUNLARDA SALMONELLA SEROTİPLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Mohamed Mukhtar Ali ADEN

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

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

**ANKARA
2016**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunulan ‘‘Sığır ve koyunlarda *Salmonella* serotiplerinin belirlenmesi’’ başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim. Tezimin tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Öğrencinin Adı Soyadı: Mohamed Mukhtar Ali ADEN

Tarih: 14 / 04 /2016

İmza:

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	1
1.2. <i>Salmonella</i> Nomenklatürü	2
1.3. Etiyoloji	4
1.4. Sığır ve Koyunlardan <i>Salmonella</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu	5
1.4.1. Ön zenginleştirme (Tamponlanmış Peptonlu Su)	6
1.4.2. Selektif Zenginleştirme	6
1.4.3. Selektif besiyerlerine ekim	7
1.4.4. Biyokimyasal Konfirmasyon	7
1.5. Serotipler	8
1.5.1. Salmonellaların Antijenik Yapıları	9
1.6. Serotiplendirme	12
1.7. Epidemiyoloji	14
1.8. Patogenezis	21
1.9. <i>Salmonella</i> 'nın Zoonotik Önemi	23
1.10. <i>Salmonella</i> 'nın Moleküler Tiplendirmesi	25
1.10.1. Ribotiplendirme	26
1.11. Salmonellalarda Antimikrobiyel Direnç	27

2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. Gereç	30
2.1.1. İncelenen Örnekler	30
2.1.2. <i>Salmonella</i> İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri	32
2.1.2.1. ISO 6579 2010: Appendix D İzolasyon Besiyerleri	32
2.1.2.2. Biyokimyasal Test Besiyerleri ve Ayıraçları	32
2.1.2.3. Ticari Biyokimyasal Test Besiyerleri (Microgen GN-ID) ve Ayıraçları	33
2.1.2.4. Serotiplendirmede Kullanılan Besiyerleri ve Antiserumlar	33
2.1.2.5. Antibiyotik Duyarlılık Test Besiyerleri ve Tampon Çözeltiler	33
2.1.3. Kullanılan Antibiyotik Diskleri	34
2.1.4. Moleküler Tiplendirmede Kullanılan Cihaz, Kimyasal ve Tampon Solüsyonlar	34
2.1.5. Moleküler Tanıda Kullanılan Cihaz, Kimyasal ve Tampon Solüsyonlar	34
2.1.5.1. Cihazlar	34
2.1.5.2. Solüsyonlar	35
2.2. Yöntem	37
2.2.1. <i>Salmonella</i> Örneklerin Toplanması	37
2.2.2. <i>Salmonella</i> İzolasyon ve İdentifikasyonu	37
2.2.2.1. Ön zenginleştirme (Tamponlanmış Peptonlu Su)	37
2.2.2.2. Selektif Zenginleştirme	38
2.2.2.3. Selektif besiyerlerinde ekim	38
2.2.2.4. Biyokimyasal Konfirmasyon	40
2.2.2.5. Ticari Biyokimyasal Kit	41
2.2.2. Serotiplendirme	43
2.2.3. Ribotiplendirme	47
2.2.4. Antimikrobiyal Duyarlılık Çalışmalar	48
2.2.4.1. Disk Difüzyon Testi	48
2.2.4.2. <i>Salmonella</i> Antibiyotik Direnç Genleri	49
3. BULGULAR	50
3.1. Sığır ve Koyunlardaki <i>Salmonella</i> Sıklığı	50
3.2. Sığır ve Koyunlarda Belirlenen <i>Salmonella</i> Serotipleri	53

3.3. Ribotiplendirme Bulguları	55
3.4. Serotip Ribotip Karşılaştırılması	55
3.5. Antibiyotik Duyarlılık Testi Bulguları	57
3.6. Moleküler Tanı Bulguları	61
3.6.1. Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Varlığı	61
4. TARTIŞMA	62
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
ÖZET	72
SUMMARY	74
KAYNAKLAR (LITERATURE CITED)	76
ÖZGEÇMİŞ	94

ÖNSÖZ

Gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere Salmonellozis, büyük bir halk sağlığı problemidir. Evcil hayvanlardan kaynaklanan gıda zehirlenmeleri incelendiğinde en önemli etken olarak *Salmonella* serotipleri karşımıza çıkmaktadır. Kontamine gıdalardan kaynaklanan *Salmonella* infeksiyonları dünya çapında yıllardır süregelen önemli bir sorundur. Hayvanlar bu etkeni; kontamine yemlerden, sulardan ya da infekte hayvanlar ile direkt temas (insanlar dahil) sonucunda almaktadırlar. Gerek gıdasal değer olarak ve gerekse ekonomiye sağladığı önemli katkılar nedeniyle Türkiye’de sığır ve koyun yetiştiriciliğinin önemi büyüktür.

Bu tez çalışmasında, 2014-2015 yılları arasında, hayvan çiftliklerinden koyun ve sığırlara ait dışkı ve deri, kesimhanelerden ise lenf nodülleri toplanarak *Salmonella* yönünden incelenmiştir. İzolasyonu yapılan *Salmonella* suşlarının antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır. Antibiyotik direnci ile ilişkili çeşitli gen bölgelerinin varlığı kontrol edilmiştir. *Salmonella* belirlenmesinde; hayvanların dışkı, deri ve lenf nodülleri örnekleri; 6579:2004 (ISO) Uluslararası Metot Standardizasyonu Organizasyonu tarafından kabul edilen standart metotlar dahilinde yapılarak identifikasyona gidilmiştir. Serotiplendirme ise Kauffmann-White-Le Minor klasifikasyon şemasına göre yapılmıştır. Serotiplendirilmesi yapılan suşların ribotiplendirme sonucunda ripotip patternleri ortaya konmuş, antibiyogram profilleri belirlenmiş, antibiyotik direnci gösteren suşların antibiyotik direnç genlerinin varlığı genel PCR yöntemi ile belirlenmiştir.

Tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesindeki bana yol gösteren, yardım ve ilgilerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. K. Serdar DİKER başta olmak üzere her konuda yardımlarını esirgemeyen öğretim üyeleri; Prof. Dr. Müjgan İZGÜR, Prof. Dr. Hakan YARDIMCI, Prof. Dr. Mehmet AKAN, Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU, Y.DOÇ. Dr. H. Kaan MÜŞTAK, Tez İzleme Komitesi üyesi Doç. Dr. Muammer GÖNCÜOĞLU’na, Mikrobiyoloji Anabilim Dalında meslektaş arkadaşlarıma, Anabilim Dalı personeline, moral desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ailem, babam Mukhtar Ali ADEN, annem Amino Ali AHMED,

kardeşlerime ve değerli eşim Shankaron Abass ALİ, Oğlum Ayman Mohamed Mukhtar ALİ, kızım Amera Mohamed Mukhtar ALİ'ye yanımda oldukları ve desteklerini esirgemedikleri için teşekkürlerimi sunarım.

Doktoram başarılı bir şekilde sonuçlanabilmesi için gerekli desteği sağlayan Cumhurbaşkanlığı ve Dışişleri Bakanlığı ile koordineli biçimde yürütülen eğitim projesi, TÜBİTAK BİDEB ve Ankara Üniversitesi'ne teşekkür ederiz.



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
+	Pozitif
-	Negatif
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
β	Beta
Amp	Ampisilin
E	Eritromisin
GN	Gentamisin
K	Kanamisin
Na	Nalidixic asit
Su	Sülfonamidler
S	Streptomisin
Te	Tetrasiklin
AAP	American Academy of Pediatrics
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
APHIS	Animal and Plant Health Inspection Service
AST	Antimicrobial Susceptibility Testing
ATCC	American Type Culture Collection (Amerikan Tür Kültürü Koleksiyonu)

Bp	Base pair
BGA	Brilliant Green Agar
BPW	Buffered Peptone Water
°C	Santigrad derece birimi
C	Chloramphenicol
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFU	Colony forming unit
CIP	Siprofloksasin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTX	Cefotaxime
ddH ₂ O	Double-distilled water
DNA	Deoksiribonukleik asit
EC	European Commission
EU	European Union
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
g	gram
GFN	Global Foodborne Infections Network
h	hour
H ₂ S	Hydrojen Sülfür
ISO	International Organization for Standardization
IS	Insertion sequence typing

Kg	Kilogram
KOH	Potasyum hidroksit
LDC	Lizin dekarboksilaz
MDR	Multi-Drug Resistant
MH	Müller-Hinton
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
ml	Mililitre
MLST	Multilocus sequence typing
MRSV	Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis
MKTTnB	Muller-Kauffmann Tetrathionet with novobiocin
No.	Number
NA	Nutrient agar
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NVSL	National Veterinary Service Laboratory
O	Orta Derecede Duyarlı
OIE	Office International des Epizooties
ONPG	o-Nitrofenil- β -D-Galaktopiranozid
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
R	Resistent
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
S	Duyarlı

S.	<i>Salmonella</i>
Spp.	Species
Subsp.	Subspecies
TBE	Tris Borate EDTA
TSI	Triple Sugar Iron
TSB	Tryptic soy broth
UV	Ultraviolet
VP	Voges-Proskauer
WHO	World Health Organization
XLD	Xylose lysine desoxycholate

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. <i>Salmonella</i> tespiti için akış şeması	39
Şekil 2.2. Renk skalası bildirilen bir form örneği	43
Şekil 2.3. Rapor Formu Örneği	43
Şekil 2.4. Lam aglütinasyonda pozitif ve negatif reaksiyon sonuçları	44
Şekil 2.5. Craigie besiyerine ekim	45
Şekil 2.6. H-faz tespiti için lam aglütinasyon	45
Şekil 2.7. <i>S.Typhimurium</i> ve <i>S. Enteritidis</i> Serotiplendirilmesi	46
Şekil 3.1. <i>Salmonella</i> , tür içi ve türler arasındaki genetik benzerlik ayrı ayrı dendogramlar	56
Şekil 3.2. tet A primer kullanılarak farklı serotiplerle genel PCR	61

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. <i>Salmonella</i> türleri ve alt türlerine ait serovarların sayısı	9
Çizelge 1.2. Sığır ve koyunlarda 1999-2013 yılları arasında en sık görülen <i>Salmonella</i> serotipleri	16
Çizelge 2.1. Sığırlardan alınan örneklerinin alındığı bölge ve hayvan sayıları	30
Çizelge 2.2. Sığırlardan dışkı, deri sürüntüsü ve lenf nodülü örneklerinin sayıları	31
Çizelge 2.3. Koyunlardan alınan örneklerinin alındığı bölge ve hayvan sayıları	31
Çizelge 2.4. Koyunlardan dışkı, deri sürüntüsü ve lenf nodülü örneklerinin sayıları	31
Çizelge 2.5. Antibiyotik duyarlılık test için kullanılan antibiyotik diskler	34
Çizelge 2.6. <i>Salmonella</i> 'nın Biyokimyasal İdentifikasyonu: Tipik <i>Salmonella</i> Suşlarının Biyokimyasal Reaksiyonları	41
Çizelge 2.7. Microgen GN-ID test kitlerindeki biyokimyasal reaksiyonları okuma tablosu	42
Çizelge 2.8. Disk Difüzyon Zon Çapı (CLSI)	49
Çizelge 3.1. Türkiye'de farklı illerdeki sığırlardan toplanan farklı örneklerden izole edilen <i>Salmonella</i> spp. sayısı	50
Çizelge 3.2. Türkiye'de farklı illerdeki sığırlardan toplanan farklı örneklerden izole edilen <i>Salmonella</i> spp. sayısı	51
Çizelge 3.3. Türkiye'de farklı illerdeki koyunlardan izole edilen <i>Salmonella</i> spp. sonuçları	51
Çizelge 3.4. Türkiye'de farklı illerdeki koyunlardan toplanan farklı örneklerden izole edilen <i>Salmonella</i> spp. sonuçları	51

Çizelge 3.5. Tüm İzole ve İdentifiye Edilen <i>Salmonella</i> Serotiplerinin Sonuçları	54
Çizelge 3.6. İzole ve identifiye edilen <i>Salmonella</i> serotiplerinin antijenik formülleri	54
Çizelge 3.7. Sığırlardan izole edilen <i>Salmonella</i> serovarlarının farklı antibiyotiklerle yapılmış antimikrobiyal duyarlılık testi	57
Çizelge 3.8. Koyunlardan izole edilen <i>Salmonella</i> serovarlarının farklı antibiyotiklerle yapılmış antimikrobiyal duyarlılık testi	58
Çizelge 3.9. Hayvanlardan izole edilen <i>Salmonella</i> serovarlarının farklı antibiyotiklere dirençlik sonuçları	59
Çizelge 3.10. Sığır ve koyunlardan izole edilen <i>Salmonella</i> serovarlarının antibiyotik direnç oranları (%)	60
Çizelge 4.1. Sığır ve Koyunlardan İzole ve İdentifiye Edilen <i>Salmonella</i> Serotiplerinin İnsan ve Kanatlılardaki Dağılımı	68
Çizelge 4.2. Sığır, koyun, insan ve kanatlılardaki antibiyotik dirençlilikleri (antimikrobiyel duyarlılık profilleri) arasındaki benzerliği veya paralelliği	69

1. GİRİŞ

1.1. Tarihçe

Eberth, 1880 yılında, insandan tifo hastalığının nedeni olduğunu düşündüğü bir basil tanımlamıştır. Eberth, bu basile tifodan ölen bir hastanın dalak kesiti ve mezenterik lenfide rastlamıştır (Le Minor, 1994). Patolog Gaffky, 1884 ve Smith, 1885' de tifo basili üreterek, Eberth'in bulgularını doğrulamışlar ve bu yeni bakteriye patolog Daniel E. Salmon'un adı verilmiştir (Humphrey, 2000; Schultz, 2008). *Salmonella* ilk olarak 1885 yılında bir domuzun bağırsağından izole edilmiş ve organizma *Bacterium choleraesuis* (günümüzde *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis* olarak bilinmektedir) olarak adlandırılmıştır (Smith, 1894; FDA/CFSAN, 2008). Pfeiffer ve Kolle (1896) ile Gruber ve Durham (1896), tifo basiline bağışıklık kazanmış bir hayvanın serumunun, tifo basiline aglütinasyon gösterdiğini keşfetmişlerdir. Aynı zamanda, Widal (1896) ve Grunbaum (1896), bir tifo hastasının serumunun tifo basili ile aglütinasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Yeni testin adı 'serodiagnostic by Widal' (Widal serotanı) olarak tanımlanmıştır (1896). Aynı yıl, Widal testi negatif olan ancak tifoid belirtiler gösteren hastalardan izole edilen suş ise 'paratifi basili olarak adlandırılmıştır (Wray ve Wray, 2000).

Salmonella cinsinin tanımlanmasının henüz yapılamadığı dönemlerde sığırlardaki serovarlar hakkında yeterli bilgi bulunmadığı gibi bu serovarlar diğer bakteri cinsleriyle de karıştırılmıştır (Wray ve Davies, 2000). Sığır paratifosu ilk olarak Avrupa'da 19. yy ortalarında kaydedilmiştir, o zamanlar Hollanda, Almanya ve Danimarka'da bir diyare formu epey dikkat çekmiştir. Hastalık yıldan yıla meydana gelme ve ağır kayıplara neden olma eğilimi olan belirli yerlerde tanınmıştır. Wray ve Davies (2000) ve Obich (1865), hastalığın bir enfekte ajan tarafından meydana gelebileceğini ilk öne süren kişiler olmuşlardır, ancak Jensen (1891) Danimarka'da bir salgını incelediğinde hastalığa yakalanan buzağının iç organlarından koliform basili izole etmesiyle bakteriyolojik araştırmalar başlamış olup ve izole edilen basile de *Bacillus paracoli* adı verilmiştir. *Salmonella* infeksiyonu Mohler ve Buckley (1902)

tarafından yetişkin sığırlarda rapor edilmiştir. Aynı araştırmacılar ABD’de *S. Enteritidis*’e (*Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Enteritidis) benzeyen bir organizmanın neden olduğu bir hastalık salgını tanımlamışlardır. Önceden *S. Enteritidis* olarak tanımlanmış suşların çoğu seroloji ile hatalı bulunmuş ve günümüzde birçok ülkede tanınmış olan *S. Dublin* (*Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Dublin) olarak tanımlanmıştır (Wray ve Davies, 2000).

Salmonella cinsi daha açık bir şekilde tanımlandığında, Avrupa’da sığır Salmonellozisinin endemik olduğu bölgelerde, *S. Dublin*’in en yaygın serovar olduğu ve bunu *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium’unun takip ettiği görülmektedir (Wray ve Davies, 2000).

Sığır Salmonellozu salgınları, atıklardan, asemptomatik mastitisten veya *Salmonella* bulaşmış çiğ süttten kaynaklanabilmektedir. Örneğin; ABD’deki en büyük Salmonelloz salgını 1985 yılında bildirilmiş ve salgının %2 oranında süt yağı içeren pastörize süte çiğ sütün yanlışlıkla karışmasıyla oluştuğu ortaya konulmuştur (Holsinger ve ark.,1997).

S. Abortusovis (*Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Abortusovis) ilk olarak Almanya’da 1921 tarihinde izole edildikten sonra İngiltere’de 1925 yılında, koyunların abort vakalarında ortaya konmuştur. Lovell, 1931’de İngiltere’deki izolatlarla Almanya’daki izolatları birbiriyle kıyaslamış ve benzer olduklarını bildirmiştir (Wray ve Linklater, 2000).

1.2. *Salmonella* Nomenklatürü

İlk aşamada Salmonellalar hastalık belirtileri farklı klinik koşullardan veya farklı türlere ait olduğu düşünülen konaklardan izole edilmiş ve izole edilen suşlar ‘Eberthella Typhosa’ (*S. Typhi*), ‘*S. Enteritidis*’, ‘*S. Abortusovis*’, ‘*S. Gallinarum*’, ‘*S. Bovismorbificans*’, *S. Choleraesuis* veya *S. Typhimurium* olarak adlandırılmıştır. Kısa süre sonra farklı adlandırılan serovarların bir çoğunun aynı olduğu anlaşılmıştır

(Grimont ve ark., 2000). Bunun üzerine serovarlar arasındaki farkı ortaya koymak için serovarin ilk izole edildiği coğrafi bölgenin adı verilmeye başlanmıştır; örneğin *Salmonella* London. White tarafından 1926'da başlatılan ve Kauffmann tarafından 1941 genişletilen O ve H antijenlerinin analizi birçok serovarin tanımlanmasını sağlamıştır (Grimont ve ark., 2000).

Salmonella taksonomisi karışıktır ve bilim insanları bu familyayı anlamak ve aralarında bağlantı kurmak için farklı sistemler kullanmışlardır (Brenner ve ark., 2000; Tindall ve ark., 2005). *Salmonella* nomenklatürü birçok kere değiştirilmiştir ve hala da değişkenliğini korumaktadır. 1983'ten önce *Salmonella* familyasını tanımlayan iki nomenklatür sistemi bulunmaktaydı. 1980 yılında Le Minor ve Popoff tarafından önerilen birinci sistem, bakteriyolojik Kod kurallarına uymasa da geniş çapta kabul görmüştür. Bakteriyolojik Kod kurallarına uygun olan ikinci sistem ise daha az araştırma tarafından kullanılmıştır (Tindall ve ark., 2005).

20.yy ortalarına doğru, *Salmonella* tanımı ve ayrıştırılması için birçok öncü çalışma yapılmıştır (Humphrey, 2000). Günümüzde kullanılan *Salmonella*'ların antijenik sınıflandırması veya serotiplendirmesi, Kauffman-White'in 1920-1940 yılları arasında bakteriyel yüzey antijenleriyle yıllar süren çalışmalarının bir sonucudur. 1930'ların ortalarında Kaufmann-White Le Minor Şeması Uluslararası Mikrobiyolog Birliği'nce (International Association of Microbiologists) kabul edilmiştir (Scherer ve Miller, 2001).

1987 yılında WHO İşbirliği Merkezi (Collaborating Centre)'nden Le Minor ve Popoff Sistematik Bakteriyoloji Uluslararası Komitesi'nin Adalet Komisyonu'na 'Bir Görüş Önerisi'ni resmi olarak sunmuşlar ve aynı yıl *Salmonella*ların 7 altcinsinin, alttür olarak adlandırılmasını önermişlerdir. Altçins III, IIIa ve IIIb olmak üzere hem genomik yakınlıkları hem de biyokimyasal özelliklerine göre ayrıldı. Alttür IIIa (*S. enterica subsp. arizonae*) monofazik Arizona serotipini ve alttür IIIb (*S. enterica subsp. diarizonae*) difazik serotipleri içermektedir. *Salmonella* serovarylarının antijenik formülü Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Pasteur Enstitüsü, *Salmonella* Referans ve

Araştırma İşbirliği Merkezi, Paris, Fransa tarafından tanımlanmış ve yeni sero-türler Kauffmann-White şemasında her yıl güncellenmektedir (Popoff ve Le Minor,1997; Popoff ve ark., 2000). Ek 47 rapor, DSÖ-Salm tarafından 2003 ve 2007 yılları arasında tanımlanan yeni 70 *Salmonella* serovarının karakterizasyonunu sunmaktadır: 44'ü *S. enterica* alt-tür *enterica*, 11'i alt-tür *salamae*, 5'i alt-tür *arizonae*, 8'i alt-tür *diarizonae*, bir tanesi de alt-tür *houtenae* ve biri de *S. bongori*'ye atanmıştır (Guibourdenche ve ark., 2010)

1.3. Etiyoloji

Enterobacteriaceae familyasının genel özelliklerini taşıyan Salmonellalar Gram negatif, kısa ve küçük çomaklar tarzında olup, boyutları $2-3 \times 0.4-0.6 \mu\text{m}$ 'dır. Salmonellalar, sporsuz, kapsülsüz, oksidaz negatif, katalaz pozitif, H_2S oluşturmakta ve laktozu fermente edememektedir. *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* hariç hareketli olup, peritrik flagellaya sahiptirler. Biyokimyasal özellikleri içerisinde Voges Proskauer (VP), indol ve üre testleri negatif, Metil kırmızı ve Sitrat testleri pozitifdir (İzgür, 2006; Odumeru ve León-Velarde, 2012). Fakültatif anaerobik özellikte olup laboratuvar besiyerlerinde kolaylıkla üreyebilen *Salmonella* etkenleri; 37°C 'de 24-48 saatte, küçük, yuvarlak, S tipi koloniler meydana getirirler (İzgür, 2006; Montville ve Matthews, 2008). Bu etkenler, buyyonda homojen bir şekilde, hafif bulanıklık meydana getirerek ürerler. Biyokimyasal aktiviteleri oldukça yüksektir. Bu nedenle, *Salmonella* izolasyonunda kullanılan besi yerlerinin bileşimi, önemli iki özelliklerini ortaya çıkarma esasına dayanmaktadır. Bu özellikler, H_2S oluşturmaları (*S. Paratyphi* hariç) ve laktozu fermente edememeleri olup, *E. coli*'den ayırımlarında kullanılan en önemli testlerdir. Bu özelliklerine dayanılarak, Mac Conkey agarda renksiz koloniler oluşturan Salmonellalar, Brilliant Green agar (BGA)'da pembe renkli koloniler oluştururlar (İzgür, 2006).

Salmonella $32 - 37^\circ\text{C}$ aralığındaki optimum büyüme sıcaklığı ile mezofiliktir ama $6 - 46^\circ\text{C}$ geniş sıcaklık aralığında üreyebilir, 25 ile 43°C arasında ve pH $4 - 8$ 'de ise hızlı gelişme gösterir (Odumeru ve León-Velarde, 2012). Düşük tuz ve yüksek su

aktivitesi koşulları altında çoğalması engellenir (D' Aoust, 2001b). Bakteriler 70°C üzeri sıcaklıkta özellikle pastörizasyona duyarlıdır; ancak kurumaya karşı dirençlidirler. Özellikle kuru dışkı, toz, tohum gibi kuru malzemelerde uzun süre hayatta kaldıkları bilinmektedir (Radostitis ve ark., 2007). Ayrıca Salmonellalar çiftlik koşullarında çok uzun süre hayatta kalabilir (Holley ve ark., 2006; Cummings ve ark., 2009a).

Salmonellaların çoğu fototroftur; büyüme faktörü gereksinimleri yoktur ve karbon kaynağı olarak glukoz ve nitrojen kaynağı olarak amonyum iyonu kullanırlar. Bazı konak spesifik serovarlar (örn. *S.Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Abortusovis*, *S. Gallinarum*) oksotrofiktir ve bir veya daha fazla büyüme faktörüne ihtiyaç duyarlar (Wray ve Wray, 2000; Yue ve Schifferli, 2013).

1.4. Sığır ve Koyunlardan *Salmonella* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Sığır ve koyunlardan toplanan dışkı (rektal muayene ile) ve deri svab (deriden sürüntü yoluyla) örnekleri; Salmonellozis (diyare, ateş göstermeyen hayvanlardan vs.) belirtisi göstermeyen hayvanlardan ve her örnekte farklı eldiven kullanılarak alınmalıdır. Hayvan dışkılarından *Salmonella* izolasyonu birçok faktör tarafından komplike olabilmektedir. Hayvanlar sublinik enfekte olabilirler (hastalığın klinik belirtisini göstermeyen) ve az miktarda *Salmonella* etkenini dışkıyla saçabilirler. Buna ek olarak *Salmonella*'nın dışkıdaki popülasyonu diğer enterik floradakilere göre daha düşüktür (ISO-6579: 2002 (E); HPA, 2007; WHO, 2010). Bu yüzden yanlış negatif sonuç elde etmeyi azaltmak için, genellikle tamponlanmış peptonlu su veya evrensel ön zenginleştirme sıvısı gibi seçici olmayan ön zenginleştirme yapmak gerekmektedir (ISO-6579: 2002 (E); WHO, 2010; OIE, 2010; Zadernowska ve Chajęcka, 2012; Gragg ve ark., 2013).

Salmonella'nın hayvanlardan alınan örnekleri izolasyonu ve identifikasyon için ISO 6579 önerdiği metoda göre dört ardışık işlemde oluşmaktadır (i) ön zenginleştirilmesi, her örnekten 25 gram alınarak 225 ml tamponlanmış peptonlu su (TPS) içeriğine atılır ve 37°C sıcaklıkta 24±3 saat inkübasyona bırakılması.(ii) iki farklı besiyerinde zenginleştirme aşaması, ilk olarak hazırlanan örneklerden 0,1ml alınarak Modifiye Rappaport- Vassilidis yarı katı besiyerinde (MRSV) içerisine transfer edilip 24 h ± 3 h at 41.5°C ± 1°C ve ikinci Mueller Kauffmann Tetrathionate-novobiocin broth (MKTnB) 24 h ± 3 h at 37°C ± 1°C de Petriyerde inkübasyona bırakılması. (iii) 24 saatlik inkübasyonun ardından petriyerden alınan bir öze dolusu süş selektif besiyerine ekim aşamasında, XLD ve XLT4 agara pasajlanarak 37°C'de 24 ±3 saat inkübasyona bırakılması , (iv) agar üzerinde üreyen kolonilerin biyokimyasal ve serolojik konfirmasyonu yapılmasıdır. Bu prosedürün tamamı 4-6 iş gününde tamamlanmaktadır (WHO, 2010; ISO, 2012).

1.4.1. Ön zenginleştirme (Tamponlanmış Peptonlu Su): Asemptomatik hayvan dışkılarında *Salmonella* sayısı genelde düşük düzeyde bulunmaktadır. Yanlış negatif sonuç riskini azaltmak için genellikle tamponlanmış peptonlu su (TPS) ön zenginleştirme buyyonu kullanımına gerek duyulmaktadır (WHO, 2010; OIE, 2010). Ön zenginleştirme, hasar almış hücrelerin onarılması ve çoğalmasına olanak sağlamaktadır.

1.4.2. Selektif Zenginleştirme: Selektif zenginleştirme, Modifiye Rappaport-Vassilidis yarı katı besiyerinde (MRSV) yapılabilmektedir. Besiyerleri seçici olarak *Salmonella* spp.'lerin üremesini tetiklerken; diğer bakterilerin üremesini baskılayan katkı maddeleri içermektedir (WHO, 2010; OIE, 2010). Zenginleştirme basamağı rekabetçi diğer bakterilerin baskılanması ve *Salmonella* spp. izolasyonunun kolaylaştırılması açısından önemlidir.

1.4.3. Selektif besiyerlerinde ekim: Ksiloz Lizin Desoksikolat (XLD) ve Ksiloz Lizin Tergitol-4 (XLT4) agarlar; katı, selektif besiyerleridir ve değişen düzeylerde diferansiyal üremeye izin vermektedirler. XLD ve XLT4 agar *Salmonella* izolasyonunda en çok kullanılan besi yerleridir. Bu besiyerleri bir yandan *Salmonella* dışındaki bakterilerin üremesini inhibe ederken, bir yandan da genellikle laktoz fermentasyonunun olmaması ve hidrojen sülfid (H₂S) üretimi gibi temel diferansiyal biyokimyasal özellikler yönünden bilgi vermektedir. Selektif bir besiyeri olarak seçiciliği yeterli olmadığından çoğu besiyerlerinin daha fazla diferansiyel olmaya ihtiyacı bulunmaktadır. Çoğu *Salmonella* serotipleri; laktoz, sükroz, salisin, sellobioz ve gliserol gibi maddelerden asit oluşturmadıklarından, selektif besiyerleri sıklıkla pH indikatörlü bu substratları içermektedirler (Wray ve Wray, 2000). Selektif besiyerindeki bakteriyel izolasyon görsel olarak *Salmonella* kolonilerinin varlığını göstermektedir. Tipik *Salmonella* kolonisi siyah bir merkezin (besiyeri demir tuzları içermektedir) etrafını hafif transparan kırmızı-pembe bir zonun çevrelediği kolonilerdir (WHO, 2010). Nadiren laktoz ya da sükroz fermentasyonu yapan *Salmonella* suşları sarı zon içerisinde siyah koloniler oluşturmaktadırlar (Wray ve Wray, 2000). XLD agarda üreyen diğer bakteriler de genellikle sarı renkli koloniler oluşturmakta ve agarı da sarı renge dönüştürmektedirler. *Edwardsiella* gibi bakteriler *Salmonella*'ya benzer koloniler oluşturabilmektedirler (WHO, 2010). Selektif besiyerlerindeki koloni morfolojisinin tanı için kesin sonuç vermediğini; sadece gerekli testlerle koloni identifikasyonu için kolaylık sağladığını da bilmek gerekmektedir (Mikoleit, 2010).

1.4.4. Biyokimyasal Konfirmasyon: Salmonellaların biyokimyasal konfirmasyonları hem konvansiyonel testlerle hem de geliştirilmiş ticari kitlerle yapılabilmektedir.

Microgen GN-ID, *Enterobacteriaceae* ve diğer gram negatif bakterileri identifiye etmek için (oksidaz negatif ve pozitif) 12 (GN A) veya 24 (GN A+B) lü kuyucuk içerisine standardize edilmiş ve minyatür hale getirilmiş 12 adet biyokimyasal testten oluşmaktadır. Bu kit ile klasik identifikasyon metotlarına göre daha hızlı şekilde *Salmonella* spp. identifikasyonu yapılabilmektedir.

Her kuyucuk; *Enterobacteriaceae* ailesinin identifikasyonunda kullanılan, yayımlanmış veritabanlarının geniş bilgisayar analizlerine dayanarak seçilmiş 12 adet standartize edilmiş biyokimyasal maddeden birini içermektedir. Her bir kuyucuğa organizmanın FTS ile süspansiyonu inoküle edilir ve 37°C'de 24 saat inkubasyona bırakılır. Eğer bu kimyasal içerikler organizma tarafından metabolize olursa inkubasyon sırasında veya sonrasında ek spesifik ajanlar eklenerek renk değişiklikleri gözlemlenmektedir. Test edilen organizmayı tanımlamak için metabolize olan testler değerlendirilip, Microgen identifikasyon sistem yazılımı (MID-60) kullanılmaktadır (Awong-Taylor ve ark, 2008; Microgen GN ID, 2007).

1.5. Serotipler

Yaklaşık seksen yıl gibi uzun bir süre önce White, Kauffmann ve Le Minor tarafından kurulan tiplendirme sisteminde günümüzde yaklaşık olarak 2,500 *Salmonella* serovarı mevcuttur, bunlar somatik ve flagella antijenlerine göre karakterize olurlar (Wray ve Wray, 2000; Popoff ve ark., 2001; Tindall ve ark., 2005; Foley ve Lynne, 2008; OIE 2010).

Salmonellalar yüksek DNA benzerliği gösteren analizlerin sonucu olarak (Popoff ve ark., 2004); *S. bongori* ve *S. enterica* olmak üzere iki türe ayrılmaktadır. *S. enterica* subspecies *enterica*'ya ait serotipler sıcak kanlı omurgalılara adapte olmuştur (kuşlar ve memeliler), öte yandan *Salmonella bongori* alt türleri temel olarak soğuk kanlı omurgalılara adapte edilmiştir (Uzzau ve ark., 2000; Porwollik ve ark., 2004; Singh, 2013). 2007 itibariyle, 2,557 *S. Enterica* serovarı ve 22 *S. bongori* serovarı tanımlanmıştır (Mikoleit, 2010; WHO, 2010; OIE 2010). ve yeni tanımlanan serotipler bu şekilde sınıflandırılmaktadır (WHO, 2010). *S. enterica* subsp. *enterica* adı ön ad olarak tüm serovarlarda kullanılmaktadır. Örneğin; *S. enterica* subsp. *enterica* serovar. Enteritidis, *Salmonella* serovar. Enteritidis ya da *Salmonella* Enteritidis olarak adlandırılabilirler. Enterica alt türleri ile ilişkilendirilen çoğu serovarlara bir isim verilmiştir (örn. Typhimurium), diğer alt türler ise yalnızca antijenik formülleriyle

bilinirler (örn. IIIb 61:-:1, 5, [7]) (Edwards ve ark., 2002; Jacobsen ve ark., 2011; Grimont ve Weill, 2007).çizelge 1.1’de gösterilmiştir

Çizelge 1.1: *Salmonella* türleri ve alttürlerine ait serovarların sayısı (1. (Popoff ve ark., 2000), 2. (Popoff ve ark., 2003), 3. (Guibourdenche ve ark., 2010)

Türler		
<i>S. enterica</i>	Allt türler	Serovar Sayıları
	subsp. <i>enterica</i>	1547
	subsp. <i>salamae</i>	513
	subsp. <i>arizonae</i>	100
	subsp. <i>diarizonae</i>	341
	subsp. <i>houtenae</i>	73
	subsp. <i>Índica</i>	13
<i>S. bongori</i>		23
Toplam		2610

1.5.1. Salmonellaların Antijenik Yapıları

Salmonella serotipleri, lipopolisakkarit (O), flagellar protein (H), ve bazen kapsüler (Vi) antijenlerine dayanan üç yüzey antijeniyle belirlenmekte (Grimont ve Weill, 2007; WHO, 2010) ve serovar, Kauffman–White şemasında antijenik formül referansı ile simgelenmektedir (Pui ve ark., 2011).Türlerde kendi içinde serovarlara ayrılmıştır. Bu taslağın 1934 yılında tanıtılmasından beri, 46 O-antijeni ve 114 H-antijeni tanımlanmıştır. Bu antijenlerin biyokimyasal özelliklerle kombinasyonu 2555 *Salmonella* serovarının ya da serotipinin tanımlanmasını sağlamıştır (Shipp ve Rowe 1980; Popoff ve ark., 2004). Bir serovar içerisinde, virulansta farklılık gösteren gruplar olabilir (Popoff ve ark., 2001; Tindall ve ark., 2005; OIE, 2010).

Somatik ‘O’ antijenleri: Bütün *Salmonella* serotiplerinde bulunan bu antijenik yapı, polisakkarit özelliğinde olup, hücre duvarında protein ve lipidlere bağlı olarak bulunur. Isıya dirençlidir. Formolle aktivitesi azalır veya kaybolur (İzgür, 2006). O antijenleri, çeşitli O faktörlerinin kimyasal yapısı (bakteriyel dış membrandaki lipopolisakkaritin spesifik kısmı) belirlenmiştir ve bazı O faktörlerinin toplanması için temel olan enzimlerin üretimine dahil olan genlerin yerleri belirlenmiş, klonlanmış veya dizilmiştir (Macnab, 1987; Grimont ve ark., 2000). Spesifik antiseruma karşı reaktivitesi *Salmonella* serotiplendirmenin temelini oluşturur. Birçok O antijenleri tek bir hücrenin yüzeyinde bir arada açığa çıkabilirler (Grimont ve Weill, 2007).

Çeşitli O antijenleri için spesifik olan antikorların kullanıldığı aglütinasyon *Salmonella*'yı altı alt gruba ayırmaktadır: A, B, C1, C2, D ve E. Örneğin, *S. Paratyphi* A, B, C ve *S. Typhi*, O antijeni sırasıyla A, B, C1 ve D sero gruplarını açığa çıkarır (Abatcha ve ark., 2014).

Flagellar ‘H’ antijenleri: Hareketli *Salmonella*'larda bulunan protein yapısında, ısıya duyarlı (60°C'de inaktive olan), formole dirençli antijenik yapılardır (İzgür, 2006). H antijenleri flagella ile taşınır. Bunlar, flagellin denilen protein alt ünitelerinden oluşur. H antijenleri tipik olarak *Salmonella*'da difaziktir. İki genetik sistemin avantajı (genler kromozoma uzaktır), farklı flagellinlerin açığa çıkarılmasının organizmanın konağın defanslarına karşı hayatta kalmasına yardımcı olmasıdır (Grimont ve ark., 2000). "H" antijeninin yapısında da birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler 2 alt grup altında incelenir. Faz-1 adı verilen antijenik faktörler, spesifik özellikte olup sadece bir *Salmonella* türünde veya birbirine yakın birkaç *Salmonella* serovarında bulunmaktadır. Bu antijenik faktörler, a, b, c,.....z' ye kadar küçük harflerle ve alfabe harfleri yeterli olmadığından z₁, z₂, z₃,....olarak adlandırılmışlardır. Faz-2 adı verilen ve nonspesifik özellikte olan "H" antijenik faktörleri ise; birçok *Salmonella* türünde bulunmaktadır. Bu antijenik faktörler de 1, 2, 3, 4,... olarak isimlendirilmişlerdir (İzgür, 2006).

Flagellar veya H antijenleri, güçlü bir şekilde immünojeniktir ve antikor oluşumunu hızlıca ve infeksiyon veya bağışıklığı takip eden yüksek titrelerde indüke eder. Birçok grup tek zamanda iki farklı flagellar kompozisyonu açığa çıkartabilir, bu da iki “H” fazına yol açar, diğer antijenler de görülebilir (FAO, 2010b). Salmonella'ların "H" antijen grubundan sadece bir çeşit Faz antijen faktörlerini içerenler monofazik; hem Faz-1 ve hem de Faz-2 antijenlerini birlikte taşıyanlar ise difazik bakteriler olarak adlandırılmaktadır (İzgür, 2006).

Yüzeysel antijenler: Vi antijeni lineer bir homopolimerdir, 2- acetamido-2-deoxy-D-galacturonic asit, α (1–4) bağlarıyla bağlıdır (Grimont ve ark., 2000). Bu grup antijenler, bakterinin hücre duvarının dışında bulunan antijenik yapılardır. Bu kapsüller polisakkarit *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* ve *S. Dublin* serovarlarında bulunur (Grimont ve ark., 2000; İzgür, 2006; SSI, 2013). Üç lokus (*viaA*, *viaB* ve *ompB*) Vi üretiminin genetik kontrolünde yer alır. Lokus *via* ve *ompB* Vi üreten türlerle sınırlı değildir ve Vi sentezinin regülasyonunda da rol alırlar. Lokus *viaB* yalnızca Vi antijeni üretebilen gruplarda bulunur (Grimont ve ark., 2000). Bu antijeni taşıyan suşlar, anti-O serumları ile aglutine olamazlar. Çünkü, ‘O’ somatik antijenini maskelerler. Bu nedenle bu tür bakterilerin 60°C’de ısıtılmasıyla ‘Vi’ antijeni ayrılır, dolayısıyla etkisi kaldırılır: Ancak ‘Vi’ antijeninin kendisi bu ısıda tahrip olmaz (İzgür, 2006).

Salmonella etkeni antijenik formülüne göre tanımlanırken; öncelikle somatik antijene ait faktörler, varsa yüzeysel antijeni, hareketli ve difazik ise Faz-1 ve Faz-2 antijenik faktörleri sıra ile yazılır. Örnek: *S. Typhi* 9,12(Vi):d:-, *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:1,2 (İzgür, 2006; Grimont ve Weill, 2007).

1.6. Serotiplendirme

Serotiplendirme, bakterilerin epidemiyolojik karakterizasyonu için kullanılan kesin bir tanı yöntemidir. *Salmonella* suşlarının rutin tanısı için ilk basamak hücre yüzey antijenlerini, mono-, poli-, omnivalan serumları içeren antiserum setlerini kullanmaktır. Bakteriyel kültürler serotiplendirmede ve antimikrobiyal duyarlılık ölçümünde gerekli ve önemlidir. *Salmonella* infeksiyonlarının artmasıyla, serotiplendirme yöntemi düzenli tanı ve infeksiyon kaynağını araştırmak için daha da önemli bir hale gelmiştir (Imen ve ark., 2011).

Salmonella serotiplendirme sistemi muhtemelen şimdiye kadar geliştirilmiş en iyi fenotipik bakteriyel tiplendirme sistemidir (WHO, 2010). Bu yöntem *Salmonella*'nın şimdiki tiplendirmesinin temellerini oluşturan 80 yıllık bir sistemdir. Serolojik tiplendirme her bir izolatın ayrı ayrı Kauffmann-White şemasına dayalı olarak test edilmesiyle yapılır. Bu Kauffmann-White metodu dünya çapında kullanılmaktadır ve *Salmonella* serotiplendirmesinde altın standart olarak gösterilmektedir (Wattiauve ark., 2011)

Salmonella serotiplendirmesi bu suşların yüzey antijenlerinin (LPS, O antigen), flagellar antijenlerinin (protein, H-antigen) ve H antijeninin faz-değişiminin ayrımıyla başlar. Serotiplendirme prensibinde *Salmonella*'nın O ve H yüzey antijenlerine spesifik aglütinasyon profilleri değerlendirilir. Tipik olarak bir suşun serotip ismi *Salmonella*'nın asıl ismi olarak değerlendirilmektedir (Schnaitman, ve Klena, 1993; Tenover ve ark., 1997; Wattiauve ark., 2011).

Şema ile 1934 yılında tanışılması birlikte, 64 O antijeni ve 114 H antijeni identifiye edilmiştir (Grimont ve Weill, 2007; McQuiston ve ark., 2008). 1998'de, 2501 serotip WKL şemasında sunulmuştur (1443 'ü *S. enterica* ve 20'si *S. bongori*). *S. enterica*'da subspecies *enterica*'ya ait olan serotiplerin 1478 serotip'e ulaşmasıyla, 498 subspecies *salamae*, 327 subspecies *diarizonae*, 94 subspecies *arizonae*, 71

subspecies *houtenae* ve 12 subspecies *indica* serotipleri isimlendirilmiştir (Popoff ve ark.,1998; Bell ve Kyriakides, 2002).

Serolojik tanı için *Salmonella* suşlarının Poly 'O' serumu ve 'H' antiserumu ile pozitiflik vermesinden yararlanır. Biyokimyasal olarak aynı karakterizasyonu gösteren suşların, poly 'O' antiserumu ve poly 'H' antiserumu ile aynı profilde pozitiflik vermesi beklenmektedir (Hendriksen ve Larsen, 2004; WHO, 2010).Poly 'O' antiserumu, herhangi bir *Salmonella* spp. ile aglütinasyon verirken; poly 'H' antiserumu sadece hareketli serotiplere özgü, spesifik aglütinasyon karakteri göstermektedir. (Buxton ve Fraser, 1977).

Genel olarak, *Salmonella* suşları H antijenlerinde iki faz içerirler; ama bunun yanında fazsız, tek fazlı ya da üç fazlı varyant suşların da olduğu bilinmektedir (Hendriksen ve Larsen, 2004). Ayrıca bir *Salmonella* türü aynı zamanda yapılan bir testte sadece tek bir fazının pozitifliğini gösterir. Örneğin: *S. Typhimurium* (1,4,[5],12:i:1,2) yapılan ilk faz testinde, ya fazlarından ilki olan yapılan 'i' fazının ya da ikinci fazı olan '1,2' fazının pozitifliğini gösterir (SSI, 2013).

Ayrıca bir *Salmonella* türü tek bir fazını ifade edebilir. Örneğin *S.Typhimurium* (1,4,[5],12:i:1,2) faz 1 antijeni olarak i veya faz 2 antijeni olarak 1,2 ifade edilir. *Salmonella* kültüründe faz 1 olarak adlandırılan baskın faz yarı katı agar üzerinden belirlenebilir. Faz 2 antijenler ise; faz 2 antijenin ifadesine izin veren ve faz 1 antijeni baskılayan antiserum yarı katı agara (swarm agar) ilavesiyle tespit edilir (SSI, 2013)

1.7. Epidemiyoloji

Salmonellozis dünyada her yerde bulunabilir ve intensif hayvan yetiştiriciliğinin uygulandığı yerlerde en yaygındır (OIE, 2010). Hayvanlardan insanlara kadar çok geniş bir konak çeşitliliğine sahip olan *Salmonella* serotipleri dünyada en yaygın gıda kaynaklı hastalık etkenleridir. İnsanlarda *Salmonella* kaynaklı akut gastroenteritis insidansının dünya çapında yılda 1, 3 milyar vaka ve 3 milyon ölüm tahmin edilmektedir, sadece Amerika'da, her yıl 1, 3 milyon olduğu düşünülmektedir ve bunların arasından 600 ölüm vakasına rastlanılmıştır (Coburn ve ark., 2007; Van ve ark., 2007; Bobo ve Dubberke, 2010; Chimalizeni ve ark., 2010; CDC, 2011; Cummings ve ark., 2011). Genellikle *Salmonella* ve *Campylobacter* nedenli gıda zehirlenmelerine ise tüm dünyada yüksek oranda rastlanmaktadır (Gibson, 1965). Bu fakültatif intraselüler patojen öncelikli olarak intestinal bir bakteri olsa da, yaygın olarak dışkı kontaminasyonu olmuş ortamda bulunmaktadır (Davison, 2005).

Salmonella çevrede yaygındır ve genellikle çiftlik atık sularında, lağımlarda ve dışkı ile kontamine olmuş çevrelerde bulunmaktadır (OIE, 2010) *Salmonella* tüm evcil hayvan türlerini sıklıkla da genç hayvanları, hamile ve emziren hayvanları etkilemektedir (WHO, (GFN), 2010; OIE, 2010). Evcilleştirilmiş hayvanlar arasında sığır ve koyunlar, *Salmonella*'nın en önemli rezervuarlarını oluşturmakta ve birçok serotipin sebep olduğu hastalıklara duyarlıdırlar (Rodriguezve ark., 2006; Brichta-Harhay ve ark., 2008). Salmonellalar tüm omurgalıları enfekte etmekte ancak enfeksiyonun ciddiyeti; bir serovardan diğerine, konak özelliğine göre değişkenlik göstermektedir (Singh, 2013). Bu sebeple Salmonellalar “evrensel patojen” olarak kabul edilmektedir (Fedorka ve ark., 2000). Çiftlik yönetimi ve entansif yetiştiricilik çiftlik hayvanlarında *Salmonella* enfeksiyonunun yayılmasında ve klinik hastalığı artırmasında yakından ilişkilidir (Kidanemariam ve ark., 2010).

Salmonella 'lar, evcil ve vahşi hayvanlar, kanatlılar ve sürüngenler (zoonotik) olmak üzere hemen hemen tüm canlılarda karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca, *Salmonella*'lar sağlıklı koyun, sığır kesimhaneleri ve sütçü ineklerin çiftliklerinde de

bulunmaktadır (Fegan ve ark., 2004; McEvoy ve ark., 2003). Bu mikroorganizma sıcak ya da soğukkanlı hayvanların sindirim sisteminde; safra kesesi ve bağırsaklarda asemptomatik olarak yer almakta ve çevreye dışkılama vasıtası ile yayılmaktadır. Hayvanlar bu etkeni latent olarak mezenterik lenf nodüllerinde ve tonsillerinde taşımaktadırlar (Dvorak ve ark., 2008). Bazı hayvanlar klinik semptom göstermeksizin enfekte (subklinik) olabilirler ve dışkılarında az miktarda taşıdıkları *Salmonella* ile yem ve suları kontamine ederek diğer hayvanlarda da enfeksiyona oluşturlar (Gibson, 1965; WHO, 2010); ancak en yaygın olarak klinik olarak etkilenen ve duyarlı olan grup çok genç hayvanlar, gebe veya emziren hayvanlardır (OIE, 2010; Wray ve Davies, 2000) ve enfeksiyon genellikle stresli bir olaydan sonra meydana gelmektedir. Ruminantlar, özellikle de koyun ve sığırlar *Salmonella* etkeni için önemli rezervuar olmaları nedeniyle, gıda zehirlenmelerinde karşılaşılan en önemli geçiş kaynağıdır (Brichta-Harhay ve ark., 2007; Brichta-Harhay ve ark., 2008). *Salmonella* rezervuarı yalnızca hayvanlar arasında, doğrudan veya böcek vektörleri gibi nedenlerle dolaylı olarak geçişle sürmez, uzun süreli çevresel kontaminasyon da etkilidir (Wales ve ark., 2010).

Hayvanlarda *Salmonella* enfeksiyonunun en önemli kaynağı ve kalıcı olmasının nedeni, hayvanların dışkıları ile kontamine olan yemleri ve suları tüketmeleridir. Amerika'da besi sığırı yetiştiriciliği yapılan çiftliklerde *Salmonella* prevalansının %3-5 oranında olduğu bildirilmiştir (Thorns, 2000). Sığırlarda olduğu gibi, koyunlarda da *Salmonella* prevalansının da düşük olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, Amerika'da koyun karkasları araştırıldığında %1,5 oranında *Salmonella* pozitifliği saptanmıştır (Beach ve ark., 2002). Buna rağmen *Salmonella* enfeksiyonu büyük ekonomik kayıplara ve üretim problemlerine de neden olmaktadır. (Analytica, O. 2012). *Salmonella* serotipleri; konak sınırlı, konak spesifik, ve genel serovarlar olarak ayrılabilir; bu da epidemiyoloji için önemlidir. Konak bağımlı serovarlar baskın olarak konak türleri ile ilişkilendirilir, ancak diğer türlerde de hastalığa neden olabilirler (Uzzau ve ark., 2000; Hoelzer ve ark., 2011). Bu serotiplerin bazıları koyun ve sığırlar ile ilişkilidir. Örneğin; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin (*S. Dublin*) ve *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) sığırlarda gözlenirken bazen de insan ve domuzlarda enfeksiyona neden olmaktadır (Siqueira ve

ark., 2003; Pullinger ve ark., 2008; Zadernowska ve ark., 2012). Aynı şekilde klinik belirtiler gösteren *Salmonella* enfeksiyonu; *S. Diarizonae* ve *S. Typhimurium* tarafından meydana gelmektedir. Bazı arizonae ve diarizonae alt türlerin serovarları, hindilerde ve koyunlarda hastalıklarla ilişkilendirilirken, diğerleri özgürce dolaşarak veya sürüngenler ve amfibiklerle ilişkilendirilmiştir (OIE, 2010). *S. Typhimurium* tüm evcil hayvanlardan izole edilmiş en yaygın serovar olma özelliğini taşır. Buna karşın, konak spesifik serotipler, örneğin sadece belirli konakları etkileyen serotipler vardır; örneğin kümes hayvanlarında *S. Gallinarum* veya koyunlarda *S. Abortusovis*. (Snoeyenbos, 1994; Uzzau ve ark., 2000). Serovar-konak adaptasyonu ve serovar-konak spesifitesi, klinik açıdan *Salmonella* serovarları arasındaki farklılıkları da tanımlamaktadır. (Evangelopoulou ve ark., 2013; Wallis, 2006). Bu nedenle bir serovarin diğerinden farklı konak tercih etme mekanizmaları mutlaka ortaya konulmalıdır (Singh, 2013). Sığır ve koyunlardan sıklıkla izole ve identifiye edilen serotipler çizelge 1.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2: Sığır ve koyunlarda 1999-2013 yılları arasında en sık görülen *Salmonella* serotipleri: (Wray C ve Wray A, 2000; Uzzau ve ark., 2000; McEvoy ve ark., 2003; DEFRA, 2005; İzgür, 2006; APHIS, 2006; Van ve ark 2007; Pullinger ve ark., 2008; OIE, 2010; Zadernowska ve ark 2012; Gragg ve ark., 2013; Rodriguez-Rivera ve ark 2014)

Sığır serotipleri	Koyun serotipleri
<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Diarizonae</i>
<i>S. Dublin</i>	<i>S. Typhimurium</i>
<i>S. Anatum</i>	<i>S. Dublin</i>
<i>S. Newport</i>	<i>S. Abortusovis</i>
<i>S. Montevideo</i>	<i>S. Anatum</i>
<i>S. Agama</i>	<i>S. Brandenburg</i>
<i>S. Derby</i>	<i>S. Hindmarsh</i>
<i>S. Kentucky</i>	<i>S. Oranienburg</i>
<i>S. Livingstone</i>	<i>S. Montevideo</i>
<i>S. Indiana</i>	<i>S. Agama</i>
<i>S. Reading</i>	<i>S. Livingstone</i>
<i>S. Meleagridis</i>	<i>S. Indiana</i>
	<i>S. Havana</i>
	<i>S. Derby</i>

Salmonella enfeksiyonları sığırlarda önemli mortalite nedenidir ve sub-klinik olarak enfekte sığır sıklıkla bulunmaktadır. Bu yüzden sığırlar insan enfeksiyonlarında önemli bir rezervuardır. *Salmonella*'nın süt ürünleri çiftliğine girişi; satın alınmış sığırlar (yeni hayvan girişi), kontamine yem ya da sular, kemirgen, kuş gibi vahşi hayvanlar, böcekler ve insan trafiği gibi birçok yoldan olabilmektedir (Sanchez ve ark., 2002; Nielsen ve ark., 2007). Bu yüzden, *Salmonella*'nın bir çiftlikte bulunması beklenmedik bir bulgu değildir.

Sığırları etkileyebilecek birçok *Salmonella* türü vardır. *Salmonella* türleri birçok klinik belirtiyeye yol açabilmektedir. Bunlar arasında ishal ve muhtemel dizanteri; özellikle genç hayvanlarda görülmektedir. Ayrıca eklem enfeksiyonları, kronik zatürre, anoreksiya ve septisemiden kaynaklı ani ölümler, endotoksemi ve abort gibi bulgular da görülmektedir. *Salmonella* enfeksiyonu ile ilişkilendirilen abortlarda, enfeksiyon ihtimali olsa da sığırlarda bu ihtimal düşüktür (Cummings ve ark., 2009a; Hoelzer ve ark., 2011b). Gruplar, enfeksiyon dozu ve konağın bağışıklığı gibi etkenler hastalığın ortaya çıkışını değiştirebilir. Çoğu süt ürünlerinde, Salmonellosis fırsatçı bir enfeksiyondur. Hayvancılıkta klinik belirtiler tipik olarak maruz kalmadan 6–24 saat sonra açığa çıkar ve ishal, 1 ila 7 gün arasında süren ateş, dehidrasyon, iştahsızlık, azalan süt üretimi, kötü kokulu dışkı ve dışkıda mukus veya kan gibi belirtiler gösterir (Divers ve Peek, 2008).

Enfekte sığır organizma yayabilir ve klinik iyileşmeden sonra bu sürebilir. Asemptomatik yayıcılar asla belirti göstermezler. Bir inek enfekte hale geldikten sonra, enfeksiyonun süresi ve dışkı saçılım büyüklüğü halk sağlığı riski açısından önemli belirleyicidir (Wray ve Davies, 2000; You ve ark., 2006; Cummings ve ark., 2009a). Dışkıyla saçılım, sürüdeki diğer hayvanlar için potansiyel bir enfeksiyon kaynağıdır. Buzağular arasında hastalığın yayılımı, sıklıkla hızlı olmaktadır. Hayvan hareketleri özellikle de buzağı ticareti, açık alanlarda yem depolanması, yüzlek sulara hayvanların ulaşabilmesi, atıkların gübreden ziyade bulamaç şeklinde atılması, gübre alımı, mevsim dışı buzağılama dönemi ve kolostrum havuzu oluşturulması gibi sebepler de yeni *Salmonella* enfeksiyonları için risk faktörü oluşturmaktadır. Sonuç olarak, bir çiftlikteki *Salmonella* saçılımı enfeksiyonun kazara başka bir çiftliğe

bulaşmasına sebep olabilir ve bu da enfeksiyon siklusunun devam etmesine sebep olmaktadır (Cummings ve ark., 2009a; Cummings ve ark., 2010). *S. Dublin* gibi konak spesifik serotipler, hayvanlar arasında değişik zaman periyotlarında (intermitant) saçılmaktadırlar. Böyle serotiplerle enfekte hayvanlar, geniş konak spektrumuna sahip serotiplerle enfekte hayvanlardan daha fazla asemptomatik taşıyıcı olma özelliğine sahiptirler. Dahası, *Salmonella* serovarının uzatılmış bir süreyle hayatta kalması mümkündür; bir çalışmada, *S. Newport*'un gübrede, kış boyunca en az 6 ay hayatta kaldığını göstermiştir (Clegg ve ark., 1983), bir başka çalışmada ise *S. Newport* 300 gün boyunca 4°C'de hayatta kalmıştır. Bu da daha soğuk mevsimlerde gübre yayılması göstergesidir (Toth ve ark., 2012). Rendering *Salmonella* serovarlarını öldürür; ancak post-işleme kontaminasyonu, rendering yem ürünlerinin kontaminasyonunun %50'sini oluşturur. Salmonellosis klinik salgınları ve dışkı saçılımı arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır (McGuirk ve Peek, 2003).

Salmonellozis salgını bir çiftlik için ciddi ekonomik sonuçlar doğurabilir ve çiftlik sahibinin yanı sıra halk sağlığına da etkileri olabilir. Böylece sığır operasyonlarındaki ekonomik kayıpların başlıca nedeni artmış mortalite, performans kayıpları, sürünün içinde kilo kaybı, tedavi ve enfeksiyon kontrolü ile ilgili doğrudan ve dolaylı maliyetler vardır (Huston, ve ark., 2002; Rushton, 2009). *Salmonella* enfeksiyonuna atfedilebilen ölüm oranları özellikle genç hayvanlarda yüksektir ve genellikle büyük çaplı tedavi gerektirmektedir. Danalar, ineklerden daha sık enfekte olmaktadır. Enfeksiyon rotası dışkı-ağız yoludur ve çevrede sağlıklı koşullarda, yani buzağılama tezgahlarında buzağuların genellikle maruz kaldığı koşullarda oluşmaktadır. *Salmonella* enfeksiyonunun danalarda önemli ağırlık kayıplarına (kurtarma sonrası kilo kazanmak mümkün gibi görünüyorsa da) sebep olduğu pek çok çalışmada bildirilmiştir. Ayrıca *Salmonella* enfeksiyonu genellikle artmış yem maliyetlerine neden olmaktadır. Bunun nedeni de azalmış yem konversiyonudur (Rushton, 2009).

S. Typhimurium ve *S. Dublin* sığırlardan izole edilen en yaygın serovarlar olarak bilinir ancak bu durum ülkeler arasında değişiklik göstermektedir (Wray ve Davies, 2000). Sığırlarda *S. Newport*; koyun ve keçilerde *S. Dublin*, *S. Anatum*, ve *S. Montevideo* farklı serovarlar olarak sayılabilir (Davison, 2005).

S. Typhimurium yaygın olarak iki aylıktan küçük danalarda görülürken, *S. Dublin* daha yaşlı danalarda ve yetişkin sığırlarda enterit salgınlarıyla ilişkilidir (Davison, 2005). Danalarda ve kuzularda, *S. Dublin* genellikle endemik seyirlidir. *S. Typhimurium* ise enfekte çiftliklerde sporadik seyirlidir. Hayvanlarda ortaya çıkan hastalığı hızlandıran durumlar arasında gıda eksikliği ve susuzluk, minimal beslenme düzeyleri, uzun nakliye süreleri, yavrulama ve antibiyotik profilaksisi ve besi yerlerinde karışıklık ve kalabalık stresi bulunmaktadır (Davison, 2005).

Koyunlarda *Salmonella* enfeksiyonu dünyada birçok ülkede rapor edilmiştir. Bir *Salmonella* alt türü olarak düşünülen *Salmonella* Abortusovis ilk olarak Almanya'da 1921 yılında bir abort vakasından, ardından da İngiltere'de izole edilmiştir (Bosworth ve Glover, 1925). İngiliz izolatının özellikleri, Lovell'in Almanya'da 1931'deki izolatlarıyla paraleldir. Bu tarihten itibaren diğer birçok *Salmonella* serovarı koyunlarda dünyanın pek çok yerinde ölümler ve abortlarla ilişkilendirilmiştir. Yıllık olarak etkilenen sürü miktarı düşük olsa da, bu sürüler içerisindeki kayıplar büyük rakamlarda olabilmektedir. Çünkü tek bir salgında birçok hayvan etkilenmektedir. Koyun Salmonellozisinin çiftlik hayvanlarındaki diğer türlerdeki Salmonellozis'ten çok daha az ekonomik önemi vardır (Wray ve Linklater, 2000).

S. Typhimurium koyunlardaki en yaygın *Salmonella* serovarı olarak gözükmektedir. Predominant faj bildirimini yapmış ülkeler arasında farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin Avustralya'da DT135 ve DT9 baskınken, İngiltere'de DT104 en yaygın tip olarak bildirilmiştir. *S. Abortusovis* birçok ülkede tanımlanmıştır ve bazı vakalarda çok ciddi bir sorun oluşturmaktadır. *S. enterica* IV alt grubuna ait olan *S. Arizonae* (O 61: k: 1, 5, 7), ilk olarak ABD'de koyunlardan izole edilmiştir ve ardından İngiltere, Kanada, Norveç ve Almanya gibi birçok ülkeden bildirim yapılmıştır (Wray

ve Linklater, 2000; Cotruvo ve ark., 2004). Birleşik Krallık'ta koyunlarda serotip IIIb: 61:k:1,5,[7] en yaygın serotip ve koyunlarda raporlanmış *Salmonella* enfeksiyonlarının genel olarak %60'ından fazlasını oluşturmaktadır (Ahvla, 2012).

S. Abortusovis konak-spesifik olduğu için, enfekte bir koyundan bir sürüye değişmeden bulaşabilir (Ivanov ve ark., 1966). Etkenler genellikle ağızda yer alır ve tüm olasılıklar dahilinde, abortlar gerçekte belirgin olmadan uzun süre önce meydana gelir. Angelachov (1964) zayıf beslenme gibi çevresel faktörlerin *S. Abortusovis*'in neden olduğu abortlarla ilişkili olduğunu bildirmiştir. Cooper (1967) açlığın, latent enfeksiyonu aktive edebileceğini ve Baker ve ark. (1971) ise *S. Dublin*'in neden olduğu kayıpların dişi koyunlara hareket ettirilmeden önce ekstra yem verilerek azaltılabileceğini belirtmişlerdir.

Diğer *Salmonella* serovarlarında enfeksiyonun çok kaynağı vardır; örneğin, gıda, su, diğer hayvanlar, yabani kuşlar, insanlar. Ancak deneysel oral enfeksiyon oluşturmadaki bir takım zorluklar sebebiyle enfeksiyon konjunktival ya da burun yoluyla da oluşturulabilmektedir (Wray ve Linklater, 2000). Doğal enfeksiyon büyük olasılıkla ağız yoluyla olmaktadır ve ardından gelen olaylar muhtemelen sığırlar için tarif edildiği şekilde gelişmektedir.

S. Abortusovis ile çevresel enfeksiyonlar, birçok farklı rotada meydana gelebilir ve çoğu durumda hastalık gelişmez. Pardon ve ark. (1980)'un intragastrik enfeksiyonların güvenilirliği ile ilgili raporuna göre, subkutan rota daha sürekli sonuçlar verir. 2.5×10^7 ve 10^{10} koloni-oluşturan birim (cfu) arasında değişen dozlarla, 64. ve 84. gebelik günlerinde enfekte edilmiş 11 dişi koyundan 7'sinde abort meydana gelmiştir.

Salmonella enfeksiyonları, koyun çiftliklerinde ekonomik ve potansiyel kamu sağlığı riski meydana getirmektedir. Ancak serotipler arasında dikkate değer farklılıklar vardır. Serotip *Abortusovis* ile ilgili enfeksiyonlar büyük çapta ekonomik kayıp nedenidir (Hoelzer ve ark., 2011).

1.8. Patogenezis

Salmonella, dünya çapında gıdadan kaynaklı hastalıkların en önemli nedenlerinden biridir. Ayrıca hayvancılıkta önemli bir patojendir ve hayvanlardan insanlara geçebilen enfeksiyonlara neden olmaktadır (zoonotik enfeksiyonlar). Uzun çevresel dayanıklılığı olan çoklu-konak patojeni olarak, *Salmonella* serovar çalışması sığırlarda ve koyunda uygundur. *Salmonella* türleri fakültatif intraselüller patojenlerdir ve çeşitli konak hücre türlerini etkileyerek immun hücrelerin çeşitli popülasyonlarında hayatta kalabilir ve çoğalabilirler (Jantsch ve ark; 2011). Bulaşıcı süreçler esnasında uyarılan immunopatoloji, hem *Salmonella* virülens faktörleri hem konak yanıtlarının sonucudur. (De Jong ve ark., 2012).

Sıklıkla sağlıklı koyun ve sığırların derilerinde bulunmakta olan *Salmonella* 'lar özellikle karkas kontaminasyonun da ana kaynağını oluşturmaktadır (Barkocy-Gallagher ve ark., 2003). Bu patojenler dışkıda yerleşik olarak bulunmaktadır. Bu sebeple hem patojen kontaminasyonuna, hem de uzun süreler boyunca hayvanların taşıyıcı olmalarına neden olmaktadır (Duffy ve ark., 2001). Yüzeysel kontaminasyonu başarılı bir şekilde kontrol edilmesine karşın, *Salmonella* kıyma tarzı gıdalarda hala kalıcı bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır (Samuel ve ark., 1981).

Enterit vakalarında bulaşma dışkı-ağız yoluyla olmaktadır. Kontamine gıda veya su ya da enfekte hayvanlarla hayvanın doğrudan temasıyla oluşmaktadır. Sindirimden sonra, organizma sindirim kanalında kolonize olur; enterositlerde ve lenfoid dokularda çoğalarak işgal eder (Davison, 2005). Salmonellozis kronik veya akut hastalık olarak ortaya çıkabilmektedir. Kronik veya enterik form, gastrointestinal yolu etkileyen lokalize hastalık şeklinde olur ve organizmaların mikrovilli vasıtasıyla lamina propria ile mukozal hücrelerin sıkı bağlantıları arasında göç etmesiyle başlar. Mukozal hücreler hasar görür ve fibronekrotik plaklar sindirim kanalı duvarında oluşur. Mukozal entegrasyon kaybı, sindirimde kötü asimilasyona ve vücut sıvı kaybına neden olmaktadır (Ekperigin ve Nagaraja, 1998).

Salmonellozis'in akut veya septisemik formu, birçok vücut sistemini etkileyen genel bir hastalık olarak ortaya çıkar (Aiello, 1998; Ekperigin ve Nagaraja, 1998). *Salmonella*'dan birçok hayvan türü etkilenebilir, genellikle de bariz semptomlar göstermezler. Asemptomatik olarak birçok hayvanda bağırsak ya da safra kesesinde taşınırlar ve sürekli olarak veya aralıklarla dışkıda büyük sayılarda *Salmonella* bırakırlar. Dışkıdaki *Salmonella* bu yüzden önemli bir bulaşma kaynağıdır. Bu mikroorganizma gerçek bir çoklu-konak patojeni ve çevresel koşullara uzun süreli dayanıklılığıyla bilinir (Murray, 1991).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar sığır ve koyunlarda, *Salmonella* için potansiyel diğer bir kaynağın da lenf yumruları (mezenterik lenf nodülleri) olduğunu göstermiştir (Samuel ve ark., 1981). Yakın zamanda oluşan ancak giderken artan kanıtlara göre, sığır ve koyunlarda lenf nodularında *Salmonella*'nın saklandığı gösterilmektedir ve sığır kıyması ile birleştiğinde (Arthur ve ark., 2008; Haneklaus ve ark., 2012), bu bakterilerin döküntü yapmadığını ancak stres veya immunospresyon sonucunda re-aktive duruma geçebildiklerini göstermektedir. Fomitler ve mekanik vektörler (böcekler) *Salmonellayı* yayabilirler (Gragg ve ark., 2013).

Kesim esnasında *Salmonella* taşıyan hayvanların bağırsaklarında ve dışkı ile temas eden dış yüzeylerinde, tüylerinde, derilerinde yüksek sayıda organizma bulunur (Bryan ve Doyle, 1995; Jay ve ark. 2003). Diğer enfeksiyon kaynakları kemirgenler, kuşlar (su kuşu dahil), sinekler, yabani kediler, köpekler, rakunlar ve nadiren insan olabilir. *Salmonella* prevalansı önceden üzerine yapılan çalışmalarda oranın %90-95 olduğu bildirilmiştir (Arthur ve ark., 2008). *Salmonella* etkenleri %100 oranında deriden, %94,1 dışkıdan, %91,2 mezenterik, %76,5 subiliak , %55,9 mandibular ve %7,4 mediastinal lenf yumruları örneklerinden tanımlanmıştır (McEvoy ve ark., 2003).

1.9. *Salmonella*'nın Zoonotik Önemi

Salmonella serovarlari insanlarda gıda kaynaklı hastalık olarak yayılmaktadır. Et ve süt tüketimi Salmonellosis salgınlarından etkilenmekte ve unutulmamalıdır ki insanlar enfekte sığır ve koyunla doğrudan temasta bulunduğunda enfekte olabilmektedirler. Ayrıca hayvan dışkılarındaki sindirici organizmalar da bulaşmaya neden olabilir; doğrudan veya kontamine gıda ve su vasıtasıyla (Wray ve Davies, 2000; Hoelzer ve ark., 2011b); ancak meyve ve sebzeler dahil tüm gıdalar, kontamine olabilirler. Hayvan sahibi olmak ve ham gıda tüketmek zoonotik ajanlara davetiye gibidir; ancak, gıda üretiminin her aşamasında vakalar yüksek standart hijyen uygulaması ile minimize edilebilir.

Salmonella serotipleri gastroenterit, bakteriyemi, tifoid ateş, sepsisemi gibi bir çok farklı hastalık sendromuna neden olabilir; en yaygın olanı ise gastroenteritir. Sıklıkla abdominal kramplar, mide bulantısı, kusma, ishal, baş ağrısı ile karakterize edilir ve ciddi vakalarda sepsisemiye sindirimden 12–72 saat sonra ortaya çıkar ve hastalık 2-7 gün sürer. *Salmonella* ayrıca subklinik olarak hem insanlar hem hayvanlar tarafından taşınabilir (Murase ve ark., 2000; Perron ve ark., 2008; USDA-NAHMS, 2011).

Non-tifoid *Salmonella* serovarlariından kaynaklı gastroenterit vakalarının yaklaşık olarak her yıl 93.8 milyon olduğu tahmin edilmektedir ve 155000 ölüme yol açtığı bilinmektedir (Majowicz ve ark., 2010). Zoonozların oluşumunu engellemek için hangi hayvanların ve gıda kaynaklarının temel enfeksiyon kaynağı olduğunu belirlemek önemlidir. Kamu sağlığı açısından, sığırlar ve koyunlar kompleks *Salmonella*- hayvan – insan döngüsünde önemli bir rol oynar; çünkü bu hayvanlar bu patojenin yaygın rezervuarı olarak belirtilmiştir, hem sığır hem insanda çeşitli derecelerde patojenite gösteren bir dizi serovara sahiptirler (Foley ve Lynne, 2008).

Sığırlar gıda kaynaklı enfeksiyon kaynağı olarak önemli bir rol oynamaktadır. Sıklıkla insanlardan izole edilmiş çok sayıda serotipin, hasta ya da klinik olarak sağlıklı sığırlardan da izole edildiği bilinmektedir (Hoelzer ve ark., 2011). Çeşitli ülkelerde sığır, insanlardaki *S. Typhimurium* enfeksiyonunun temel kaynağı olarak gösterilmektedir (Calvert ve ark., 1998; Hoelzer ve ark., 2011). Potansiyel olarak; sığırlardan insanlara doğrudan temas, ortamın kontaminasyonu (su kaynakları gibi), et ve süt ürünlerinin kontamine olması yoluyla yayılım olmaktadır. (Kavanagh, 2002). *Salmonella* Typhimurium, hayvanlardan insanlara geçen en önemli Salmonellosis serotipleridir.

Günümüzde *Salmonella*'nın 2610 serotipi bulunmaktadır. Bu serotiplerin daha az bir miktarı, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin*, *S. Newport*, *S. Heidelberg* ve *S. Montevideo* dahil olmak üzere önemli ölçüde hayvan ve insan hastalığı ile ilişkilidir. (Foley ve Lynne, 2008). İnsanlarda ve diğer memelilerde, hastalığa neden olan izolatların çoğunluğu *S. enterica* alttür *enterica*'ya aittir. Tüm serotipler insanlarda hastalığa neden olsa da, sadece birkaçı konak-spesifiktir ve sadece bir yada birkaç hayvan türünde barınabilmektedir. Örneğin; sığırlarda *Salmonella* Dublin; koyunlarda *S. Abortusovis* ve domuzlarda *S. Choleraesuis*. Bu belirli serotipler insanlarda hastalığa neden olduklarında sıklıkla invazif olabilmekte ve hayati tehlike taşıyabilmektedirler (WHO FOS, 2010).

Sonuç olarak yukarıda özetlenen çalışmalar doğrudan sığırlarla temasın potansiyel olarak insan sağlığı açısından risk oluşturduğunu temsil etmektedir. Klinik olarak hasta hayvanların görünüşte sağlıklı hayvanlara göre *Salmonella*'yı bulaştırması muhtemelen insanlar için büyük risk oluşturmaktadır. Ancak uzun süreli *Salmonella* asemptomatik taşıyıcılığı ve artan stres de benzer risk oluşturmaktadır (Hoelzer ve ark., 2011).

1.10. Salmonella'nın Moleküler Tiplendirmesi

Salmonella ekoloji ve bulaşmasını anlamakta moleküler tiplendirme metotları önemlidir (Piresve ark., 2016). Mikrobiyal çeşitlilik ve taksonomi çalışmalarında geleneksel metotları tamamlayıcı olarak kullanılır (Babalola, 2004). *Salmonella*'ların tanımlanmasında kullanılan modern taksonomik yöntemler fenotipik yöntemler ve genotipik yöntemler olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir. Fenotipik ya da genotipik olsun, tüm tiplendirme sistemleri yorum ve performans rahatlığı, ayırım gücü, üretilebilirlik ve tiplendirilebilirlik bakımından karakterize edilmektedir (Oliveirave ark., 2007; İmen ve ark., 2011).

Fenotipik testler bakterilerin cins ve tür bazında ayırımı için hala önemli bir rol oynasa da bakterilerin çoğu oldukça benzer besinsel ihtiyaçlara sahip olup benzer çevresel şartlar altında gelişim gösterebildiklerinden dolayı, cins ve tür düzeyinde tanımlanmalarında kullanılan bu geleneksel kriterler oldukça zaman alıcı ve aynı zamanda ayırım gücü ve hassasiyetleri bakımından da çoğu zaman şüphe uyandırıcıdır (Temmerman ve ark., 2004; İmen ve ark., 2011).

Bu sebeplerden dolayı fenotipik tiplendirme metotları, genetik bilgiye dayalı tiplendirme metotlarının geliştirilmesine yol açmıştır. Bu metotlar restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesime, nükleik asit çoğaltımı veya nükleotid dizilimine dayalıdır (İmen ve ark., 2011).

Genotipik Yöntemlerse *Salmonella*'nin moleküler tanımlama ve tiplendirme çalışmalarında ilgi odağı fenotipik yöntemlerden daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler yöntemlere doğru kaymıştır (Babalola, 2004). Salmonellaların tiplendirilmesinde kullanılan genotipik yöntemler arasında: Pulsed field jel elektroforezi (PFGE), Ribotiplendirme, İnsersiyon dizi tiplendirme (IS), Plazmid profil, RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism), MLST (multilocus sequence typing), Multipleks PCR yer almaktadır. İdeal bir tiplendirme yöntemi tekrarlanabilirlik, ayırım gücü, maliyet düşüklüğü yorumlama ve kullanım kolaylığı açısından tüm kriterleri yerine

getirmelidir. *Salmonella* suşlarının tiplemesi için günümüzde kullanılan genotipik yöntemler tüm kriterleri yerine getirse bile tek başına ideal bir yöntem olamamaktadır (Imen ve ark., 2011).

1.10.1. Ribotiplendirme

Ribotiplendirmede, kromozomal DNA'nın restriksiyon enzim analizi ile bakteri genomları kıyaslanarak incelenir. İncelenecek olan bakteri türüne göre seçilecek restriksiyon enzimi ile 20 veya daha az sayıda kesilmiş olan DNA parçalarının profilleri kolaylıkla okunabilmektedir. Total genomik DNA bir restriksiyon enzimiyle daha küçük fragmentlere parçalanmakta ve bu parçalar jel elektroforeziyle birbirinden ayrılmaktadır. Fragmentler jelden bir membrana transfer edilmekte ve ribozomal 16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genlerin korunmuş bölgelerine spesifik işaretlenmiş evrensel bir proba hibridizasyona tabi tutulmaktadır. Hibridizasyondan sonra fragmentleri göstermek için problemlerin hibridize olduğu yerde probdaki işaret gözlenmektedir. Restriksiyon enzim paternlerinin rrn probu ile hibridize edilmesi yöntemine ribotiplendirme adı verilmektedir. Ribotiplendirme gibi problu yöntemler de rahatlıkla klonal değişimlerin saptanmasında kullanılabilir (Kocagoz, 2000; Kiran ve Osmanagaoglu, 2011).

Ribotiplendirmede DNA profili elde etmek için, DNA izolasyonu, restriksiyon enzimi ile kesim, elektroforez ile DNA parçalarının ayrıştırılması, prob ile "Southern blota hibridizasyon ve prob-hedef hibrid paternlerinin incelenmesi gerekmektedir. Ancak henüz paternlerin yorumlanması için ortak bir kriter bulunmamaktadır (Kocagoz, 2000).

Ribotiplendirmede edilen bantlar, ribotip olarak adlandırılır. Bunlar; referans bir tür veri bankasıyla karşılaştırılarak izolatların tanımlanması için kullanılabilir. Ribotiplendirme aynı zamanda muhtemelen bu yöntemin en yaygın kullanım amacında olduğu gibi, izolatların filogenetik amaçlar için tiplendirilmesinde de kullanılabilir (Kocagoz, 2000; Kiran ve Osmanagaoglu, 2011).

Ribotiplendirmenin tüm aşamaları, kit protokolü ve cihaz için belirtilen kullanım kılavuzundaki talimatların belirtildiği şekilde uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

1.11. *Salmonella*'larda Antimikrobiyel Direnç

Son birkaç yılda dünya çapında *Salmonella* serotiplerinin antibiyotik dirençliliğinin artışı tıp ve veteriner hekimlikte endişeye neden oldu (Besser ve ark., 2000; Fey ve ark., 2000). *Salmonella* serotipleri yoğun ve yaygın antibiyotik kullanımı nedeniyle çoklu ilaç direnci geliştirdi. Pek çok faj tipi izolat trimetoprim ve florokinolonlara direncin artışıyla birlikte ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sülfanomitler ve tetrasikline (ACSUT) direnç kazandı (Piddock, 2002). EFSA 2012'de ampisilinler, sülfanomitler ve tetrasiklinlere direncin sığır serotiplerinde yüksek oranda arttığını rapor etti.

Salmonellalar çoklu antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gösterdikleri için aynı zamanda halk sağlığını da tehdit eden ajanlardır. Daha önce yapılan araştırmalardan elde edilen verilere göre hayvan kesimlerinden ve veteriner diyagnostik kaynaklarından alınan *Salmonella* numunelerinin %44'ü en azından bir antimikrobiyal ajana karşı dirençlidir (Foley ve Lynne, 2008). Son on yılda, çoklu antibiyotik direncine sahip olan *Salmonella enterica* gruplarının birçok ülkede tespit edilmesinin nedeni intansif yetiştiriciliğin yaygın olarak yapıldığı bölgelerdeki çiftlik hayvanlarında antibiyotiklerin kontrolsüz şekilde kullanılması ve bunun yanında yemlere katılmaya devam edilmesidir (Antunes ve ark., 2004).

Antimikrobiyallere karşı oluşan çoklu dirençte “sınıf 1 integron” genlerinin varlığı dikkat çekmektedir. blaPSE-1 blaCTX-M-2 ve blaOXA-1 bu integronda taşınan genlerdir (Sandvang ve ark.,1998; Guerra ve ark.,2000; Di Conza ve ark.,2002; Lee ve ark., 2003).

S. Typhimurium (DT104) 1980'lerde ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sulfonamid, ve tetrasikline çoklu direnç (R-ACSSuT) göstermiş ve kısa süre içinde birçok ülkede vakaların görüldüğü raporlanmıştır (Carattoli ve ark., 1998). Son yirmi yılda sığırlarda Salmonelloz vakalarından izole edilen *S. Dublin* de *S. Typhimurium* gibi giderek artan bir dirence sahip olmuştur (DEFRA, 2005). Çoklu dirençli *S. Typhimurium* DT104 hem insanları hem de sığır ve koyunları infekte etmektedir (Davies ve Funk, 1999; DEFRA, 2005). İnsanların sığır ve koyunlarla doğrudan temas veya bu hayvanlardan elde edilen süt, et, peynir gibi gıda maddeleri aracılığıyla antibiyotiğe dirençli *Salmonella* serovarlarıyla infekte oldukları bildirilmiştir (Alexander ve ark., 2009)

Et ve hayvanlardan izole edilen *Salmonella* izolatlarının, tetrasiklinler, ampisilin ve sülfanomitlere %9.5 'den %66.7'e çıktığı rapor edildi. Hindi ve domuz izolatlarındaki düzeyin; broiler, damızlık ve yumurtacı tavuklar ile sığırlardan yüksek olduğu tespit edildi. Siprofloksasin ve nalidisik asit direncinin hindi ve broilerlerde (% 41.5-86.2); damızlık ve yumurtacı tavuklar ile sığırlardan (% 5.8-25.5) yüksek olduğu anlaşıldı (EFSA ve E. C. D. C, 2012). Sığırlarda antimikrobiyal direnç düzeyinin yaşa bağlı olarak % 34.7 'den % 46.7 kadar değiştiği; yetişkin sığırlarda düşük olduğu görüldü. Hücre zarındaki bir veya çok sayıda mekanizmada geçirgenlik değişimleri, antimikrobiyal enzimin inaktivasyonu veya yok edilişi, diğer enzimatik yolların oluşturulması veya aktivasyonundaki değişimler sayesinde insan ve hayvan bakteriyel patojenlerinde antimikrobiyal direnç gelişimi gözlenmektedir. Bu mekanizmaların biri veya kombinasyonu veteriner tıp çalışmalarında kullanılan antimikrobiyallerin çoğu bloke edilir (White, 2000). Bu mekanizmalar kromozomal ya da plazmid aracılıklı olarak aktarılabilir. Gram negatif bakterilerde direnç oluşturulmasında, antimikrobiyal ajanları hücre içine taşıyan transporterler hayati önem taşımaktadır (Rosenberg, 2000).

Bu alışmada, Türkiye’de sığır ve koyun yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı, İç Anadolu’da Ankara evresi, Kayseri ve Afyonkarahisar evresi, Ege ve Marmara bölgesinde; Aydın, İzmir ve Bursa çevresindeki sığır ve koyunlarda *Salmonella* izolasyonu, identifikasyonu ve bu etkenlerin serotiplendirmesi, ribotiplendirilmesi ve antibiyotik direncinin saptanması amaçlanmıştır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. İncelenen Örnekler

Sığır ve koyun çiftlikleri ve kesimhanelerden 312 sığır ve 135 koyundan dışkı, deri svabı ve mezenterik lenf nodülleri toplandı ve incelendi. Sığırlardan 196 dışkı, 169 deri svabı ve 30 lenf nodülü toplam 395 örnek, koyunlardan ise 55 dışkı, 50 deri svabı ve 30 lenf nodülü toplam 135 örnek kullanılmıştır. Sığır ve koyunlardan dışkı, lenf nodülü ve deri svabı olmak üzere toplam 530 örnek toplanmıştır.

Çizelge 2.1. Sığırlardan alınan örneklerin alındığı bölge ve hayvan sayıları

Örneklerin Alındığı il/ilçe		Hayvan sayısı	Ahır Sayısı
Ankara	Gölbaşı	68	2
	Polatlı	25	1
Kayseri		25	1
Afyonkarahisar		35	1
Aydın		50	1
İzmir		59	2
Bursa		50	1
Total		312	9

Çizelge 2.2. Sığırlardan dışkı, deri sürüntüsü ve lenf nodülü örneklerinin sayıları

Örneklerin Alındığı il/ilçe	Dışkı	Deri sürüntüsü	Lenf nodülü	Toplam örnek Sayısı	
Ankara	Gölbaşı	83	58	10	151
	Polatlı	13	12	-----	25
Kayseri	15	10	-----	25	
Afyonkarahisar	15	15	5	35	
Aydın	20	25	5	50	
İzmir	30	24	5	59	
Bursa	20	25	5	50	
Total	196	169	30	395	

Çizelge 2.3. Koyunlardan alınan örneklerin alındığı bölge ve hayvan sayıları

Örneklerin Alındığı il /ilçe	Hayvan sayısı	Ahır Sayısı	
Ankara	Gölbaşı	30	2
	Polatlı	10	1
Kayseri	15	1	
AfyonKarahisar	20	1	
Aydın	20	1	
İzmir	20	1	
Bursa	20	1	
Total	135	8	

Çizelge 2.4. Koyunlardan dışkı, deri sürüntüsü ve lenf nodülü örneklerinin sayıları

Örneklerin Alındığı il/ilçe	Dışkı	Deri sürüntüsü	Lenf nodülü	Toplam örnek Sayısı	
Ankara	Gölbaşı	10	10	10	30
	Polatlı	5	5	-----	10
Kayseri	8	7	-----	15	
Afyonkarahisar	8	7	5	20	
Aydın	8	7	5	20	
İzmir	8	7	5	20	
Bursa	8	7	5	20	
Total	55	50	30	135	

2.1.2. *Salmonella* İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri

Salmonella izolasyon ve identifikasyonu amacıyla ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme ve selektif besiyerlerine ekim aşamaları için besiyerleri geliştirilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan seçici ve diferansiyel besiyeri aşağıda listelenmiştir (ISO, 2010)

2.1.2.1. ISO 6579 2010: Appendix D İzolasyon Besiyerleri

Tamponlanmış Peptonlu Su 225 ml
Modifiye Rappaport Vassiliadis Yarı Katı Besiyeri (MRVS) 10 ml
Müller-Kauffmann Tetrasyonat-Novobiyosin Buyyon (MKTTn)
Ksiloz Lizin Desoksikolat (XLD) agar
Ksiloz Lizin Tergitol-4 (XLT-4) agar

2.1.2.2. Biyokimyasal Test Besiyerleri ve Ayıraçları

Triple Sugar Iron agar (TSI)
Üre agar
L-Lizin Dekarboksilaz Besiyeri
Voges Proskauer Besiyeri (VP); Ayıraçlar: 1Kreatin solüsyonu
(N- amidinosarcosine) ve 2Naftol etanol solüsyonu
Nutrient Buyyon
 β -Galaktosidaz Test Besiyeri
İndol Test Besiyeri; Ayıraç: Kovaks

2.1.2.3. Ticari Biyokimyasal Test Besiyerleri (Microgen GN-ID) ve Ayıraçları

MacConkey Agar (MA)

Nutrient Agar (NA)

Fizyolojik Tuzlu su

Voges Proskauer Ayıraçları: Alfa - naftol (VP I) ve Potasyum hidroksid (VP II)

İndol Test Ayıracı: Kovaks

Mineral yağ

TDA (Tryptofan Deaminaz Reaksiyon) Ayıracı

2.1.2.4. Serotiplendirmede Kullanılan Besiyerleri ve Antiserumlar

Nutrient Agar (NA)

Swarm agar

Fizyolojik Tuzlu su

Craigie Tüpleri

Antiserumlar: Çalışmada *Salmonella* O, H ve Faz inversiyon için iki antiserum markası; Statens Serum Institute (Danimarka) ve Denka Seiken (Japonya) kullanıldı. Kullanılan antiserumlar Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki *Salmonella* laboratuvarında polivalan ve monovalan antiserumlar (*Salmonella* 38 O- antiserum, 44 H-antiserum ve 18 Faz inversiyon antiserum) olmak üzere toplam 100 antiserumdan oluşan tam set kullanıldı.

2.1.2.5. Antibiyotik Duyarlılık Test Besiyerlerine Tampon Çözeltiler

Mueller Hinton agar

Fizyolojik Tuzlu su

2.1.3. Kullanılan Antibiyotik Diskleri

Çizelge 2.5. Antibiyotik duyarlılık test için kullanılan antibiyotik diskler

Antibiyotikler (OXOİD)	Mikrogram	Kısaltma
Ampisilin	10 µg	AMP
Sefotaksim	30 µg	CXT
Kloramfenikol	30 µg	C
Siprofloksasin	5 µg	CIP
Eritromisin	15 µg	E
Gentamisin	10 µg	CN
Kanamisin	30 µg	K
Nalidiksik asit	30 µg	NA
Sülfonamidler	300 µg	S3
Streptomisin	25µg	S
Tetrasiklin	30 µg	TE

2.1.4. Moleküler Tiplendirmesi Kullanılan Cihaz, Kimyasal ve Tampon Solüsyonlar

Ribotiplendirme Ünitesi: Ribotiplendirme yöntemi otomatize Riboprinter® (Dupont, USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

2.1.5. Moleküler Tanıda Kullanılan Cihaz, Kimyasal ve Tampon Solüsyonlar

2.1.5.1. Cihazlar: DNA ekstraksiyon ve PCR'da kullanılan cihaz ve ekipmanlar aşağıda verilmiştir.

Santrifüj: Heraeus Pico 17 (Thermo Scientific, USA) ve Mikro 200 (Hettich, Almanya) kullanıldı.

Isı Bloğu: Kaynatma ile DNA ekstraksiyon yöntemi için 100°C'ye ayarlı kuru ısı bloğuda 10 dakika inkube ederek ısı bloğu kullanıldı.

Spektrofotometre: DNA ölçümleri için NaNoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA) kullanıldı.

Termal cycler: Çalışmada Thermocycler T1 96 x 0,2 ml tüp, strip ve pleytleri alabilecek şekilde dizayn edilmiş (Biometra, Göttingen) PCR makinası kullanıldı.

Jel Elektroforez Ünitesi: Gel elektroforez ünitesi 2,3 litre tampon solüsyon haznesi olan (Thermo Owl A2 large Gel System, 20 x 25 cm, Thermo Scientific, USA) ve ünitenin 2 adet tepsisi (U.V. Transmissible (UVT) Gel Tray, Thermo Scientific, USA) kullanıldı.

Güç Kaynağı: Ürünlerin göç etmesi için güç kaynağı (Elite 300 Plus Power Supply, Wealtec, USA) kullanıldı. Jel elektroforez aşaması için 500 A, 180 V, 60 dak yürütme yapıldı.

2.1.5.2. Solüsyonlar

10X TBE (Tris-borate-EDTA) 1 litre: Ticari olarak hazırlanmış hali (B52, Thermo Scientific, USA) kullanıldı.

1X TBE: 10X'lik TBE'den 1X'lik TBE hazırlandı. 50 ml 10X TBE, 950 ml ddH₂O içerisine ilave edildi.

Yükleme Solüsyonu: 6x Loading Dye ve GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (SM0321 Thermo Scientific, USA) kullanıldı.

Agaroz: Jel hazırlarken Prona Agarose, Biomax kullanıldı.

SafeViewBoya Solüsyonu: Etidyum bromide boya alternatif olarak kanserojen olmayan SafeView (NBS Biologicals Ltd) boya kullanıldı.

Kullanılan molekülün jel üzerindeki yerini belirlemek için ortamda UV ışığı altında floresan etki gösteren SafeView (NBS Biologicals Ltd)

Görüntüleme Ünitesi: Jelin boyanmasını takiben ürünler UV transillüminatörlü bilgisayarlı görüntüleme sistemi (Gene Genius, Syngene, Bio Imaging System, USA) gözlendi.



2.2. Yöntem

2.2.1. *Salmonella* Örneklerinin Toplanması

Örnekler İç Anadolu'da; Ankara çevresi, Kayseri ve Afyon Karahisar çevresi ve Ege ve Marmara bölgesinde; Aydın, İzmir ve Bursa'daki çiftlikler ve kesimhanelerden rastgele alındı. Çiftliklerdeki hayvanların sağrı ve karın bölgesindeki derilerinden 1,000 cm²'lik alandan steril sünger ve içerisinde 10-20 ml steril tamponlanmış peptonlu su içeren svablar ile örnekler alındı. Dışkı örnekleri, dikkatli bir şekilde hayvanlardan bireysel olarak ya da çiftliklerden tüm dışkı içerisinde 30'ar gram olarak steril örnek kapları içerisine toplandı. Lenf nodülü örnekleri farklı kesimhanelerden alındı. Örneklerin toplanması, taşınması ve laboratuvar çalışmaları sırasında çapraz kontaminasyonu önlemek için uygulama aşamaları dikkatli şekilde gerçekleştirildi. Örnekler alındıktan hemen sonra veya aynı gün içerisinde soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı. Örneklerin tamamı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda toplanarak çalışıldı (WHO, 2010).

2.2.2. *Salmonella* İzolasyon ve İdentifikasyonu

Bu çalışmadaki toplanan materyallerden *Salmonella* izolasyonu ve identifikasyonunda standart yöntem olan ISO 6579 kullanıldı (ISO, 2002). Yöntem Şekil 2.1'de açıklanmıştır.

2.2.2.1. Ön zenginleştirme (Tamponlanmış Peptonlu Su)

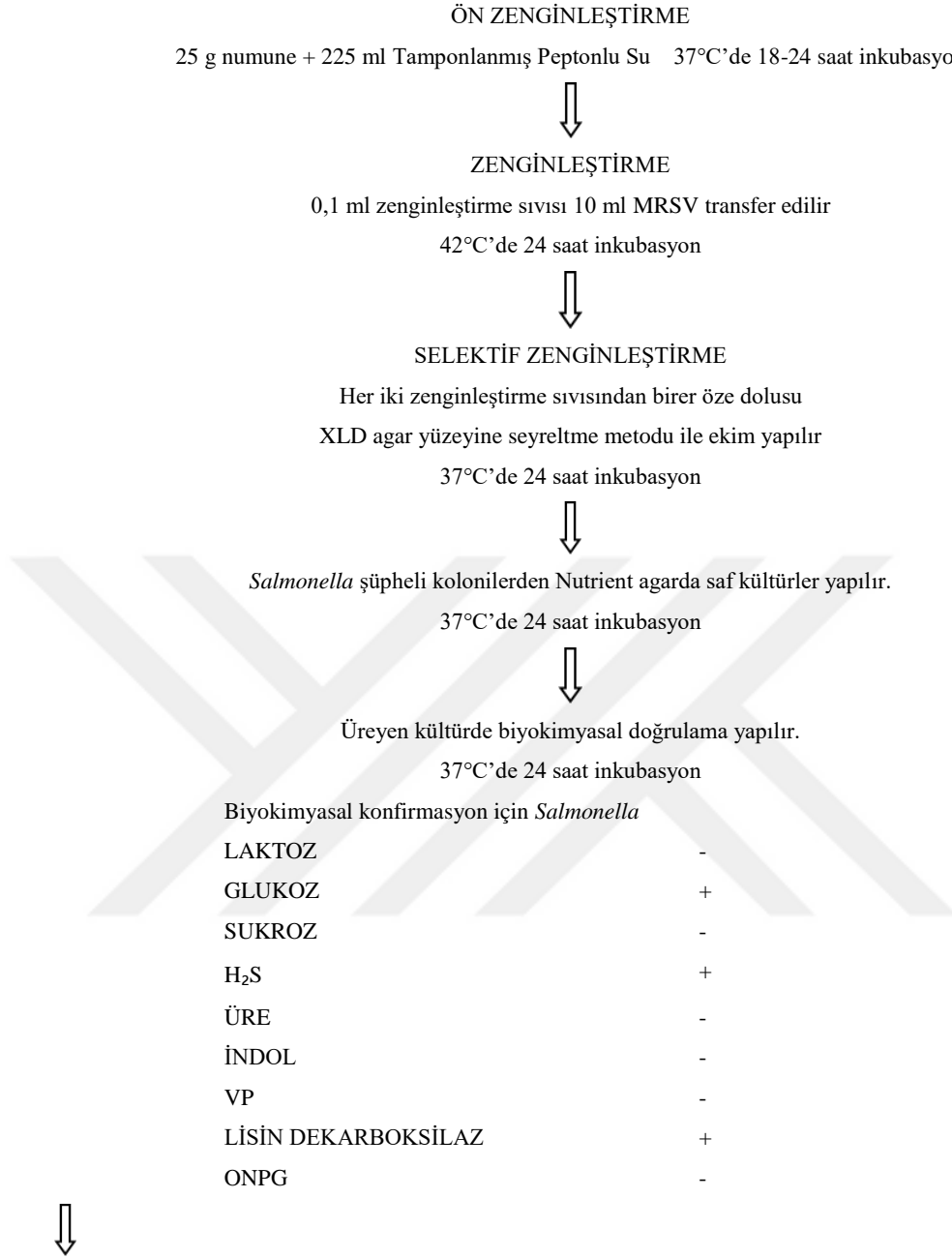
Ahırlarda, sığır ve koyunlardan toplanan dışkı (rektal muayene ile) ve deri svab (deriden sürüntü yoluyla) örnekleri ve kesimhanelerden toplanan lenf nodülü; her örnekten 25 gram alınarak 225 ml tamponlanmış peptonlu su (TPS) içeriğine atıldı ve 37°C sıcaklıkta 24 inkübasyona bırakıldı.

2.2.2.2. Selektif Zenginleştirme

Ön zenginleştirme sıvısı karıştırıldı ve 0.1 ml ön zenginleştirme sıvısı aseptik olarak MRSV besiyerine nokta şeklinde damlatıldı. Diğer ortam için, 1 ml ön zenginleştirme sıvısı 10 ml MKTTn Tetrathionate broth (Müller-Kauffmann) içeren tüplere transfer edildi. Tüpler etüvde, 37°C'de ve yarıkatı besiyeri 41.5 °C'de 24 saat inkübe edildi.

2.2.2.3. Selektif besiyerlerinde ekim

Selektif zenginleştirme için, zenginleştirme sıvısından bir öze dolusu alınarak XLD ile XLT4 agarlara ekim yapıldı ve 37 °C 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında pleytlerde tipik *Salmonella* kolonisinin üreyip üremediği kontrol edildi. Tipik *Salmonella* kolonisi; siyah bir merkezin (besiyeri demir tuzları içermektedir) etrafını hafif transparan kırmızı-pembe bir zonun çevrelediği kolonilerdir (WHO, 2010). Nadiren laktoz ya da sükroz fermentasyonu yapan *Salmonella* suşları sarı zon içerisinde siyah koloniler oluşturmaktadırlar (Wray ve Wray, 2000).



Şekil 2.1. *Salmonella* tespiti için akış şeması (ISO 6579,2002; WHO, 2010)

2.2.2.4. Biyokimyasal Konfirmasyon

ISO-6579 standardı; TSI agar, Üre agar (Christensen), bu sırayla, L-lizin dekarboksilaz, β -galaktosidaz (ONPG), Voges Proskauer ve Indol testi kullanılmasını önermektedir. Bütün biyokimyasal testler 37 °C'de 18–24 saat arasında çalışmaktadır. Birkaç serotip haricinde *Salmonella* serotipleri genel olarak bu testlere benzer karakterde davranırlar. *Salmonella*'nın serotip bazında identifikasyonu bu türe ait H ve O antijenlerinin serolojik açıdan incelenmesiyle yapıldı (Mikoleit, 2010).

TSI (Triple Sugar Iron) Agar: XLD ve XLT₄ agar üzerinde üremiş *Salmonella* şüpheli koloniler seçilip TSI agar yüzeyine öze yardımıyla çizelerek ekim yapıldı. Tüpler etüvde, 37°C'de 24±3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra siyah renkli koloni gözlenmesi durumuna göre *Salmonella* olup olmadığına karar verildi (Hendriksen, 2003; Mikoleit, 2010).

Üre Agar: İncelenecek şüpheli saf kültüründen özeyle alınarak agar yüzeyine çizerek ekim yapıldı. Etüvde, 37°C'de 24±3 saat inkübe edildi. *Salmonella*'lar üre negatif olduğu için renk değişikliği olmadı (Hendriksen, 2003; Mikoleit, 2010).

İndol Testi: İncelenecek şüpheli koloniden özeyle alınarak triptofan içeren bir sıvı besiyerine inokule edildi. Tüpler etüvde, 37 °C'de 24±3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda kültürlerin üzerine 1 ml kovaks ayırıcı damlatıldı. 1 dakika içinde besiyerinin üst kısmında, hafif sarı halka oluşumu gözlemlendi (Hendriksen, 2003; Mikoleit, 2010).

L-Lizin Dekarboksilaz Testi: Miller besiyerinin her birine, taze saf kültürlerden ekim yapıldı, ve tüpler 37°C'de 24 ± 3 saat inkübasyona bırakıldı. Tüplerde turbidite ve mor renk oluşumu Pozitif reaksiyon olduğunu gösterdi (Hendriksen, 2003; Mikoleit, 2010).

β -Galaktosidaz (ONPG) Testi : β -galaktozidaz enzim aktivitesi test edilmek amacıyla Laktoz içeren besiyerinde geliştirilmiş olan kültürden bir öze dolusu alınarak 0,25 ml fizyolojik tuzlu su ile süspanse edildi. Bu süspanسیونun üzerine 0.25 ml Ortho Nitrofenol β -D- Galaktopronosid (ONPG) solusyonu katıldı, ONPG brothda mikroorganizmalar ekildikten sonra etüvde 37 °C de 3-4 saat inkübasyona

birakıldı. İnkübasyon sonucunda tüplerde renk değişikliği olmadı (Hendriksen, 2003; Mikoleit, 2010).

Voges Proskauer (VP) Testi: 3 ml VP besiyeri bulunan steril tüpe şüpheli koloniden öze ile alınarak tüpteki Glukoz-Fosfat Broth besiyerine ekim yapıldı. Tüpler etüvede, 37 °C’de 24±3 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerine, 1 ml %40’lık Potasyum hidroksit (KOH), daha sonra 3 ml %5’lik alfa naftol damlatıldı. Ayıraçlar ilave edildikten sonra renk değişimi olmadı, ve “negatif” olarak yorumlandı (Hendriksen, 2003; Mikoleit, 2010).

Çizelge 2.6. *Salmonella*’nın Biyokimyasal İdentifikasyonu: Tipik *Salmonella* Suşlarının Biyokimyasal Reaksiyonları (Wray ve Wray, 2000; Grimont ve Weill, 2007; WHO, 2010).

Test	Substrat	Enzimler / Reaksiyon	Negatif	Pozitif
ONPG	Artheo-nitrio fenol glikozit	β-Galaktosidaz	Renksiz	Sarı
LDC	Argenin	Argenin dihidrolaz	Sarı / kahverengi	Mor renk
H ₂ S	Sodyum tiyosülfat	H ₂ S üretimi	Siyah renk oluşmaz	Siyah renk
Üre	Üre	Üreaz	Sarı	Pembe - Kırmızı
Indol	Triptofan	İndol üretimi	Sarı halka	Pembe - Kırmızı
VP	Sodyumpirüvat	Aseton üretimi	renksiz	Pembe - Kırmızı
GLU	Glikoz	Oksidasyonu-Fermantasyon	Mavi – Mavi yeşil	Sarı
SAC	Sakkaroz	Oksidasyonu-Fermantasyon	Mavi – Mavi yeşil	Sarı
LAC	Laktoz	Oksidasyonu-Fermantasyon	Sarı	Pembe

2.2.2.5. Ticari Biyokimyasal Kit

XLD ve XLT₄ agar üzerinde üreyen beş adet tipik *Salmonella* kolonisi seçildi ve Nutrient agar yüzeyine öze yardımıyla ekim yapıldı, petriler 37°C±1 de 24±3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında üreyen saf ve taze *Salmonella* kültüründen tek bir koloni alınarak 3ml steril % 0.85 fizyolojik tuzlu su (FTS) içinde süspansiyon edildi. Süspansiyon steril bir Pasteur pipeti yardımıyla Microgenin her bir kuyucuğuna 100µl olacak şekilde damlatıldı. İnokülasyon sonrasında etrafında siyah daire olan 1, 2, 3 ve 9 kuyularına 3-4 damla mineral yağ damlatıldı. Testin üzeri yapışkan bir şerit ile örtüldü ve 37°C’de 24±3 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra yapışkan band çıkarılarak; 8. kuyucuğa kovaks ayırıcı, 10. kuyucuğa önce VP I ayırıcı sonra VP II ayırıcı damlatıldı, 12 numaralı kuyucuğa ise TDA ayırıcı damlatıldı. Ayıraçlar eklendikten sonra renk oluşan renk değişiklikleri renk skalasına göre değerlendirildi. Renk şeması yardımıyla tüm pozitif ve negatif sonuçlar GN-ID A + B Raporu Formuna kaydedildi (Şekil 2.2 ve Şekil 2.3). Rapor formundaki sonuçlar değerlendirilerek 4 haneli oktal kod oluşturuldu. Oktal kodların, Microgen identifikasyon sistem yazılımı (MID-60) yardımıyla değerlendirildi ve test sonuçlandırıldı.

Çizelge 2.7. Microgen GN-ID test kitlerindeki biyokimyasal reaksiyonları okuma tablosu

Kuyucuk	Reaksiyon	Pozitif	Negatif
1	Lizin	Yeşil / Mavi	Sarı
2	Ornithine	Mavi	Sarı / Yeşil
3	H ₂ S	Kahverengi / Siyah	Sarı
4	Glikoz	Sarı	Mavi / Yeşil
5	Mannitol	Sarı	Mavi / Yeşil
6	Ksiloz	Sarı	Mavi / Yeşil
7	ONPG	Sarı	Renksiz
8	İndol	Pembe / Kırmızı	Renksiz
9	Üreaz	Koyu pembe	Sarı
10	VP	Derin Pembe / Kırmızı	Pale Pink Renksiz
11	Sitrat	Mavi	Sarı / Açık yeşil
12	TDA	Kırmızı	Sarı

Microgen İçin Ek Gereksinimler

a) Microgen identifikasyon sistem yazılımı (MID-60) – identifikasyon kriterlerinin farklılıklarına göre olasılıkları yüzde şeklinde analiz etmektedir. Bu ifadelerin tüm tanımı kullanma klavuzunda mevcuttur.

b) Sonuçlar için renk skalası

Microgen™ GN A ID

WELL/NAPFCHEN /GODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reaction	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	O.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.
Negative	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Blue	Blue	White	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
Positive	Green	Blue	Black	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red

Şekil 2.2. Renk skalası bildirilen bir form örneği

GN-ID A+B PANEL REPORT FORM

Lab. No: *Salmonella*
Laboratuvar: *The Galleries*
(Monomed)/Azawo 2

Specimen Type: *15 - Sigir Disti*

Date: *16.01.2015*

Well Number	GN A wells												GN B wells														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	O.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.	Gelatin	Milk	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Alonitol	Palmitose	Salicin	Arginine
Result	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions	7			7			0			2																	

Octal Code: *7702* Final Identification: *Salmonella spp*

Şekil 2.3. Rapor Formu Örneği

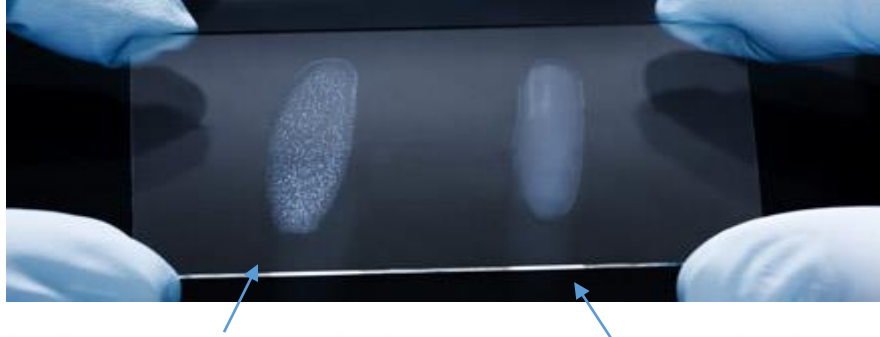
2.2.2. Serotiplendirme

Salmonella serotiplendirmesi

Lam Aglütinasyon Testleri Prosedürü

Nutrient agarda tek bir koloni fizyolojik tuzlu su (30µl) ile süspansiyon edildi. Lam üzerindeki bakteriyel süspansiyona bir damla polivalan antiserum (yaklaşık 20µl) damlatıldı. Antiserum ve kültür (antijen) bir çubuk yardımıyla karıştırıldı. İnokülasyon sıvısı karışacak şekilde lam yavaşça döndürüldü. Reaksiyon siyah zemin üzerinde bir ışık kaynağı önünde dikkatlice incelendi. Aglütinasyon gün ışığı veya floresan ışık sayesinde gözlemlendi. İlk aşamada FTS ve antijenik süspansiyon üzerinde aglütinasyon olmadığı doğrulandı. Pozitif reaksiyon aglütinasyon olarak; negatif reaksiyon ise süt bulanıklığı gibi homojen şekilde görüldü (Şekil 2.4). Yalnızca 1 dk içinde güçlü bir aglütinasyon veren reaksiyonlar pozitif olarak kabul edildi. Gecikmeler veya zayıf

reaksiyonlar negatif kabul edildi. Poli O serumu ile aglütinasyon oluşmazsa suş *Salmonella* negatif kabul edildi ve serotiplendirmeye devam edilmedi (Hendriksen ve Larsen, 2004).



Antiserum + Kültür (aglütinasyon pozitif)

FTS+kültür (aglütinasyon negatif)

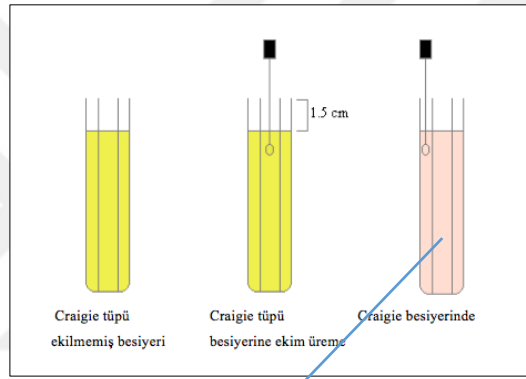
Şekil 2.4. Lam aglütinasyonda pozitif ve negatif reaksiyon sonuçları

O- antiserumları ile aglutinasyon

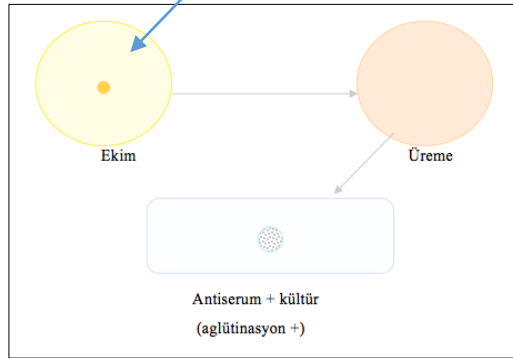
İlk olarak, OMA ve OMG arası tüm poli antiserumlar ile O grubu belirlendi. Ardından, suşlar pozitif reaksiyon görülene dek her bir poli O serumu ile test edildi. Kısaca, Lam üzerindeki iki noktaya öze dolusu fizyolojik tuzlu su konuldu. *Salmonella* şüpheli kolonilerde öze dolusu alınıp iki fizyolojik tuzlu su üzerine süspansiyon edildi ve bir damla O serumu damlatıldı. Karışım bir çubuk yardımıyla karıştırıldı. Lam yavaşça maksimum 1, 2 dakika çalkalandı ve pozitif reaksiyon olup olmadığı incelendi. Süspansiyon homojen ise reaksiyon negatif olarak değerlendirildi. Çökme varsa pozitif reaksiyon olması *Salmonella* olduğunu doğruladı (Hendriksen ve Larsen, 2004; SSI, 2013). İkinci defa lam alındı ve öze dolusu tuzlu su lama konulup *Salmonella* olduğu doğrulanan koloniyle karıştırıldı. Bu karışıma sırasıyla O-pool antiserumları uygulandı. Aglütinasyon görülen O-pool antiserum OMB olarak tespit edildi. OMB içindeki monovalan antiserumlarla tek tek koloni denendi ve 6,7 ile ifade edilen 'O' antijenik yapıları pozitif bulundu. Kauffman-White şeması kontrol edildi ve suşun serogrubu O:7 ile ifade edilen Grup C₁ olarak bulundu, ve O antijenleri belirlenip kaydedildi. Hem pozitif hem negatif tüm reaksiyonlar not edildi. O antijenik yapısı bulunduktan sonra poli H antiserumları ile prosedüre devam edildi.

H- antiserumları ile aglutinasyon

Serolojik grubu tayin edilen suşun tipini tayin etmek için flagellar antijenin kuvvetlendirilmesi gereklidir. Bu amaçla suş önce Craigie tüpündeki % 0.2'lik besi yerine ekilerek 37°C'de 18-24 saat inkubasyona bırakıldı. Yarı katı agardan örnek alındıktan sonra flagella antijeni belirlendi. Faz 1 ve Faz 2 flagella antijeni aglutinasyonu gerçekleştirildi. Bir faz antijenleri test edilip, belirlenip özel antiserumlarla baskıladıktan sonra diğer fazın antijenlerinin belirlenmesine geçildi (SSI, 2013).



Şekil 2.5. Craigie besiyerine ekim

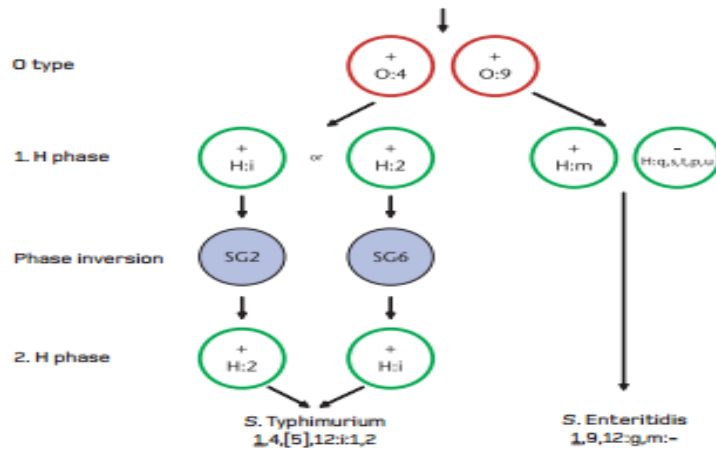


Şekil 2.6. H-faz tespiti için lam aglutinasyon

Faz inversiyon antiserumları ile aglütinasyon

6cm'lik bir petriye 10 ml yarı katı agar döküldü ve Katılaşması için bekletildi. Petrinin merkezine yüzeyi zedelemeyen *Salmonella* kültürü inoküle edildi ve 37°C'de 24±3 saat inkübasyona bırakıldı. Yarı katı agar yüzeyinden alınan kültür ile lam aglütinasyonu yapılarak faz 1 antijenleri belirlendi. Faz 1 antijenlerini baskılamak için 10ml swarm agar ile 2 damla faz inversiyon serumu karıştırıldı. Oluşturulan bu besiyeri katılaştıktan sonra inoküle edilerek 37°C'de 24±3 saat inkübasyona bırakıldı.

Faz 2 antijenleri, yarı katı yüzeyinden alınan kültürün lam aglütinasyonu ile tespit edildi (SSI, 2013).



Şekil 2.7. *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* Serotiplendirilmesi (SSI, 2013)

2.2.3. Ribotiplendirme

Ribotiplendirme yöntemi otomatize Riboprinter® (Dupont, USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Salmonellanın ribotiplendirmesi için kullanılan prosedür üretici tarafından ayrıntılı olarak tarif edilmiştir. Kısaca, Salmonellalar nutrient agarda, 37 ° C'de 24±3 inkube edildi. Nutrient agar ortamında geliştirilen aktif kültürlerden steril çubuk yardımıyla 1 koloni olacak şekilde steril şartlar altında alınmış ve içerisinde 200 µl buffer tüpüne aktarım yapılmıştır. Her tüp 5 saniye kadar vorteks ile karıştırıldı. Tüpler içerisinde bulunan örnekler sistemin bir aparatı olan sekizli eppendorf setine, her tüpe bir örnek konması şartı ile 30 µl miktarında aktarıldı, sekizli eppendorf seti ısıtma bloğunda 25 dakika boyunca ısıya tabi tutuldu, bu işlemin sonunda eppendorf seti cihazdan çıkarılarak her tüpün içerisine 5 µl Lysing agent A ve lysing agent B eklendi Tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra eppendorf seti cihaz içerisinde uygun yerine yerleştirildi. Cihazda, otomatize olarak ön aşamada yüksek ısı ve litik ajanlar kullanılarak bakteri hücreleri parçalanmakta, deproteinizasyon ve DNA restriksiyonu aşamalarından sonra DNA fragmentleri jel elektroforeziyle birbirinden ayrıldı. Ayrılan fragmentler jelden membrana transfer edilerek, 16S ve 23S rRNA operonuna spesifik kemilüminesans substratla işaretli prob yardımıyla hibridizasyona tabi tutuldu. Hibridizasyondan sonra bant profilleri elde edildi. Ribopattern adı verilen bu bantlar, referans bir veri bankasıyla karşılaştırıldı (Riboprinter® (Dupont, USA)).

2.2.4. Antimikrobiyal Duyarlılık Çalışmalar

2.2.4.1. Disk Diffüzyon Testi

İncelenen *Salmonella* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıkları disk diffüzyon testi ile incelendi.

Salmonella kültürleri 2 saat süreyle 37°C'de nutrient agarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra McFarland 0,5 (10⁹ CFU/ml)'e göre ayarlanarak standart bir bulanıklık oluşturuldu. Bu süspansiyondan steril bir eküvyon yardımıyla alınan örnek Mueller-Hinton agar yüzeyine inoküle edildi. Standardize edilen her bir örnek Müller Hinton agara geçirildi ve her bir izolatın antimikrobiyel disk dağıtıcı (dispenser) ile yerleştirilen 11 antimikrobiyel ajana karşı oluşturduğu inhibisyon zon çapı belirlendi. Bu işlem yapılırken, oluşacak zonların birbiri üzerine gelmemesi için diskler arasında 22 mm, petri kenarından ise 14 mm uzaklıkta olmasına dikkat edildi. Daha sonra besiyerleri 18-24 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi ve oluşan inhibisyon zonları ölçüldü (Hendriksen, 2002; EUCAST, 2012).

Sığır ve koyunlardan yapılan örneklemelerden izole edilen *Salmonella* suşları için yaygın olarak kullanılan farklı gruptaki antibiyotikler; Ampisilin, Sefotaksim, Kloramfenikol, Siprofloksasin, Eritromisin, Gentamisin, Kanamisin, Nalidiksik asit, Sülfonamidler, Streptomisin ve Tetrasiklinler test edildi. Herbir antibiyotiğin zon çapı standartlarla karşılaştırılarak duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençli şeklinde yorumlandı.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ve ECDC (The European Centre for Disease Prevention and Control) metoduna göre *Salmonella* serotipi kullanılan antibiyotiğe duyarlı ise bakteriyel üreme inhibe olacak ve antibiyotik disk etrafında bir zon oluşacaktır. İnhibisyon zon çapı MIC değeri ile karşılaştırılmaktadır. Oluşan zone mm olarak ölçülmekte ve MIC değeri CLSI ve EUCAST kriterlerine göre değerlendirilmektedir

Çizelge 2.8. Disk Difüzyon Zon Çapı (CLSI)

	Açıklayıcı Zon Çapı Kontrol Standartları (mm)		
	Dirençli	Orta Duyarlı	Duyarlı
Ampisilin (Amp)	≤13	14 – 16	≥17
Cefotaxime (CTX)	≤15	16 – 18	≥19
Kloramfenikol (C)	≤12	13 – 17	≥18
Siprofloksasin (CIP)	≤15	16 – 20	≥21
Eritromisin (E)	≤13	14 – 22	≥23
Gentamisin (GN)	≤12	13 – 14	≥15
Kanamisin (K)	≤13	14 – 17	≥18
Nalidiksik asit (Na)	≤13	14 – 18	≥19
Sülfonamidler (Su)	≤12	13 – 16	≥17
Streptomisin (S)	≤11	12 – 14	≥15
Tetrasiklin (Te)	≤14	15 – 18	≥19

2.2.4.2. *Salmonella* Antibiyotik Direnç Genleri

Bu tez çalışma sırasında sığır ve koyunlardan izole ve identifiye edilen *Salmonella* serovarlari antibiyotik direnci ile ilişkili çeşitli gen bölgelerinin varlığı kontrol edildi. Antibiyotik dirençliliğin genetik bağının araştırılması amacıyla sınıf I integron analizleri, PCR yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (Su ve ark., 2006; Bolton ve ark., 2013). Ng ve ark., (1999) ve Guerra ve ark., (2004) ’nın önerdiği primerlerle kullanılarak genel PCR yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Sığır ve Koyunlardaki *Salmonella* Sıklığı

Bu çalışmada örnekler İç Anadolu'da Ankara, Kayseri ve Afyon Karahisar, Ege ve Marmara bölgesin'de Aydın, İzmir ve Bursa'dan toplandı. Farklı hayvan çiftliklerinden koyun ve sığırlara ait dışkı ve deri, kesimhanelerden ise lenf nodülleri toplanarak *Salmonella* yönünden incelendi. *Salmonella* izolasyonu; hayvanların dışkı, deri ve lenf nodülleri örnekleri; 6579:2004 (ISO) Uluslararası Metot Standardizasyonu Organizasyonu tarafından kabul edilen standart metotlar dahilinde yapılarak identifiye edildi.

Bu çalışmanın gerçekleştirildiği 1 yıllık periyotta, Ankara, İzmir, Kayseri, Bursa, Afyon Karahisar, Aydın şehirlerinde seçilen ahırlardan toplam 312 sığır ve 135 koyundan farklı örnekler alındı (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.4).

Çizelge 3.1. Türkiye'de farklı illerdeki sığırlardan izole edilen *Salmonella spp.* sayısı

Örneklerin Alındığı il/ilçe		Hayvan sayısı	Pozitif hayvan
Ankara	Gölbaşı	68	4
	Polatlı	25	1
Kayseri		25	2
Afyonkarahisar		35	2
Aydın		50	3
İzmir		59	3
Bursa		50	2
Total		312	17

Çizelge 3.2. Türkiye’de farklı illerdeki sığırlardan toplanan farklı örneklerden izole edilen *Salmonella spp.* sayısı

Örneklerin Alındığı il/ilçe		Dışkı	Deri svab	Lenf nodülü	Toplam örnek Sayısı	İzole edilen suş sayısı (%)
Ankara	Gölbaşı	4/83	0/58	0/10	151	5/176 (2.9)
	Polatlı	0/13	1/12	-----	25	
Kayseri		2/15	0/10	-----	25	2/25 (8.0)
Afyonkarahisar		2/15	0/15	0/5	35	2/35(5.7)
Aydın		0/20	3/25	0/5	50	3/50 (6.0)
İzmir		3/30	0/24	0/5	59	3/59 (5.1)
Bursa		0/20	2/25	0/5	50	2/50 (4.0)
Total		11/196	6/169	0/30	395	17/395 (4.3)

Çizelge 3.3. Türkiye’de farklı illerdeki koyunlardan izole edilen *Salmonella spp.* sonuçları

Örneklerin Alındığı il /ilçe	Hayvan sayısı	Pozitif hayvan	
Ankara			
	Gölbaşı	30	8
	Polatlı	10	1
Kayseri	15	0	
AfyonKarahisar	20	1	
Aydın	20	3	
İzmir	20	1	
Bursa	20	1	
Total	135	14	

Çizelge 3.4. Türkiye’de farklı illerdeki koyunlardan toplanan farklı örneklerden izole edilen *Salmonella spp.* sonuçları

Örneklerin Alındığı il /ilçe		Dışkı	Deri svab	Lenf nodülü	Toplam örnek Sayısı	İzole edilen suş sayısı (%)
Ankara	Gölbaşı	4/10	3/10	0/10	30	8/40 (20)
	Polatlı	1/5	0/5	-----	10	
Kayseri		0/8	0/7	-----	15	0/15
AfyonKarahisar		0/8	1/7	5	20	1/20 (5)
Aydın		1/8	2/7	5	20	3/20 (15)
İzmir		0/8	1/7	5	20	1/20 (5)
Bursa		0/8	1/7	5	20	1/20 (5)
Total		6/55	8/50	0/30	135	14/135 (10.4)

2014-2015 yılları arasındaki çalışma sonucunda Ankara (93 adet sığır ve 40 adet koyun numune), Kayseri (25 adet sığır ve 15 adet koyun numune), Afyon (35 adet sığır ve 20 adet koyun numune), İzmir (59 adet sığır ve 20 adet koyun numune), Aydın (50 adet sığır ve 20 adet koyun numune) ve Bursa'dan (50 adet sığır ve 20 adet koyun numune) toplam 447 sığır ve koyundan örnek alındı. Alınan örnekler 31 adet (% 6.94) *Salmonella* şüpheli bulundu, biyokimyasal testlerle desteklenerek identifiye edildi. Ticari bir biyokimyasal kit olan Microgen® *Salmonella* Rapid Test (Microgen GN-ID System) ile test edilen tüm suşlar bilgisayar ortamında *Salmonella* spp. olarak tespit edildi. İncelenen dışkı deri ve lenf nodüllerden izole edilen Salmonellalara serortiplendirme yapıldı.

Sığırlardan, Ankara'da Gölbaşı ve Polatlı ilçelerinden toplam 3 ahır ve 2 kesimhaneden 176 örnek alındı; 5 pozitif sonuç bulundu. İzmir' de 2 ahır ve 1 kesimhaneden 59 örnek alındı; alınan örneklerden 3 tanesi pozitif bulundu. Aydın'da bir ahır ve 1 kesimhaneden 30 örnek alındı; 3 örnek pozitif bulundu. Bursa'da bir ahır ve 1 kesimhaneden 30 örnek alındı, 3 adet pozitif materyal tespit edildi. Afyon'da bir ahır ve 1 kesimhaneden 30 örnek alındı, örneklerden 2 tanesi pozitif olarak tespit edildi. Kayseri'de ise 25 örnek alındı, 2 tane pozitif sonuç bulundu. Koyunlarda ise, Ankara'da Gölbaşı ve Polatlı ilçelerinden toplam 3 ahır ve 1 kesimhaneden 40 örnek alındı; 8 pozitif sonuç bulundu. İzmir' de bir ahır ve 1 kesimhaneden 20 örnek alındı; alınan örneklerden 1 tanesi pozitif bulundu. Aydın'da bir ahır ve 1 kesimhaneden 20 örnek alındı; 3 örnek pozitif bulundu. Bursa'da bir ahır ve 1 kesimhaneden 20 örnek alındı, 1 adet pozitif materyal tespit edildi. Afyon'da bir ahır ve 1 kesimhaneden 20 örnek alındı, örneklerden 1 tanesi pozitif olarak değerlendirildi. Kayseri'de ise 15 örnek alındı, pozitif sonuç bulunamadı (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.4).

3.2. Sığır ve Koyunlarda Belirlenen *Salmonella* Serotipleri

Serotiplendirme sonucunda, 31 (%6.94) oranında *Salmonella* spp. tiplendirildi. *Salmonella* suşlarının *S. Typhimurium* (n 4), *S. Anatum* (n 3), *S. Newport* (n1), *S. Enteritidis* (n 2), *S. Amager* (n 1), *S. Liverpool* (n 1), *S. Kentucky* (n 1), *S. II 48:d:z₆* (n 3), *S. II 42:enx :1,6* (n 1), *S. IIIb 61:k:1,5* (n 9), *S. IIIb 61:1,v:1,5,7* (n 4) ve *S. IIIb 50:k:z₃₅* (n 1) serotipleri de bu çalışmada identifiye edildi ve serotiplendirildi (Çizelge 3.5). Bu izolatlar Türkiye Cumhuriyeti'nin farklı bölgelerinden toplandı; Ankara (13 izolat), Kayseri (2 izolat), Afyon karahisar (3 izolat), İzmir (4 izolat), Aydın (6 izolat) ve Bursa (3 izolat) (Çizelge 3.1 ve 3.3). Ülkenin farklı yerlerinden toplanan örnekler Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda analiz edildi. Tüm *Salmonella* serotipleri için analiz yapıldı. Serotipler sığır ve koyunlardan izole edilenler (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* ve *S. Diarizonae*) ve diğer gıda kaynaklı serotipler olmak üzere gruplandırıldı. 25g. dışkıdaki *Salmonella* spp. 17/251 örnekte (6.8% sığır ve koyun), deri svablarında 14/214 örnekte (% 6.5) tespit edilirken; lenf nodüllerinde ise hiç *Salmonella* spp. pozitifliği bulunmadı. Toplanan örneklerden; dışkı ve deri svabından ortak olarak izole ve identifiye edilen serotip *S. Typhimurium*, *S. IIIb 61:k:1,5* ve *S. IIIb 61:1,v:1,5,7* dır. Sonuç olarak birçok serotip izole edildi fakat yaygın olarak *S. Typhimurium* (% 1.28), *S. Anatum* (% 0.96, *S. II 48:d:z₆* (% 0.96), *S. IIIb 61:k:1,5* (%6.7) ve *S. IIIb 61:1,v:1,5,7* (%3.0) izole edildi. Bu serotipler sıklıkla sağlıklı sığır ve koyunların dışkı ve derilerinden izole edildi (Serotiplerin antijenik formülleri Çizelge 3.6'de; izolasyon ve identifikasyon sonuçları Çizelge 3.5'de gösterildi).

Çizelge 3.5. Tüm İzole ve İdentifiye Edilen *Salmonella* Serotiplerinin Sonuçları

Serotipler	Sığır	Koyun	Total oran
<i>S.</i> Typhimurium	4/312		%1.28
<i>S.</i> Anatum	3/312		%0.96
<i>S.</i> II 48:d:z6	3/312		%0.96
<i>S.</i> Enteritidis	2/312		%0.64
<i>S.</i> Newport	1/312		%0.32
<i>S.</i> Liverpool	1/312		%0.32
<i>S.</i> Kentucky	1/312		%0.32
<i>S.</i> Amager	1/312		%0.32
<i>S.</i> II 42:enx:16	1/312		%0.32
<i>S.</i> IIIb 61:k:1,5		9/135	%6.7
<i>S.</i> IIIb 61:l,v:1,5,7		4/135	%3.0
<i>S.</i> IIIb 50:k:z35		1/135	%0.74
Total	17/312 (5.5)	14/135 (10.4)	% 15.9

Çizelge 3.6. İzole ve identifiye edilen *Salmonella* serotiplerinin antijenik formülleri

Hayvan türü	Serotip adı	Grup	Somatik O antijeni	Flagellar H antijeni	
				Faz 1	Faz 2
Sığır	<i>S.</i> Typhimurium	B	1, 4, (5),12	i	1,2
	<i>S.</i> Amager	E ₁	3, { 10 } {15}	y	1,2
	<i>S.</i> Newport	C ₂	6,8	e,h	1,2
	<i>S.</i> Anatum	E ₁	3,10	e,h	1,6
	<i>S.</i> Liverpool	E ₄	1,3,19	d	e,n,z ₁₅
	<i>S.</i> Kentucky	C ₃	8,20	i	Z ₆
	<i>S.</i> Enteritidis	D ₁	1,9,12	g,m	1,7
	<i>S.</i> II 48:d:z6	Y	48	d	Z ₆
	<i>S.</i> II 42:enx:1,6	T	42	x	1,6
Koyun	<i>S.</i> III				
Koyun	<i>S.</i> IIIb 61:k:1,5	O61	61	k	1,5
Koyun	<i>S.</i> IIIb 61:l,v:1,5,7		61	r	1,5,7

3.3. Ribotiplendirme Bulguları

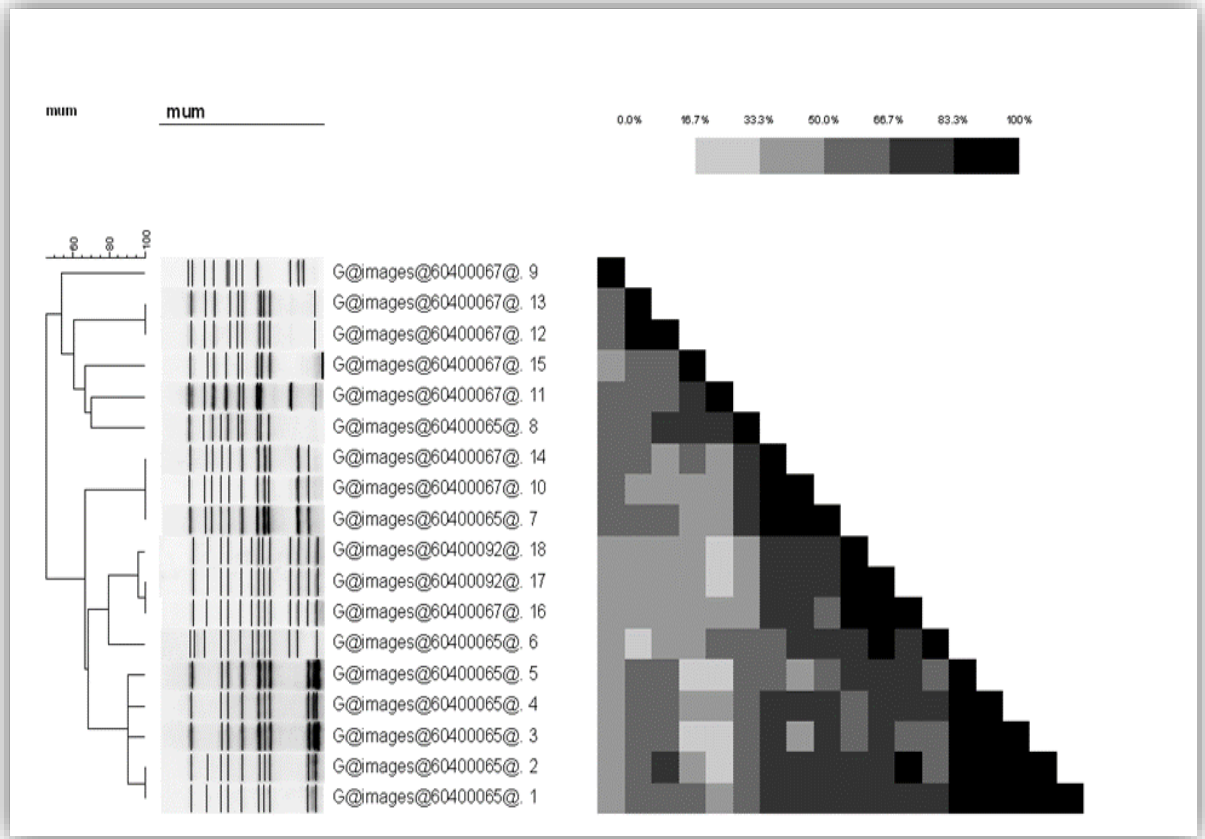
Serotiplendirme analizi sonucu elde edilen 31 adet *Salmonella* izolatının her biri için ribotiplendirme analizi gerçekleştirilmiştir. Bu örneklerden 4'ünün *S. Typhimurium* (% 1.28), 3'ünün *S. Anatum* (% 0.96), 3'ünün *S. II 48:d:z6* (% 0.96), 2'inin *S. Enteritidis* (% 0.64) ve birer tanesininde *S. Newport* (% 0.32), *S. Liverpool* (% 0.32), *S. Kentucky* (% 0.32), *S. Amager* (% 0.32), *S. II 42:enx:1,6* (% 0.32) oldukları tespit edilmiştir. Koyunlardan ise 9'ünün *S. IIIb 61:1,v:1,5,7* (% 6.92), 4'ünün *S. III 61:k:1,5* (% 3.1) ve bir tanesinin *S. IIIb 50:k:z35* (% 0.77) oldukları tespit edilmiştir. Tiplendirilme sonucunda farklı serotiplere yönelik ribopaternlerde *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. II 48:d:z6*, *S. Enteritidis*, *S. Newport*, *S. Liverpool*, *S. Kentucky*, *S. Amager*, *S. II 42:enx:1,6*, *S. IIIb 61:1,v:1,5,7*, *S. III* spesifik bantlar vermiştir.

3.4. Serotip Ribotip Karşılaştırılması

Sığırlardan izole ve tanımlanmış *Salmonella* serotiplerinin serotiplendirmeleri ve ribotiplendirmeleri arasındaki benzerliğe bakıldı. Serotiplendirmede bulunan bazı serotiplere ribotiplendirme sonucunda farklı serotipler olduğu görüldü. Örneğin; *S. Dublin*'in - *S. Enteritidis*, *S. Hayindogo*'nun - *S. Anatum*, *S. Sao*'nun - *S. Liverpool*, *S. Malmoa*'nın - *S. Kentucky*, *S. Tomegbe*'nin - *S. II 48:d:z6*, *S. II 42: b:1,5*'in - *S. II 48:d:z6*, *S. Faji*'nin - *S. II 48:d:z6* oldukları tespit edilmiştir.

Koyunlardansa *S. IV 50:a*'nın - *S. III*, *S. IIIb 50:K:Z35*'nin - *S. III*, *S. IIIb 61:K:1,5*'nin - *S. III*, *S. IIIb 61:K:1,5*'nin - *S. IIIb 61:1,v:1,5,7*, *S. IIIb*'nin - *S. IIIb 61:1,v:1,5,7*, *S. IIIb 61:1,v:1,5,7* ve *S. IIIb*'nin - *S. IIIb 61:1,v:1,5,7* oldukları tespit edilmiştir. *Salmonella* spp olan fakat serotiplendirmede tespit edilmeyen 3 suşun ribotiplendirmesi *S. III* olarak bulundu.

Salmonella, tür içi ve türler arasındaki genetik benzerlik ayrı ayrı dendogramlar olarak gösterilmiştir şekil 3.1.



Şekil 3.1. *Salmonella*, tür içi ve türler arasındaki genetik benzerlik ayrı ayrı dendogramlar

3.5. Antibiyotik Duyarlılık Testi Bulguları

İzole edilen *Salmonella* serovarlarında Cefotaxime, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Gentamicin, Nalidixic acid, Tetracycline, Streptomycin ve Kanamycin'e karşı duyarlılık görülürken, sığır ve koyunlarda daha çok Ampicillin'e karşı duyarlılık tespit edildi. Streptomycin'e karşı duyarlılık koyunlarda az sayıda gözlenirken sığırlarda fazla sayıda gözlenmiştir. İzolatlar dirençli, orta derecede duyarlı ve duyarlı olmak üzere 3 sınıfa ayrılmıştır. Erythromycin ve Sulfonamide'lere karşı fazla sayıda direnç genellikle *Salmonella* serovarlarında gözlenmiştir. Bu sonuçlar sığırlarda ve koyunlarda *Salmonella* kontrolünde Ampicillin ve Sulfonamides'lerin etkili olmadığını göstermektedir. Sığır ve koyunlardan elde edilen *Salmonella* serovarlarının seçilen antibiyotiklere karşı dirençlilikleri (Çezilge 3.7 ve Çezilge 3.8)'de gösterilmiştir.

Dışkı ve deri örneklerinden izole edilen 31 *Salmonella* serovarından 3'ünde çoklu antibiyotik direnci saptandı (Çezilge 3.7 ve Çezilge 3.8). *Salmonella* Kentucky'de Ampicillin , Ciprofloxacin, Erythromycin, Gentamicin, Nalidixic Acid, Sulfonamides, Streptomycin ve Tetracyclin'e direnç saptanırken ; *Salmonella* Newport'de Ampisilin, Sefotaksim, Kloramfenikol, Sülfonamidler, Streptomisin ve Tetrasiklinler'e direnç saptanırken; *Salmonella* IIIb 61: 1,v:1,5,7 ' de ise Ciprofloxacin , Erthromycin, Gentamicin ve Sulfonamidlere direnç saptandı.

Çezilge 3.7. Sığırlardan izole edilen *Salmonella* serotiplerinin farklı antibiyotiklerle yapılmış antimikrobiyal duyarlılık testi

Antibiyotik Adı	Amp	CTX	(C)	CIP	E	GN	K	(Na)	(Su)	(S)	(Te)
<i>S. Typhimurium</i>	O	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>S. Typhimurium</i>	O	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>S. Typhimurium</i>	O	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>S. Typhimurium</i>	O	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>S. II 48:d:z6</i>	O	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>S. II 48:d:z6</i>	O	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>S. Anatum</i>	O	S	S	S	R	S	O	S	R	O	S
<i>S. Anatum</i>	O	S	S	S	R	S	S	S	R	O	S
<i>S. Anatum</i>	O	S	S	S	R	S	S	S	R	S	O
<i>S. Kentucky</i>	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R
<i>S. Newport</i>	R	R	R	S	O	S	S	S	R	R	R
<i>S. Enteritidis</i>	O	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
<i>S. II 42:x:16</i>	O	S	S	S	R	S	S	S	R	O	S
<i>S. Liverpool</i>	O	S	S	S	R	S	S	S	R	O	O
<i>S. Amagar</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	R	O	S

1: Ampisilin(Amp), Sefotaksim(CTX), Kloramfenikol(C), Siprofloksasin(CIP), Eritromisin(E), Gentamisin(GN), Kanamisin(K), Nalidiksik asit(Na), Sülfonamidler(SU), Streptomisin(S) ve Tetrasiklinler(TE)

2: Dirençli (R) Orta Duyarlı (O) Duyarlı (S)

Çezilge 3.8. Koyunlardan izole edilen *Salmonella* serotiplerinin farklı antibiyotiklerle yapılmış antimikrobiyal duyarlılık testi

Antibiyotik Adı	Amp	CTX	C	CIP	E	GN	K	Na	Su	S	Te
S. III (Dışkı)	S	S	S	S	R	S	S	S	R	O	S
S. III (Dışkı)	O	S	S	S	R	S	S	S	R	O	S
S. III (Deri)	O	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
S. III (Dışkı)	O	S	S	S	R	S	S	S	R	O	S
S. III (Dışkı)	O	S	S	S	R	S	S	S	R	O	S
S. III (Dışkı)	O	S	S	S	R	S	S	S	R	O	S
S. IIIb 61:1,v:1,5,7	O	S	S	O	R	R	O	S	R	O	S
S. IIIb (19 Dışkı)	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	O
S. IIIb (18 Dışkı)	S	S	S	S	R	S	S	S	R	O	O
S. IIIb (16 Dışkı)	S	S	S	S	R	S	S	S	R	O	S
S. IIIb (13 Deri)	O	S	S	S	R	S	S	S	R	S	O
S. IIIb (6 Deri)	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
S. IIIb (15)	O	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Kontrol Grup ATCC											
S.Typhimurium	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
S. Enteritidis	O	S	S	S	O	S	S	S	S	S	S
E. coli	R	S	S	S	R	S	S	S	S	O	S

1: Ampisilin(Amp), Sefotaksim(CTX), Kloramfenikol(C), Siprofloksasin(CIP), Eritromisin(E), Gentamisin(GN), Kanamisin(K), Nalidiksik asit(Na), Sülfonamidler(SU), Streptomisin(S) ve Tetrasiklinler(TE)

2: Dirençli (R) Orta Duyarlı (O) Duyarlı (S)

Çezilge 3.9. Hayvanlardan izole edilen *Salmonella* serotiplerinin farklı antibiyotiklere dirençlilik sonuçları

Antibiyotik Adı	Amp	CTX	C	CIP	E	GN	K	Na	Su	S	Te
<i>S. Typhimurium</i>	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4
<i>S. Enteritidis</i>	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2
<i>S. II 48:d:z6</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3
<i>S. Anatum</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3
<i>S. Kentucky</i>	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>S. Newport</i>	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1
<i>S. II 42:x:16</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1
<i>S. Liverpool</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1
<i>S. Amagar</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1
<i>S. IIIb 61:k:1,5</i>	0/9	0/9	0/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9	8/9	8/9	0/9
<i>S. III 50:k:z35</i>	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4	4/4	4/4	0/4
<i>S. IIIb 61:1,v:1,5,7</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1

Çezilge 3.10. Sığır ve koyunlardan izole edilen *Salmonella* serotiplerinin antibiyotik direnç oranları (%)

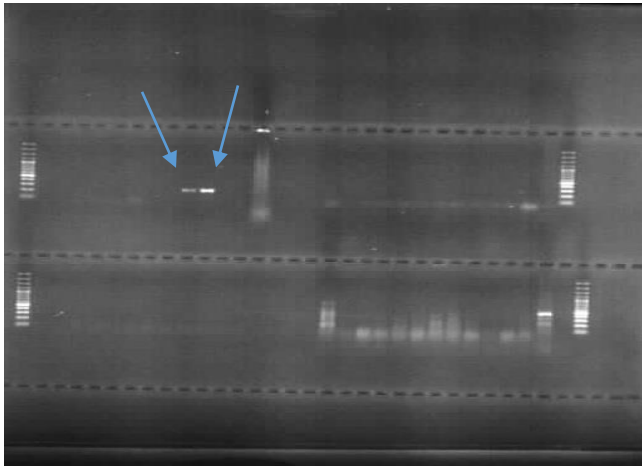
Hayvan	Antibiyotik Adı											Total direnç
	Amp	CTX	C	CIP	E	GN	K	Na	Su	S	Te	
Sığır (17)	2 (11.8)	1 (5.9)	1 (5.9)	1 (5.9)	16 (94.12)	1 (5.9)	0	1 (5.9)	17 (100)	2 (11.8)	2 (11.8)	23.5
Koyun (14)	0	0	0	0	14 (100)	1 (7.14)	0	0	13 (92.9)	1 (7.14)	0	18.8

3.6. Moleküler Tanı Bulguları

3.6.1. Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Varlığı

Bu tez çalışma sırasında sığır ve koyunlardan izole ve tanımlanmış *Salmonella* serovarları antibiyotik direnci ile ilişkili çeşitli gen bölgelerinin varlığı kontrol edilmiştir. Antibiyotik dirençliliğinin genetik bağının araştırılması amacıyla sınıf I integron analizleri, PCR yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışma sırasında izole ve tanımlanmış *Salmonella* serovarları antibiyotik direnci gösteren suşların direnç gösterdiği antibiyotikler seçilerek genel PCR yapıldı. Antibiyotikler (Eritromisin, Sülfonamidler, Tetrasiklinler), *Salmonella* serovarlarının antibiyotik direnci moleküler tanısında *sul1*, *tet (A)*, *tet (G)*, *tet (B)* ve *erm (B)* genlerine spesifik primerlerin kullanıldığı genel-PCR teknikleri kullanıldı (Su ve ark., 2006; Miriagou ve ark., 2006; Mulvey ve ark., 2006; Bolton ve ark., 2013). Bu tekniklerin spesifitesinin ortaya konması için pozitif ve negatif kontrol suşları ile gerçekleştirilen çalışmada *tet (A)* primerleri ile *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. II 48:d:z6*, *S. II 42:x:16*, *S. III* ve *S. IIIb* suşlarının hiçbirinde spesifik bant tespit edilemediği gibi, *S. Kentucky* ve *S. Newport* DNA'ları ile de spesifik bant profilleri gözlemlendi. Genel PCR sonucunda *S. kentucky* ve *S. Newport* spesifik bant profilleri tespit edildi. PCR sonuçlar sığırlardan izole edilen *S. Kentucky* ve *S. Newport* serovarlarının tetrasikiline karşı direnci *tet A* gen var olduğu ortaya çıktı.



Şekil 3.2. *tet A* primer kullanılarak farklı serotiplerle genel PCR (M;210bp, 9, 10 numaralı örnekler *S. Kentucky*; 9 numaralı örnek *S. Newport*; 10 numaralı örnek)

4. TARTIŞMA

Salmonella, dışkı ile kontamine herhangi bir materyalde, kanalizasyon sularında, çiftlik atık sularında ve doğada yaygın olarak bulunmaktadır (OIE, 2010). *Salmonella* genç ve gebe hayvanlar da dahil olmak üzere tüm evcil hayvan türlerini etkilemektedir. En duyarlı hayvan grubu ise laktasyondaki hayvanlardır (WHO (GFN), 2010; OIE, 2010). Evcil hayvanlar arasında sığır ve koyunlar, *Salmonella*'nın en önemli rezervuarlarından birini oluşturmaktadırlar. İnfeksiyona sebep olan serotipler geniş bir skalaya sahiptirler. Çiftlik çevresinden alınan örneklerden *Salmonella*'nın yüksek oranda izole edildiği bildirilmiştir. Bu da bu bölgelerin *Salmonella* için önemli bir rezervuar olabileceğini göstermiştir. *Salmonella*, hemen hemen tüm omurgalıları infekte etmesine rağmen infeksiyonun ciddiyeti, konak duyarlılığına bağlı olarak serotipten serotipe değişkenlik göstermektedir (Murray, 1991; Cobbold ve ark., 2006; Rodriguez ve ark., 2006; Brichta-Harhay ve ark., 2008).

Salmonella konağın lenfoid dokusu, derisi ve dışkısında hayatta kalma ve invazyon yeteneği ile tanınan çok yönlü bağırsak patojenidir. Lenf nodülleri, deri ve dışkının koyun ve sığır ürünlerinde *Salmonella* kontaminasyonunun kaynağı olabileceği teyit edildikten sonra infeksiyona sebep olan serotiplerin ve antibiyotik duyarlılık profillerinin incelenmesi önem kazanmıştır. Bazı *Salmonella* serotiplerinin; konak durumu, bulaşma yolu ve alınan bakteri yüküne bağlı olarak insanlarda infeksiyona sebep olduğu görülmektedir (Jones ve ark., 2008). *Salmonella* serotipleri konak çeşitliliği ve konak türleri arasındaki dağılım bakımından farklılıklar göstermektedir. Fakat konak çeşitliliğini belirleyen moleküler ve evrimsel belirleyiciler hakkındaki bilinenler hala sınırlıdır bu durum da günümüzde halk sağlığına dair değerlendirme yapmayı zorlaştırmaktadır (Hoelzer ve ark., 2011). Yapılan çalışmaların sadece az bir kısmı deri, dışkı ve lenf nodüllerindeki *Salmonella* varlığının, koyun ve sığır etinde *Salmonella* kontaminasyonuna yol açtığını açıklamıştır.

Salmonella serotipleri insanlarda gıda kaynaklı infeksiyonlara sebep olan etkenlerin başında gelmektedir. Et ve süt tüketiminin insanlardaki Salmonellozis salgınlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hayvanlarda özel olmayan Salmonellosis etkenlerinin çoğu et, süt gibi gıdalarla insanlara bulaşarak insanlarda gastroenteritisleri neden olmaktadır. O nedenle bu etkenlerin ayrıca zoonotik önemleri vardır (İzgür, 2006). *Salmonella*; bir çok serotipinin sahip olduğu antimikrobiyel direnç yüzünden de halk sağlığını tehdit etmektedir. Kesimhaneler ve veteriner teşhis merkezlerinden izole edilen *Salmonella* örneklerinin %44'ünün en az bir antimikrobiyel ajana dirençli olduğu bildirilmiştir (Foley ve Lynne, 2008). Son yıllarda antibiyotik kullanımına bağlı dirençli *Salmonella* serotiplerinin artışı endişe kaynağı olmaktadır. Endişenin bir kısmını ise bu etkenlerin, iki ya da daha fazla antibiyotiğe karşı çoklu ilaç direnci kazanmaları oluşturmaktadır. Siprofloksasin, ofloksasin gibi florokinolonlar ve seftriakson ve sefotaksim gibi geniş spektrumlu sefalosporinlerin alternatif etkileri kanıtlanmasına karşın bu ajanlara karşı direnç gelişmiştir (Parry, 2003; Akyala ve Alsam, 2015).

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde olduğu gibi, gerek gıdasal değer olarak ve gerekse ekonomiye sağladığı önemli katkılar nedeniyle Türkiye'de sığır ve koyun yetiştiriciliğinin önemi büyüktür.

Bu çalışmada iki yıllık süreç içinde İç Anadolu'da Ankara çevresi, Kayseri ve Afyonkarahisar çevresi, Ege ve Marmara bölgesinde; Aydın, İzmir ve Bursa çevresindeki sığır ve koyunlardan gelen 530 örnek incelendi. İncelenen materyalların (dışkı, deri svabı ve lenf nodülü) 31 adedinde (%5.85) *Salmonella* spp. izole ve identifiye edildi. *Salmonella* suşlarının *S. Typhimurium* (%1.28), *S. Anatum* (%0.96), *S. II 48:d:z₆* (%0.96), *S. Enteritidis* (%0.64), *S. Newport* (%0.32), *S. Liverpool* (%0.32), *S. Kentucky* (%0.32), *S. Amager* (%0.32), *S. II 42:enx:1,6* (%0.32), *S. IIIb 61:k:1,5* (%6.92), *S. IIIb 50:k:z35* (%3.07) ve *S. IIIb 61:1,v:1,5,7* (%0.77) olarak bulundu. Elde edilen sonuçlara göre, sığır ve koyun *Salmonella* serotip prevalansında farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Tüm koyun örneklerinde *Salmonella* serotip prevalansı (%10.4) sığırlardan (%4.3) daha yüksek bulunmuştur. Önceki yapılan benzer çalışmalarda Thorns, (2000)'nın Amerika'da besi sığırı yetiştiriciliği yapılan

çiftliklerde *Salmonella* prevalansının %3-5 oranında olduğu bildirilmiştir. Abouzeed ve ark, (2000)'nın yılında Prens Edward Adalarında serotiplerin virülans genlerine özgü primerler ile klasik PCR metodu kullanarak yaptıkları bir çalışmada; *Salmonella*'nın sığır işletmelerinde görülme oranının %4.6 olduğunu tespit etmişlerdir. Sığırlarda, EFSA (2015) raporuna göre Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmada dışkı, deri svabı ve lenf nodülü örneklerinden % 4 oranında *Salmonella* izole ve identifiye edilmiştir. 3243 izolattan en yaygın iki serotip *S. Typhimurium* (%46.8) ve *S. Dublin* (%31.3) olurken bunları üçüncü sırada %4.6 oranla *S. Enteritidis* izlemiştir. Bu izolatların büyük bir kısmı (1,866) Almanya'dan gelmiştir. Bu sebeple tüm sığır izolatlarının %57.5'i raporlanmıştır. İngiltere'de 554 *Salmonella* izolatı, Hollanda'da 508 ve İrlanda'da 264 izolat rapor edilmiştir. *S. Typhimurium* (%46.8) Almanya ve Hollanda'da en baskın serotip olarak belirlenmiştir. Fakat İngiltere ve İrlanda'da *S. Tyhmurium* (%5.2 ve %11) daha düşük oranda izole edilmiştir.

Sığırlarda *Salmonella* serotipleri arasındaki dağılım; üretim sistemleri, klinik belirtiler, yaş, coğrafik bölge ve zamana göre büyük oranda değişiklik göstermektedir. Örneğin; Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Veteriner Servis Laboratuvarı (NVSL) 2005-2006 yıllarında klinik olarak hasta sığırlardan en sık olarak *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Orion*, *S. Montevideo* ve *S. Agona*' yı izole ettiklerini rapor ederken; aynı zaman diliminde klinik olarak sağlıklı sığırlardan ise *S. Cerro*, *S. Kentucky*, *S. Anatum*, *S. Newport*, *S. Montevideo*, ve *S. Orion*' un izole edildiği bildirilmiştir (APHIS, 2006). Warnick ve ark., (2001), Blau ve ark., (2005) ile Cobbold ve ark., (2006) sürü içindeki ve sürüler arasındaki *Salmonella* prevalansının oldukça değişken olduğunu tahmin etmektedirler. Sığır işletmeleri için; sürüler arasındaki nokta prevalansı %2-42 arasında iken sürü içerisinde ise %0-37 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Ek olarak; sürü içi prevalansı, klinik olarak hastalık belirtisi gösteren hayvanlarda, hastalık belirtisi göstermeyen hayvanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca serotip dağılımı klinik belirti gösteren ve göstermeyen sürüler arasında farklılık gösterebilmektedir.

Sığırlarda olduğu gibi, koyunlarda da *Salmonella* prevalansı önemli ölçüde değişiklik göstermektedir. Habrun ve ark, (2006); Belloy ve ark, (2009), küçük ruminantlar arasındaki *Salmonella* prevalansının serotip, sürü ve coğrafi bölgelere bağlı olarak oldukça değişken olabileceğini bildirmişlerdir. Koyunlarda *Salmonella* Abortusovis'e bağlı büyük salgınlar durmadan rapor edilmektedir. Örneğin *S. Abortusovis*'in, İsviçre'de 2003-2007 yılları arasında kuzulama kayıplarına %70'e yakın katkısı olduğu bilinmektedir. *S. Abortusovis*'in sürü içindeki prevalansı yüksektir; %20-50 arasında olduğu rapor edilmiştir. Alvseike ve Skjerve, (2002) *S. Diarizonae*'yi koyuna adapte olmuş diğer bir yaygın serotip olarak bildirmişlerdir. Örneğin Norveç'te koyun sürülerindeki *S. Diarizonae* prevalansı yaklaşık olarak %12 olarak bildirilmiştir. Örneklerin mezbahanedeki toplanmasına ve artan stres koşullarının prevalansın yüksek görünmesine sebep olmasına rağmen sürü içi prevalans %0-45 olarak tespit edilmiştir.

Hjartardottir ve ark, (2002), Woldemariam ve ark, (2005), Cortés ve ark, (2006), farklı ülkelerdeki koyun mezbahanelerinde; *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, ya da *S. Saintpaul*'un da dahil olduğu çeşitli *Salmonella* serotiplerinin yüksek prevalansa (genellikle %17-60) sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Ancak Hindistan ve Etiyopya'da koyun mezbahalarında daha düşük bir prevalans olduğu bildirilmiştir.

Koyun çiftliklerinde sağlıklı hayvanların *Salmonella* prevalansının oldukça düşük olduğu ve prevalansın sıklıkla %0-4 aralığında olduğu tahmin edilmektedir.

Sağlıklı sığırlarda olduğu gibi, sağlıklı koyunlarda da *Salmonella* prevalansının düşük olduğu tespit edilmiştir. Beach ve ark, (2002) tarafından yapılan çalışmada Amerika'da koyun karkasları araştırıldığında %1,5 oranında *Salmonella* pozitifliği saptanmıştır. EFSA (2015), ülkeler arası çeşitliliğin saptanması ve araştırılmasında örnekleme boyutu ve test yöntemlerine dikkat etmenin önemli olduğunu belirtmiştir. Ayrıca örnekleme dönemi pozitif örneklerin oranı açısından dikkate değer oranda sonucu etkilemektedir. Çünkü *Salmonella*'nın gıdalarda ve hayvanlarda yaz boyunca sıklıkla tespit edildiği bilinmektedir.

Salmonella sığır ve koyun işletmelerinden örnek bazında farklı oranlarda izole edilmektedir. Bu çalışmada materyal temelli bir değerlendirme yapıldığında izolasyon oranları %6, 8 (17 örnek) dışkı; %6, 5 (14 örnek) deri; %0 lenf nodülü şeklindedir. Sığırlarda %5,6 (11 örnek) dışkı; %3,6 (6 örnek) deri; %0 lenf nodülü iken koyunlarda %10,91 (6 örnek) dışkı; %17,8 (8 örnek) deri; %0 lenf nodülü olarak bulunmuştur. Koyunlarda deri swab % 17, 8 (8 örnek) *Salmonella* serovar prevalansı dışkı örneklerinin %10,91 (6 örnek) daha yüksek bulunmuştur. Bunun aksine; sığırlarda dışkı örnekleri üzerinde *Salmonella* serovar % 5,6 (11örnek) prevalansı % 3,6 (6 örnek) deri swab örneklerdeki izolasyonun daha yüksek olduğu görülmüştür. Brichta-Harhay ve arkadaşları, (2008) Amerika Birleşik Devletleri'nde kesimhaneden sığır deri ve karkasların *Salmonella* ve *Escherichia coli* O157: H7 ile kontamine ederek yaptıkları bir çalışmada *Salmonella*'nın ortalama prevalansı % 89.6 olduğu ortaya konmuşlar.

Salmonella'ların moleküler tanısı için spesifik, duyarlı, hızlı, kolay ve belirgin olarak ayırımı sağlayan güvenilir yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir ve özellikle son yıllarda bu amaçla kullanılmaya başlanan DNA temelli moleküler yöntemlerinden ribotiplendirme, en önde gelen yöntemlerden birisi olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada *Salmonella*'ların tür düzeyinde ayırımına yönelik tiplendirilmesi için ribotiplendirme yöntemi kullanılmış ve serotiplerin riboprinter ile tespiti gerçekleştirilmiştir. Bu tiplendirilme sonucunda farklı serotiplere yönelik ribopaternlerde *S. Typhimurium*, *S. Anatum* *S. II 48:d:z₆*, *S. Enteritidis*, *S. Newport*, *S. Liverpool*, *S. Kentucky*, *S. Amager*, *S. II 42:enx:1,6*, *S. IIIb 61:1,v:1,5,7*, *S. III* spesifik bantlar vermiştir. Bu suşların ISO 6579 yöntemi ile izolasyonu ve identifikasyonu sırasında birbirine yakın belirli suşlar ayırt edilememiştir. Ancak bu nedenle yapılan ribotiplendirme genetik analizi ile izole edilen tüm *Salmonella* serotiplerinin ayırımı başarıyla yapılmıştır.

Sığır ve koyun kaynakları antibiyotiğe dirençli olan *Salmonella* rezervuarlarıdır. *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Newport*, *S. Enteritidis*, *S. Ameger*, *S. Liverpool*, *S. Kentucky*, *S. II 48:d:z6*, *S. II 42:enx:1,6*, *S. IIIb*, *S. III* and *S. IIIb 61:1,v:1,5,7* serotipleri sülfanomidler ve eritromisin için dirençli bulunmuştur. *S. Kentucky* ve *S. Newport* izolatlarında Ampisilin, Siprofloksasin, Profloksasin, Eritromisin, Gentamisin, Nalidisik asit, Sulfonamidler, Streptomisin ve Tetrasiklin için çoklu antibiyotik direncine sahip olduğuna bulunmuştur. Bu bulgular APHIS (2006) ve Anonymous (2006) ile benzerdir.

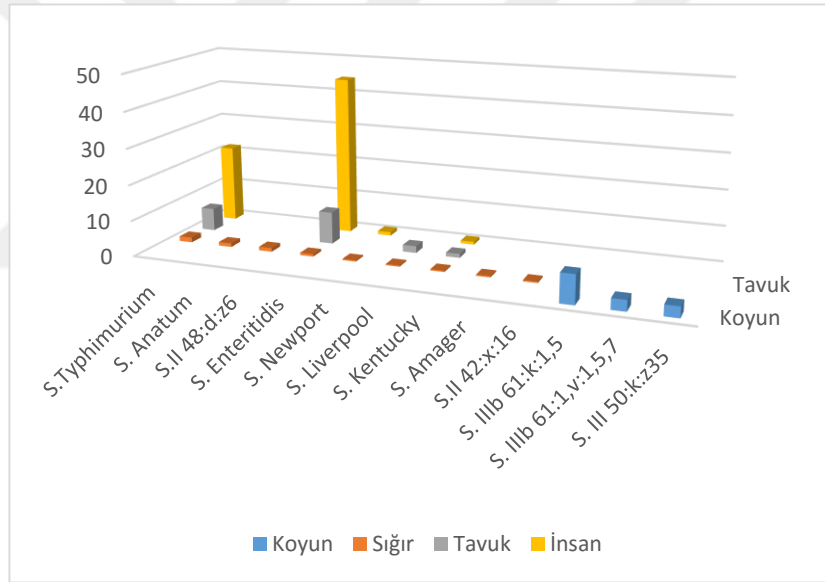
Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre, antibakteriyel ilaç listesinden en avantajlı olanların Kloramfenikol ve Kanamisin olduğu tespit edilmiştir. Siprofloksasin, Eritromisin, Gentamisin, Nalidisik asit ve Tetrasiklin ise *Salmonella Kentucky*' nin tüm suşlarının dirençli olduğu antibiyotiklerdir. *Salmonella* serotiplerinin %78,9 oranında büyük çoğunluğunun antimikrobiyallere duyarlı olduğu bazılarının ise orta duyarlılıkta olduğu görülmüştür. Bu bulgular Banani ve ark, (2003); Zhang ve ark, (2006) ve Karim ve ark, (2008). ile benzerlik göstermektedir.

APHIS, (2006); Anonymous, (2006) bazı istisnalar ile birlikte antimikrobiyal direncin serotip ve hayvan türlerinin klinik durumundan etkilendiğini belirtmiştir. Genellikle aynı çiftlik veya kesimhane orijinli benzer serotipler düşük direnç gösterirken, tanı sonrası elde edilen suşların daha çok antimikrobiyale direnç gösterdiği bulunmuştur.

Çalışma sırasında izole ve identifiye edilen *Salmonella* serotipleri arasından Eritromisin, Sülfonamidler, Tetrasikline direnç gösteren suşlar için genel PCR yapıldı. PCR'da *sul1*, *tetA*, *tetG*, *tetB* ve *ermB* genlerine spesifik primerler kullanıldı. Bu aşamada pozitif ve negatif kontrol de ele alındı. *tetA* PCR reaksiyonu sonrasında *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. II 48:d:z6*, *S. II 42:enx:1,6*, *S. III* ve *S. IIIb* suşlarının hiçbirinde spesifik bant tespit edilemezken; *S. Kentucky* ve *S. Newport* serotipleri için bant oluşumu gözlemlendi.

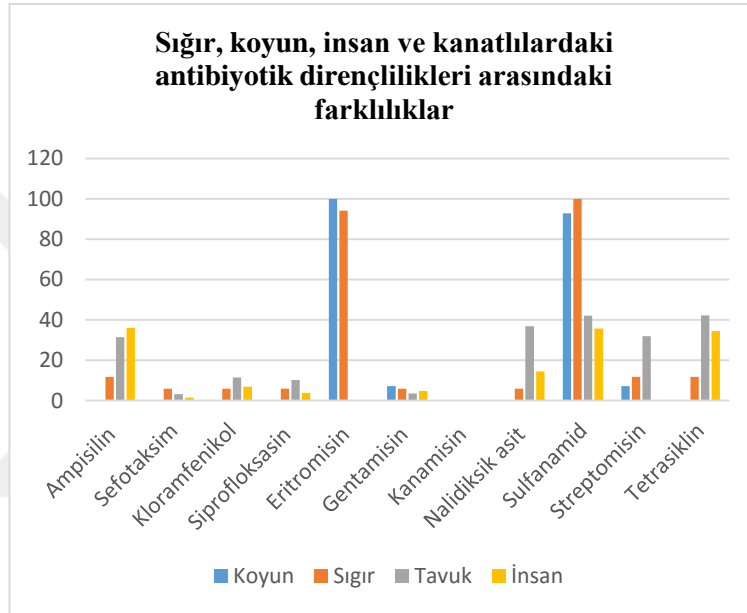
Sığır ve koyunlardan izole ve identifiye edilen *Salmonella* serotiplerinin insan ve kanatlılardaki dağılımını belirlemek amacıyla, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı *Salmonella* laboratuvarında kültür koleksiyonunda bulunan ve daha önce Anabilim Dalımız tarafından yürütülen projelerde izole ve identifiye edilen kanatlı kökenli *Salmonella* serovarları ve bu tez çalışmasında izole ve identifiye edilen serovarlar karşılaştırılarak; ortak serovarların dağılımını ortaya konulmuştur.

Çizelge 4.1. Sığır ve Koyunlardan İzole ve İdentifiye Edilen *Salmonella* Serotiplerinin İnsan ve Kanatlılardaki Dağılımı



Sığır, koyun, insan ve kanatlılardaki antibiyotik dirençlilikleri (antimikrobiyel duyarlılık profilleri) arasındaki benzerliği veya paralelliği çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Sığır, koyun, insan ve kanatlılardaki antibiyotik dirençlilikleri (antimikrobiyel duyarlılık profilleri) arasındaki benzerliği veya paralelliği (EFSA ve ECDC, 2015).



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan bu tez çalışması Türkiye'deki sığır ve koyun yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı İç Anadolu'da; Ankara, Kayseri ve Afyon Karahisar çevresi, Ege ve Marmara bölgesinde; Aydın, İzmir ve Bursa şehirlerindeki farklı ahır ve kesimhanelerden gelen 530 örnek incelendi, incelenen değişik materyallerin (dışkı, deri svabı ve lenf nodülü örnekler) 31 adedinde (5.85 %) *Salmonella* spp izole ve identifiye edilmiştir. Sığırlardan toplanan 395 örnek 17 adet *Salmonella* spp izole ve identifiye edilmiştir. Bu izolatlar arasında *S. Typhimurium* (%1.28), *S. Anatum* (%0.96), *S. II 48:d:z₆* (%0.96), *S. Enteritidis* (%0.64), *S. Newport* (%0.32), *S. Liverpool* (%0.32), *S. Kentucky* (%0.32), *S. Amager* (%0.32), *S. II 42:enx:1,6* (%0.32) olarak bulunmuştur. Koyunlardan ise 135 örnek 14 adet *Salmonella* spp izole ve identifiye edilmiştir. Bu izolatlar arasında *S. IIIb 61:k:1,5* (%6.92), *S. IIIb 50:k:z₃₅* (%3.07) ve *S. IIIb 61:1,v:1,5,7* (%0.77) olarak tespit edilmiştir. İzolatlar arasında sığırlardan %1.28 oranıyla *S. Typhimurium*, koyunlarda ise % 6.92 oranıyla *S. IIIb 61:k:1,5*' in en fazla izole edilen 2 serotip olduğu belirlenmiştir.

Çalışma sırasında izole ve identifiye edilen *Salmonella* serotipleri antibiyotik duyarlılık testi yapılarak antibiyotik dirençlilikleri saptanmıştır. İzolatlar dirençli, orta derecede duyarlı ve duyarlı olmak üzere 3 sınıfa ayrılmıştır. Erythromycin ve Sulfonamid'lere karşı fazla sayıda direnç genellikle *Salmonella* serovarlarında gözlenmiştir. Bu sonuçlar sığırlarda ve koyunlarda *Salmonella* kontrolünde Ampicillin ve Sulfonamid'lerin etkili olmadığını göstermektedir. *S. Kentucky* ve *S. Newport* diğer *Salmonella* serotiplerine göre daha fazla dirençliliğe sahip olduğu görülmüştür.

Tezde elde edilen bir başka önemli sonuç ise, antimikrobiyal direnç genlerinin varlığının kontrol için antibiyotik direnci gösteren *Salmonella* suşların direnç gösterdiği antibiyotikler genel PCR yapılarak saptandı; Tetrasiklinlerin (*tetA*) primerleri ile *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. II 48:d:z₆*, *S. II 42:enx:1,6*, *S. III* ve *S. IIIb* suşlarının hiçbirinde spesifik bant tespit edilemediği gibi, *S. Kentucky* ve *S. Newport* DNA'ları ile de spesifik bant profilleri gözlemlendi.

Bu çalışma, Türkiye'nin tüm bölgelerinde sığır ve koyunlarda *Salmonella* serotiplerinin araştırılmasının gerekliliğini göstermiştir. Düzenli epidemiyolojik çalışmalar, salmonellozisin önlenmesine yönelik sağlam stratejilerin geliştirilmesini sağlayabilir. Hijyen de dahil haşere kontrolü, (kemirici ve kuşlar da *Salmonella* taşıyabilir), hasta ve sağlıklı hayvanların biyogüvenlik için ayrımı özellikle buzağılama bölgelerinde yapılmalıdır. Lam aglütinasyonu ile sığır ve koyunların saha vakalarında hızlı bir tespit yapılabilir. Ancak, küçük laboratuvarların genellikle bu analiz için gerekli serum kaynaklara erişimi yoktur ve izolatları analiz etmek için diğer tekniklere başvurmak durumunda kalmaktadırlar.

Salmonella enterica subspecies *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7), Türkiye tarihinde ilk kez Türkiye'deki koyunlardan izolasyonu bildirilmeyen serotiplerden birinin olduğu bu çalışmada belirlendi.

Antibiyotik direnç analizi ile antibakteriyal ajan olarak Kloramfenikol ve Kanamisin'in duyarlı olduğu görülmüştür. Çok sayıda çalışma, *Salmonella* enfeksiyonlarında tedavi ve korumada yanıtın oldukça zayıf kaldığının rapor etmiştir. Klinik bulguları azaltan ancak korumada yeterli olmayan bir aşı da mevcuttur. Son olarak, gıda kaynaklı salmonellozise neden olan *Salmonella* serotipleri üzerine olan temel uygulamalı çalışmalar, hastalığın önlenmesi ve kontrolü için önemli rol oynamaktadır. Bu yeni ortaya çıkan antibiyotik direnci ise eğilimlerin tespit edilmesi için izleme sistemlerinin önemini göstermektedir.

ÖZET

Sığır ve Koyunlarda *Salmonella* Serotiplerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, Türkiye’de sığır ve koyun yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı İç Anadolu’da; Ankara, Kayseri ve Afyon Karahisar çevresi, Ege ve Marmara bölgesinde; Aydın, İzmir ve Bursa şehirlerindeki seçilen ahırlardan toplam 312 sığır ve 135 koyundan farklı örnekler alınmıştır. Bu tez çalışması Nisan 2014 - Ağustos 2015 döneminde Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ndaki farklı laboratuvarlarda yürütülmüştür. Araştırma kapsamında seçilen ahırlardan toplam 470 dışkı ve deri; kesimhanelerden ise 60 adet lenf nodülleri toplanarak toplam 530 örnek *Salmonella* yönünden incelenmiştir.

Salmonella izolasyon ve identifikasyonunun değerlendirilmesi 6579:2004 (ISO) Uluslararası Metot Standardizasyonu Organizasyonu tarafından kabul edilen standart metotlar uygulanarak gerçekleştirildi. Prosedür dahilinde ön zenginleştirme için Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS), selektif zenginleştirme için Modified Rappaport Vasilliadis Semi Solid (MRSV) ve Muller Kauffmann Tetrathionat novobiocin Broth (MKTTn) ve izolasyon için selektif besiyeri olan , Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) ve Xylose Lysine Tergitol 4 (XLI4) agar kullanıldı. *Salmonella* şüpheli bulunan kolonilerinin identifikasyonu, biyokimyasal ve serolojik yöntemlerle gerçekleştirildi. Serotiplendirme ise Kauffmann-White-Le Minor klasifikasyon şemasına göre yapılmıştır.

Çalışmada incelenen 530 sığır ve koyun materyallerinden (deri swab, dışkı ve lenf nodülü) 31 adedi *Salmonella* yönünden pozitif olarak bulunmuştur. İzole ve identifiye edilen 31 adet *Salmonella* izolatının 13’ünün (%4.2) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* olup , 4’ünün *Salmonella enterica* subsp. *salamae* (%1.3) serovarı olduğu, 14’inin (%10.8) ise *Salmonella enterica* subsp. *Diarizonae* olup 9’unun *S. IIIb* 61:k:1,5 (%7), 4’ünün *S. IIIb* 50:k:z35 (%3.1) ve 1’inin de *S. IIIb* 61:1,v:1,5,7 (%0.8)

alttürlerine ait olduğu belirlenmiştir. Sığırlardan izole edilen en yaygın serotipin %1.37 oranla *S. Typhimurium*, koyunlardaki en yaygın serotipin ise %9 oranla *S. IIIb 61: k: 1, 5* olduğu görölmüştür. İzole edilen bu etkenlerin ribotiplendirmesi, antibiyotik direncive bazı virulens faktörleri araştırıldı.

Anahtar Sözcükler: Koyun, Sığır, *Salmonella*



SUMMARY

Identification of *Salmonella* Serotypes in Cattle and Sheep

The focus of this study is isolation, identification and serotyping of *Salmonella* in cattle and sheep presented for slaughter and dairy farms of some regions in Turkey that cattle and sheep breeding is widespread like; in Anatolia, Ankara, Kayseri and Afyon; in Ege and Marmara regions, Aydın, İzmir and Bursa. The thesis work was carried out in the different laboratories of, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University (AU) Ankara, Turkey during the period from April 2014 to August 2015. A total number of 470 hides and feces samples were aseptically collected from convenience samples of cattle and sheep at dairy farms of selected areas, also 60 lymph node samples were collected from selected slaughterhouses.

Salmonella isolation and identification procedure, a standard and accepted method for the detection of *Salmonella* in feces, hides, lymph nodes is based on a traditional microbiological method, identification and typing of *Salmonella* according to the International Organization for Standardization Method 6579:2004 (ISO) was performed. Pre-enrichment procedure within Buffered Peptone Water, selective enrichment with Modified Rappaport Vasiliadis Semi Solid (MRSV) and Mueller Kauffmann Tetrathionate novobiocin Broth and selective medium for the isolation of, Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) and Xylose Lysine Tergitol 4 (XLT4) agar was used. The identification of suspect *Salmonella* colonies which were performed by biochemical and serological methods. Positive samples were serotyped and tested for susceptibility of some antibiotics.

In this study, among the 530 cattle and sheep material (hides swap, feces and lymph nodes), 31 were found to be positive for *Salmonella* spp. Among the cattle isolates 13 (4.2%) of them were identified as *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* and

4 of them (1.3%) was identified as *Salmonella enterica* subsp. *salama*. Beside this, 14 sheep isolates were found to be *Salmonella enterica* subsp. *Diarizona* among of which 9 (7%) were identified as *S.* IIIb 50: k: z₃₅, 4 (3.1%) were identified as *S.* IIIb 50: k: z₃₅. and 1 (0.8%) was identified as *S.* IIIb 61: 1, v: 1 5.7.

The most frequent serotypes were identified as *S.* Typhimurium (1.3%) in cattle and *S.* IIIb 61: k: 1, 5. (7%) in sheep. Ribotyping, antibiotic resistance and some virulence factors of the isolates were also investigated.

Keywords: Cattle, Sheep, *Salmonella*

KAYNAKLAR

- ABATCHA, M. G., ZAKARIA, Z., KAUR, D. G., THONG, K. L. (2014). Review Article: A trends of *Salmonella* and antibiotic resistance. *Advances in Life Science and Technology*, **17**, 9-21.
- ABOUZEED, Y. M., HARIHARAN, H., POPPE, C., KIBENGE, F. S. (2000). Characterization of *Salmonella* isolates from beef cattle, broiler chickens and human sources on Prince Edward Island. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **23(4)**, 253-266.
- AKYALA, A. I., ALSAM, S. (2015). Extended Spectrum Beta Lactamase Producing Strains of *Salmonella* species-A Systematic Review. *J Microbiol Res*, **5(2)**, 57-70.
- ALEXANDER, K. A., WARNICK, L. D., WIEDMANN, M. (2009). Antimicrobial resistant *Salmonella* in dairy cattle in the United States. *Vet Res Commun*, **33(3)**, 191-209.
- AIELLO SE. (1998). The Merck Veterinary Manual, 8th ed. Philadelphia: National Publ, p.: **20–123**.
- ALVSEIKE O, SKJERVE E. (2002). Prevalence of a *Salmonella* subspecies *diarizonae* in Norwegian sheep herds. *Prev Vet Med*, **52(3-4)**:277-285.
- ANALYTICA, O. (2012). The Costs of Animal Disease. *A report produced for the International Federation for Animal Health*.
- ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE (APHIS), UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. (2006). Report of the Committee on *Salmonella*, The National Veterinary Services Laboratory Report. Erişim: [<http://www.usaha.org/committees/reports/2006/report-sal-2006.pdf> or <http://www.usaha.org/Portals/6/Reports/2006/report-sal-2006.pdf>]. Erişim Tarih: 2006
- ANGELACHOV, A. (1964). Some aetiological and epidemiological features of abortion in ewes. *Veterinaria Sbirka, Bulgaria* **64**, 3–6.

- ANONYMOUS. (2006). National Antimicrobial Susceptibility Monitoring System, Annual Reports. Erişim: [<http://www.cdc.gov/narms/>]. Erişim Tarih: September 2006.
- ANTUNES, P., MACHADO, J., SOUSA, J. C., PEIXE, L. (2004). Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella* Typhimurium clone expressing an integron-borne OXA-30 β -lactamase. *J Antimicrob Chemother*, **54**(2), 429-434.
- ARTHUR TM, BRICHTA-HARHAY DM, BOSILEVAC JM, GUERINI MN, KALCHAYANAND N, WELLS JE, SHACKELFORD SD, WHEELER TL, KOOHMARAIE M. (2008). Prevalence and characterization of *Salmonella* in bovine lymph nodes potentially destined for use in ground beef. *J. Food Prot.***71**:1685–1688.
- AHVLA. (2012). *Salmonella* in Livestock Production in GB 2011 (ISBN 1 8995 1338 8). Erişim: [<http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140405112558/http://www.defra.gov.uk/ahvla-en/publication/salm11/>]. Erişim Tarih: 2012
- AWONG-TAYLOR, J., CRAVEN, K. S., GRIFFITHS, L., BASS, C., MUSCARELLA, M. (2008). Comparison of biochemical and molecular methods for the identification of bacterial isolates associated with failed loggerhead sea turtle eggs. *J Appl Microbiol*, **104**(5), 1244-1251.
- BABALOLA, O. O. (2004). Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. *Afr. J. Biotechnol.*, **2**(12), 710-713.
- BAKER, J.R., FAULL, W.B. AND RANKIN, J.E.F. (1971). An outbreak of salmonellosis in sheep. *Veterinary Record* **88**, 270–277.
- BANANI M, S.A POURBAKHS, P KHAKI AND G.H NIKOOKHESAL. (2003). Serotyping and drug sensitivity of *Salmonella* isolates from buffaloes submitted to Razi Institute. *Pajouhesh-va-sadandegi-in-Animal-Sciences*. **59**:92-96.

- BARKOCY-GALLAGHER GA, ARTHUR TM, RIVERA-BETANCOURT M, NOU X, SHACKELFORD SD, WHEELER TL, KOOHMARAIE M. (2003). Seasonal prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. *J Food Prot.* **66(6)**:1978-86.
- BEACH JC, MURANO EA, ACUFF GR. (2002). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in beef cattle from transport to slaughter. *J Food prot.* **65**, 1687–1693.
- BELL C, KYRIAKIDES A. (2002). *Salmonella: A practical approach to the organism and its control in foods*. Blackwell Science, p.: **299-315**
- BELLOY L, DECRAUSAZ L, BOUJON P, HACHLER H, WALDVOGEL AS. (2009). Diagnosis by culture and PCR of *Salmonella* Abortusovis infection under clinical conditions in aborting sheep in Switzerland. *Vet Microbiol*, **138(3-4)**:373-377.
- BESSER, T. E., GOLDOFT, M., PRITCHETT, L. C., KHAKHRIA, R., HANCOCK, D. D., RICE, D. H., GAY, C. C. (2000). Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 infections of humans and domestic animals in the Pacific Northwest of the United States. *Epidemiol Infect*, **124(02)**, 193-200.
- BOBO, L. D., DUBBERKE, E. R. (2010). Recognition and prevention of hospital-associated enteric infections in the intensive care unit. *Crit Care Med*, **38(8 0)**, S324.
- BOSWORTH, T.J., GLOVER, R.E. (1925). Contagious abortion in ewes. *Vet J*, **81**, 319–334.
- BRENNER, F. W., VILLAR, R. G., ANGULO, F. J., TAUXE, R., SWAMINATHAN, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol*, **38(7)**, 2465-2467.
- BRICHTA-HARHAY, D. M., ARTHUR, T. M., BOSILEVAC, J. M., GUERINI, M. N., KALCHAYANAND, N., KOOHMARAIE, M. (2007). Enumeration of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef, cattle carcass, hide and faecal samples using direct plating methods. *J. Appl. Microbiol.* **103(5)**:1657–1668.

- BRICHTA-HARHAY, D. M., GUERINI, M. N., ARTHUR, T. M., BOSILEVAC, J. M., KALCHAYANAND, N., SHACKELFORD, S. D., KOOHMARAIE, M. (2008). *Salmonella* and Escherichia coli O157:H7 contamination on hides and carcasses of cull cattle presented for slaughter in the United States: an evaluation of prevalence and bacterial loads by immunomagnetic separation and direct plating methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **74(20)**:6289–6297.
- BRYAN FL, DOYLE MP. (1995). Health risks and consequence of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. *J Food Prot*,**58(3)**:326–344
- BLAU, D. M., MCCLUSKEY, B. J., LADELY, S. R., DARGATZ, D. A., FEDORKA-CRAY, P. J., FERRIS, K. E., & HEADRICK, M. L. (2005). *Salmonella* in dairy operations in the United States: prevalence and antimicrobial drug susceptibility. *J Food Prot*, **68(4)**:696-702.
- BOLTON, D. J., IVORY, C., MCDOWELL, D. (2013). A study of *Salmonella* in pigs from birth to carcass: Serotypes, genotypes, antibiotic resistance and virulence profiles. *Int J Food Microbiol*, **160(3)**, 298-303.
- BUXTON, A., FRASER, G. (1977). Animal Microbiology. Vol.1. *Blackwell Scientific*, **85-86**.
- CALVERT, N. STEWART, W. C. REILLY, W. J. (1998). *Salmonella* Typhimurium DT104 infection in people and animals in Scotland: a collaborative epidemiological study **1993-96**.
- Carattoli, A., F. Tosini, and P. Visca.** (1998). Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infections. *N. Engl. J. Med.* **339**:921-922.
- 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. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **60**:749–755.
- CHIMALIZENI, Y., KAWAZA, K., MOLYNEUX, E. (2010). The epidemiology and management of non typhoidal *Salmonella* infections. In *Hot Topics in Infection and Immunity in Children VI* (pp. **33-46**). Springer New York.

- CLEGG, F.G., CHIEJINA, S.N., DUNCAN, A.L., KAY, R.N., WRAY, C. (1983).
Outbreaks of *Salmonella* Newport infection in dairy herds and their relationship to management and contamination of the environment. *Vet. Rec.* **112**, 580–584.
- COBBOLD, R. N., RICE, D. H., DAVIS, M. A., BESSER, T. E., & HANCOCK, D. D. (2006). Long-term persistence of multi-drug-resistant *Salmonella enterica* serovar Newport in two dairy herds. *J Am Vet Med Assoc*, **228(4)**:585-591.
- COBURN, B., GRASSL, G. A., FINLAY, B. B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol*, **85(2)**, 112-118.
- COOPER, B.S. (1967). Evaluation of vaccines against salmonellosis in sheep. *N Z Vet J*, **15**, 215–216.
- COTRUVO, J. A., DUFOUR, A., REES, G., BARTRAM, J., CARR, R., CLIVER, D. O., GANNON, V. P. J. (2004). Waterborne zoonoses. *Published on behalf of the World Health Organization by IWA Publishing*, **242-255**.
- CUMMINGS, K.J., WARNICK, L.D., ALEXANDER, K.A., CRIPPS, C.J., GRÖHN, Y.T., JAMES, K.L., MCDONOUGH, P.L., REED, K.E. (2009a). The duration of fecal *Salmonella* shedding following clinical disease among dairy cattle in the northeastern USA. *Prev. Vet. Med.* **92 (1)**, 134–139.
- CUMMINGS, K. J., WARNICK, L. D., ELTON, M., GRÖHN, Y. T., MCDONOUGH, P. L., SILER, J. D. (2010). The effect of clinical outbreaks of salmonellosis on the prevalence of fecal *Salmonella* shedding among dairy cattle in New York. *Foodborne Pathog Dis*, **7(7)**, 815-823.
- CUMMINGS, P. L., SORVILLO, F., KUO, T. (2011). The burden of salmonellosis in the United States. *SALMONELLA—A DANGEROUS FOODBORNE PATHOGEN*, **1**.
- CORTÉS C, DE LA FUENTE R, CONTRERAS A, SÁNCHEZ A, CORRALES JC, MARTÍNEZ S, JOSÉ A, ORDEN JA. (2006). A survey of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in dairy goat faeces and bulk tank milk in the Murcia region of Spain. *Irish Vet J*, **59(7)**:391-393.

- D' Aoust, J.Y. (2001b). *Salmonella*. In: Labbe, R.G. and Garcia, S. (ed.): *Guide to Foodborne Pathogens*. P.: **163-191**.
- DAVIES, P.R., FUNK, J.A. (1999). Epidemiology and control of *Salmonella* in Pork – some of the questions. In *Proceedings of the Third International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, p.: **1-11**.
- DAVISON, S. (2005). Salmonellosis. In: *Merck veterinary manual* 10th edition. Edited by Cynthia, M. Kahn, Merik and Co.J. p.: **20-123**
- DE JONG, H. K., PARRY, C. M., POLL, T., WIERSINGA, W. J. (2012). Host-pathogen interaction in invasive salmonellosis. *PLoS Pathog.* **8**:e1002933.
- DEFRA. (2005). Veterinary Laboratories Report: *Salmonella* in Livestock Production in GB. Erişim: [<http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-salm-rep04.htm>]. Erişim Tarihi: 2005
- DIVERS, T. J., PEEK, S. F. (2008). *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle* Saunders Elsevier, St. Louis, MO.
- DI CONZA, J., AYALA, J. A., POWER, P., MOLLERACH, M., GUTKIND, G. (2002). Novel class 1 integron (InS21) carrying blaCTX-M-2 in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *Antimicrob Agents Chemother.* **46(7)**, 2257-2261.
- DUFFY, E.A., BELK, K.E., SOFOS, J.N., VALLEY, S.B., KAIN, M.L., TATUM, J.D., SMITH, G.C., KIMBERLING, C.V. (2001). Microbial contamination occurring on lamb carcasses processed in the United States. *J Food Prot.* **64**, 503-508.
- DVORAK, G., ROVID-SPICKLER, A., ROTH, J. A. (2008). Handbook for zoonotic diseases of companion animals. 1st .Edn. *CFSPH Iowa State University*, p.: **215**.
- EDWARDS R. A.; OLSEN G. J. MALOY S. R. (2002). Comparative genomics of closely related *Salmonella*. *Trends Microbiol.* **10**:94-99.

EFSA&, E. C. D. C. (2012). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2010. *EFSA Journal*, **10**, 233.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) AND ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL). (2015). EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal*, **13(2)**:4036.

EKPERIGIN HE, NAGARAJA KV. (1998). *Salmonella*. Microbial food borne pathogens. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*; **14**:17–29.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). (2012). Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. Available: Accessed, 27.

Erişim:[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Manual_v_5.0_EUCAST_Disk_Test.pdf] Erişim Tarihi: 2015

EVANGELOPOULOU G, KRITAS S, GOVARIS A, BURRIEL AR. (2013). Animal salmonellosis: A brief review of “Host Adaptation and Host Specificity” of *Salmonella* spp., *Veterinary World* **6(10)**: 703-708.

FAO. (2010b). Report of the FAO expert workshop on the application of biosecurity measures to control *Salmonella* contamination in sustainable aquaculture. Mangalore, India, 19–21 January 2010, FAO Fisheries Circular, No. **937** (2010) Rome: FAO Publishing Management Service

FDA/CFSAN. (2008). Food Safety A to Z Reference Guide *Salmonella*.

FEDORKA- CRAY PJ, GRAY JT, WRAY C. (2000). *Salmonella* Infections in Pigs In: Wray C, Wray A, *Salmonella* in domestic animals. P.: **191-208**

FEGAN, N., VANDERLINDE, P., HIGGS, G., DESMARCHELIER, P. (2004). Quantification and prevalence of *Salmonella* in beef cattle presenting at slaughter. *J Appl Microbiol*. **97(10)**:892-8.

- FEY, P. D., SAFRANEK, T. J., RUPP, M. E., DUNNE, E. F., RIBOT, E., IWEN, P. C., HINRICHS, S. H. (2000). Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *N Engl J Med*, **342**(17), 1242-1249.
- FOLEY, S. L., LYNNE, A. M. (2008). Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J Anim Sci*, **86**(14 Suppl), E173-87.
- GIBSON, E.A. (1965). Reviews of the progress of dairy science. *J Dairy Res.* 32, 17–134.
- GRAGG, S. E., LONERAGAN, G. H., BRASHEARS, M. M., ARTHUR, T. M., BOSILEVAC, J. M., KALCHAYANAND, N., BRICHTA-HARHAY, D. M. (2013). Cross-sectional Study Examining *Salmonella enterica* Carriage in Subiliac Lymph Nodes of Cull and Feedlot Cattle at Harvest. *Foodborne Pathog Dis.***10**(25):368-74.
- GRAGG, S. E., LONERAGAN, G. H., NIGHTINGALE, K. K., BRICHTA-HARHAY, D. M., RUIZ, H., ELDER, J. R., GARCIA, L. G., MILLER, M. F., ECHEVERRY, A., RAMÍREZ PORRAS, R. G., BRASHEARS, M. M. (2013). Substantial Within-Animal Diversity of *Salmonella* Recovered from Lymph Nodes, Feces and Hides of Cattle at Slaughter. *Appl. Environ. Microbiol.***79** (11):4744-50.
- GRIMONT, P. A., GRIMONT, F., BOUVET, P. (2000). Taxonomy of the genus *Salmonella*. *Salmonella in domestic animals*, ‘p.: 1-17’
- GRIMONT, P. A., WEILL, F. X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*, 9.
- GUERRA, B., SOTO, S., CAL, S., MENDOZA, M. C. (2000). Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob agents chemother*, **44**(8), 2166-2169.
- GUERRA, B., JUNKER, E., MIKO, A., HELMUTH, R., MENDOZA, M.C. (2004). Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb Drug Resist*, **10** (2), 82–91.

- GUIBOURDENCHE, M., ROGGENTIN, P., MIKOLEIT, M., FIELDS, P. I., BOCKEMÜHL, J., GRIMONT, P. A., WEILL, F. X. (2010). Supplement 2003–2007 (No. 47) to the white-Kauffmann-Le minor scheme. *Res microbiol*, **161**(1), 26-29.
- HABRUN B, LISTES E, SPICIC S, CVETNIC Z, LUKACEVIC D, JEMERSIC L, LOJKIC M, KOMPES G. (2006). An outbreak of *Salmonella* Abortusovis abortions in sheep in south Croatia. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, **53**(6):286-290.
- HANEKLAUS AN, HARRIS KB, GRIFFIN DB, EDRINGTON TS, LUCIA LM, SAVELL JW. (2012). *Salmonella* prevalence in bovine lymph nodes differs among feedyards. *J. Food Prot.* **75**:1131–1133.
- HEALTH PROTECTION AGENCY (HPA). (2007). Detection of *Salmonella* species. *National Standard Method F. 13* Issue 3. Erişim: [http://www.hpastandardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.] Erişim Tarihi: 2007
- HENDRIKSEN R, S. (2002). Global Salm-Surv (A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization). *Laboratory Protocols*, Level 2 Training Course Susceptibility testing of *Salmonella* using disk diffusion 3rd Ed.
- HENDRIKSEN R, S. (2003). Global Salm-Surv (A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization). *Laboratory Protocols*, Level, **1**, 1-19.
- HENDRIKSEN RS, LARSEN JN. (2004). Global Salm-Surv: A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization. *Laboratory Protocols; Serotyping of Salmonella enterica O and H antigen*. 6th edition, Centers for Disease Control and Prevention (CDC).
- HJARTARDOTTIR S, GUNNARSSON E, SIGVALDADOTTIR J. (2002). *Salmonella* in sheep in Iceland. *Acta Vet Scand*, **43**(1):43-48.
- HOELZER, K., MORENO SWITT, A.I., WIEDMANN, M. (2011b). Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Vet. Res.* **42**, 34.

HOELZER, K., SWITT, A. M., WIEDMANN, M. (2011). Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Vet Res*, **42(1)**, 34.

HOLLEY, R.A., ARRUS, K.M., OMINSKI, K.H., TENUTA, M., BLANK, G. (2006.) *Salmonella* survival in manure-treated soils during simulated seasonal temperature exposure. *J. Environ. Qual.* **35**, 1170–1180.

HOLSINGER V.H., RAJKOWSKI, K.T., S T A B EL, J.R., (1997). Milk pasteurisation and safety: a brief history and update. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, **16 (2)**, 441-451

HUMPHREY, T. (2000). Public-health aspects of *Salmonella* infection. *Salmonella in domestic animals*, “p.: 245-263”

HUSTON, C. L., WITTUM, T. E., LOVE, B. C., KEEN, J. E. (2002). Prevalence of fecal shedding of *Salmonella* spp in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc*; 220:645–649.

IMEN, B. S., RIDHA, M., MAHJOUB, A. (2011). Laboratory Typing Methods for Diagnostic of *Salmonella* Strains, the “Old” Organism That Continued Challenges. *SALMONELLA—A DANGEROUS FOODBORNE PATHOGEN*, 349.

ISO-6579 : 2002 (E) 4th Ed. Microbiology- General Guidance on Methods for the detection of *Salmonella*, *International Organisation for Standardization*, Geneve, Switzerland.

IVANOV, I., HRISTOFOROU, L., SURTMADJIEU, K., STAMENOV, B. AND SALVKOV, I. (1966). Abortion in farm animals. *Academy of Agricultural Sciences, Bulgaria* 55–69.

İZGÜR M. (2006). Enterobakteri İnfeksiyonlar (Enterobacteriaceae). In: Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar), Ed: Aydın N, Paracıkoğlu J. Ankara: İlke Emek Yayınları, S.: **116-121**

JACOBSEN A, HENDRIKSEN RS, AARESTURP FM, USSERY DW, FRIIS C. (2011). The *Salmonella enterica* Pan-genome, a mini review. *Microb Ecol* **62**: 487–504.

JANTSCH, J.; CHIKKABALLI, D.; HENSEL, M. (2011). "Cellular aspects of immunity to intracellular *Salmonella enterica*". *Immunol Rev*, **240** (1): 185–195.

- JAY LS, DAVOS D, DUNDAS M, FRANKISH E, LIGHTFOOT D. (2003). *Salmonella*. Ch 8 In: Hocking AD (ed) Foodborne microorganisms of public health significance. 6th ed, Australian Institute of Food Science and Technology (NSW Branch), Sydney, “p.: **207–266**”
- JONES TF, INGRAM LA, CIESLAK PR. (2008). Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *J Infect Dis*, **198**:109–114.
- KARIM, M. R., KHAN, M. S. R., KAYESH, M. E. H., ISLAM, M. R., & GANI, M. O. (2008). Isolation and characterization of sheep salmonellae in and around Bangladesh Agricultural University campus. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, **6(1)**, 75-78.
- KAVANAGH, N. (2002). Milk borne zoonotic infections. *Cattle Practice*. **10**: 1, 15-18.
- KIDANEMARIAM, A., ENGELBRECHT, M., PICARD, J. (2010). Retrospective study on the incidence of *Salmonella* isolations in animals in South Africa, 1996 to 2006. *J S Afr Vet Assoc*, **81(1)**, 37-44.
- KIRAN, F., OSMANAGAOGLU, Ö. (2011). Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda/Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **27(1)**, 62-74.
- KOCAGOZ, S. (2000). Ribotyping, plasmid profile and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *MIKROBIYOLOJİ BULTENİ*, **34(1/2)**, 141-144.
- LE MINOR, L. (1994). The genus *Salmonella* In: Ballows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harber, W. and Scheiffer, K.-H. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, p.:**2760–2774**
- LEE, K., YONG, D., YUM, J. H., KIM, H. H., CHONG, Y. (2003). Diversity of TEM-52 extended-spectrum β -lactamase-producing non-typhoidal *Salmonella* isolates in Korea. *J Antimicrob Chemother*, **52(3)**, 493-496.

- MACNAB, R.M. (1987). Flagella. In: Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger, H.E. (eds.) *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, Vol. I. *Am Soc Microbiol*, p.: **70–83**.
- MAJOWICZ, S. E., MUSTO, J., SCALLAN, E., ANGULO, F. J., KIRK, M., O'BRIEN, S. J., HOEKSTRA, R. M. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis*, **50(6)**, 882-889.
- MCEVOY, J. M., DOHERTY, A. M., SHERIDAN, J. J., BLAIR, I. S., MCDOWELL, D. A. (2003). The prevalence of *Salmonella* spp. in bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. *J Appl Microbiol*.**94(25)**:693-700.
- MCGUIRK, S. M., & PEEK, S. (2003). Salmonellosis in cattle: A review. *In American Association of Bovine Practitioners 36th Annual Conference*.
Erişim: [<http://www.vetmed.wisc.edu/dms/fapm/fapmtools/7health/Salmorev.pdf>]
Erişim Tarihi: Eylül-2003.
- MCQUISTON, J. R., P. I. FIELDS, R. V. TAUXE, AND J. M. LOGSDON, JR. (2008). Do *Salmonella* carry spare tyres? *Trends Microbiol*. **16**:142–148.
- MICROGENTM GNA+B-ID SYSTEM. Erişim: [http://www.medica tec.com/arg/files/MICROGEN-GN-ID-MID65%20y%20MID641.pdf]. Erişim Tarihi: 07/2007. WF6649/2007/07
- MIKOLEIT, M. (2010). Biochemical Identification of *Salmonella* and Shigella Using an Abbreviated Panel of Tests. *WHO Global Foodborne Infections Network*.
- MONTVILLE, T. J., MATTHEWS, K. R. (2008). Food Microbiology: An Introduction. *ASM Press*, Washington, D.C.
- MURASE, T., YAMADA, M., MUTO, T., MATSUSHIMA, A., YAMAI, S. (2000). Fecal excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium following a food-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol*. **38**, 3495–3497.

- MURRAY CJ. (1991). Salmonellae in the environment. *Rev Sci Tech***10**: 765–785.
- NIELSEN LR, WARNICK LD, GREINER M. (2007). Risk factors for changing test classification in the Danish surveillance program for *Salmonella* in dairy herds. *J. Dairy Sci.* **90**:2815–2825
- NG, L.K., MULVEY, M.R., MARTIN, I., PETERS, G.A., JOHNSON, W. (1999). Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother*, **43** (12), 3018–3021.
- ODUMERU, J. A., LEÓN-VELARDE, C. G. (2012). *Salmonella* Detection Methods for Food and Food Ingredients. *Salmonella-A Dangerous Foodborne Pathogen: InTech*.
- OIE. TERRESTRIAL MANUAL. (2010): Salmonellosis, Chapter **2.9.9**, Hunt Publishing, Iowa, USA, 12671283.
- OLIVEIRA, S. D. D., BESSA, M. C., SANTOS, L. R. D., CARDOSO, M. R. D. I., BRANDELLI, A., CANAL, C. W. (2007). Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis isolates. *Braz. J. Microbiol.* **38**(4), 720-728.
- PARDON, P., SANCHIS, R. AND MARLY, J. (1980). Experimental *Salmonella* Abortusovis infection in ewes. *Vet Record*, **106**, 389–390.
- PERRON, G.G., QUESSY, S., BELL, G. (2008). A reservoir of drug-resistant pathogenic bacteria in asymptomatic hosts. *PLoS ONE*, **3**, e3749.
- PARRY, C. M. (2003). Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. *Curr Opin Infec Dis* **16**, 467-72.
- PIDDOCK LJ. (2002). Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 3-16
- PIRES AF, FUNK JA, HABING GG, BOLIN C. (2016). Phenotypic and Genotypic Diversity of *Salmonella* in Finishing Swine. *Foodborne Pathog Dis*.

- POPOFF M Y, LE MINOR L. (1997). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris, France: Pasteur Institute.
- POPOFF, M.Y., BOCKEMÜHL, J. AND BRENNER, F.W. (1998). Supplement 1997 (no. 41) to the Kauffmann–White scheme. *Res Microbiol*, **149**, 601–604.
- POPOFF, M. Y., BOCKEMÜHL, J., BRENNER, F. W. (2000). Supplement 1998 (no. 42) to the Kauffmann-White scheme. *Res microbiol*, **151(1)**, 63-65.
- POPOFF MY, BOCKEMÜHL J, BRENNER FW, GHEESLING LL. (2001). Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*, **152**: 907-909.
- POPOFF, M. Y., BOCKEMÜHL, J., GHEESLING, L. L. (2003). Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann–White scheme. *Res Microbiol*, **154(3)**, 173-174.
- POPOFF, M. Y., BOCKEMÜHL, J., GHEESLING, L. L. (2004). Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme. *Res Microbiol*, **155(7)**, 568-570.
- PORWOLLIK, S., BOYD, E. F., CHOY, C., CHENG, P., FLOREA, L., PROCTOR, E., MCCLELLAND, M. (2004). Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *J Bacteriol*. **186(11)**:5883-98.
- PUI, C. F., WONG, W. C., CHAI, L. C., TUNUNG, R., JEYALETCHUMI, P., HIDAYAH, N., SON, R. (2011). *Salmonella*: A foodborne pathogen. *Int Food Res J*, **18(7)**.
- PULLINGER, G. D., DZIVA, F., CHARLESTON, B., WALLIS, T. S., STEVENS, M. P. (2008). Identification of *Salmonella enterica* Serovar Dublin-Specific Sequences by Subtractive Hybridization and Analysis of Their Role in Intestinal Colonization and Systemic Translocation in Cattle. *Infect Immun*. **76(6)**:5310-21.
- RADOSTITIS OM, GAY CC, HINCHLIFF KW, CONSTABLE PD. (2007). Veterinary Medicine: A text book of the disease of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10th ed. Elsevier Ltd. P.:**325-326**

- RODRIGUEZ, A., P. PANGLOLI, H. A. RICHARDS, J. R. MOUNT, AND F. A. DRAUGHON. (2006). Prevalence of *Salmonella* in diverse environmental farm samples. *J. Food Prot.* **69**:2576-2580.
- RODRIGUEZ-RIVERA, L. D., WRIGHT, E. M., SILER, J. D., ELTON, M., CUMMINGS, K. J., WARNICK, L. D., WIEDMANN, M. (2014). Subtype analysis of *Salmonella* isolated from subclinically infected dairy cattle and dairy farm environments reveals the presence of both human-and bovine-associated subtypes. *Vet microbiol*, **170**(3), 307-316.
- ROSENBERG E. Y., D. MA, H. NIKAIDO. (2000). AcrD of Escherichia coli is an aminoglycoside efflux pump. *J. Bacteriol.* **6**, 1754-1756.
- RUSHTON, J. (2009). The economics of animal health and production. Cabi.
- SAMUEL, J. L., ECCLES, J. A., FRANCIS, J. (1981). *Salmonella* in the intestinal tract and associated lymph nodes of sheep and cattle. *J. Hyg. Camb.* **87**:225–232.
- SANCHEZ S, HOFACRE CL, LEE MD, MAURER JJ, DOYLE MP. (2002). Animal sources of salmonellosis in humans. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **221**:492–497.
- SANDVANG, D., AARESTRUP, F. M., JENSEN, L. B. (1998). Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett.* **160** (1), 37–41.
- SCHERER, C. A., MILLER, S. I. (2001). Molecular pathogenesis of Salmonellae. *Principles of bacterial pathogenesis*, **265-333**.
- SCHNAITMAN, C. A., J. D. KLENA. (1993). Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:655–682.
- SCHULTZ, M. (2008). Theobald Smith. *Emerg Infect Dis.*, **14**(12): 1940–1942.
- SHIPP, C.R., ROWE, B. (1980). A mechanised microtechnique for *Salmonella* serotyping. *J. Clin. Pathol.* **33**, 595–597.

- SINGH, V. (2013). *Salmonella* Serovars and Their Host Specificity. *Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, **1(3)**, 1.
- SIQUEIRA, R. S. D., DODD, C. E., REES, C. E. (2003). Phage amplification assay as rapid method for *Salmonella* detection. *Braz. J. Microbiol.* 34(suppl. 1), **118-120**.
- SMITH T. (1894). The hog-cholera group of bacteria. *US Bur Anim Ind Bull* . **6**:6-40.
- SNOEYENBOS G.H. (1994). Avian salmonellosis. *In: Handbook of Zoonoses, Second Edition*, Beran G.W., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- STATENS SERUM INSTITUT. (SSI). (2013). 2nd Ed. *Salmonella* antisera. 85711. Denmark
Erişim:[<http://www.ssi.dk/~media/Admin/Diagnostica%20Downloads/Downloads%20UK/Brochures/BrochureSalmonella%20antisera%20ver%202%20high14112011145552.ashx>]. Erişim Tarihi: 05/2013
- SU, L., CHEN, H., CHIA, J., LIU, S., CHU, C., WU, T. AND CHIU, C. (2006). Distribution of a transposon-like element carrying bla_{CMY-2} among *Salmonella* and other Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, **57(3)**, 424- 429.
- TEMMERMAN, R., HUYS, G., SWINGS, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends Food Sci Technol*, **15(7)**, 348-359.
- TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V. (1997). How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections a review for healthcare epidemiologists. *Infection Control*, **18(06)**, 426-439.
- THORNS, C. J. (2000). Bacterial food-borne zoonoses. *Rev Sci Tech*.**19(6)**:226-39.
- TINDALL BJ, GRIMONT PA, GARRITY GM, EUZÉBY JP. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol***55**: 521-524.

- TOTH, D. J., W ACETO, H., C RANKIN, S., DEBROY, C., DOU, Z. (2012). Accelerating the Deactivation of *Salmonella enterica* Serovar Newport and Escherichia coli O157:H7 in Dairy Manure by Modifying pH or Temperature. *The Open Waste Management Journal*, **5(1)**.
- USDA-NAHMS. (2011). Dairy 2007. *Salmonella*, Listeria and Campylobacter on U.S. Dairy Operations, 1996-2007, *Fort Collins, CO*.
- UZZAU, S., BROWN, D. J., WALLIS, T., RUBINO, S., LEORI, G., BERNARD, S., OLSEN, J. E. (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect.* **125(2)**:229–255.
- VAN, T. T. H., MOUTAFIS, G., ISTIVAN, T., TRAN, L. T., COLOE, P. J. (2007). Detection of *Salmonella* spp. in retail raw food samples from Vietnam and characterization of their antibiotic resistance. *Appl Environ Microbiol.* **73(2)**: 6885–6890.
- WALES, A. D., CARRIQUE-MAS, J. J., RANKIN, M., BELL, B., THIND, B. B., DAVIES, R. H. (2010). Review of the carriage of zoonotic bacteria by arthropods, with special reference to *Salmonella* in mites, flies and litter beetles. *Zoonoses Public Health*, **57**, 299–314.
- WALLIS, T. S., MASTROENI, P., MASKELL, D. (2006). Host-specificity of *Salmonella* infections in animal species. *Salmonella infections: clinical, immunological and molecular aspects*, **57**-88.
- WATTIAU, P., BOLAND, C., BERTRAND, S. (2011). Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and environmental microbiology*, **77(22)**, 7877-7885.
- WHITE D. G. (2000). Antibacterial Resistance and Antibiotic use in animals. *Pork Safety Fact Sheet*. **2**, 1-2.

WHO GLOBAL FOODBORNE INFECTIONS NETWORK. (2010). Laboratory Protocol “Isolation of *Salmonella* spp. From Food and Animal Faeces”**5th Ed.** Available at: Erişim:[http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/protocols/isolation_of_salm_220610.pdf] Erişim Tarihi: 2010

WARNICK, L. D., CROFTON, L. M., PELZER, K. D., & HAWKINS, M. J. (2001). Risk factors for clinical salmonellosis in Virginia, USA cattle herds. *Prev Vet Med*, **49(3)**, 259-275.

WOLDEMARIAM E, MOLLA B, ALEMAYEHU D, MUCKLE A. (2005). Prevalence and distribution of *Salmonella* in apparently healthy slaughtered sheep and goats in Debre Zeit, Ethiopia. *Small Rumin Res*, **58(1)**:19-24.

WRAY, C., DAVIES, R. H. (2000). *Salmonella* infections in cattle. *Salmonella in domestic animals*, p.: **169-190**.

WRAY, C., LINKLATER, K. A. (2000). *Salmonella* infections in sheep. *Salmonella in Domestic Animals*, p.: **209-218**.

WRAY, C., WRAY, A. (2000). *Salmonella* in Domestic Animals: *CAB International*. ISBN 0, 85199(261), **7**.

YUE, M., SCHIFFERLI, D. M. (2013). Allelic variation in *Salmonella*: an underappreciated driver of adaptation and virulence. *Front microbiol*, **4**.

ZADERNOWSKA, A., CHAJĘCKA, W. (2012). Detection of *Salmonella* spp. Presence in Food. InTech, Rijeka, Croatia, **393-412**.

ZHANG, Q., SAHIN, O., MCDERMOTT, P. F., PAYOT, S. (2006). Fitness of antimicrobial-resistant *Campylobacter* and *Salmonella*. *Microbes Infect*, **8(7)**, 1972-1978.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler:

Adı	Mohamed Mukhtar Ali
Soyadı	ADEN
Doğum yeri ve tarihi	Mogadishu, 10.02.1987
Uyuğu	Somali
Medeni durumu	Evli ve iki çocuklu
Askerlik durumu	---
İletişim adresi ve telefonu	hanad_82@yahoo.com 05532098887

II-Eğitimi

1998-2001	Mogadishu / Al Hikmah Lisesi
2003-2008	Thamar Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Yemen
2008	Sana'a / Yemen American Centre for English Language / İngilizce Dili için Amerikan Merkez
2010	Ankara Üniversitesi, Türkçe ve Yabancı Dil Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÖMER) / Türk Dili Diploması

Yabancı dili: İngilizce, Arabca, Somalice

III- Ünvanları

Veteriner Hekim/Uzman Veteriner ve Cerrah

IV- Mesleki Deneyimi

2015- Horseed International University - HIU Uluslararası ilişkiler ve Türkiye sorumlusu

V- Bilimsel İlgi Alanları

Posterleri

ŞAHAN Ö, YILMAZ Ö, ADEN M.M.A, ASHOUR A, ARAL EM, JAHED R, AKAN M. (2012). Tavuk orijinli *Salmonella* izolatlarının serotip dağılımı, 9 uncu Ulusal Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası/ AYDIN.

ŞAHAN Ö, ARAL EM, ADEN M.M.A, AKSOY A, AKAN M. (2014).Tavuklardan izole edilen *Salmonella* serovarlarının dağılımı ve antibiyotik direnci. XI. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, ANTALYA

Yayınlar

ŞAHAN, Ö., ELIF MACIDE ARAL, MUHAMMET MUHKAR ALI ADEN, ADIL AKSOY, ÖZGE YILMAZ, RAMIN JAHED, MEHMET AKAN. (2016). Türkiye'deki broyler tavuk işletmelerinden izole edilen *Salmonella* serovarlarının antimikrobiyel direnç durumu. *Ank Üniv Vet Fak Derg*, **63**, 1-6, 2016

Seminerleri

Mastitis Aşılıarı

Moleküler Tanıda Ön İşlemler

VI- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar

Cumhurbaşkanlığı ve Dışişleri Bakanlığı ile koordineli biçimde yürütülen eğitim projesi

TÜBİTAK “2235-En Az Gelişmiş Ülkeler Lisansüstü Burs Programı”

Projeler

Tavuklarda *Salmonella* kontrol projesi BESD-BİR 2011-2013 Araştırmacı

VII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve Katıldığı eğitim seminerleri

2006: İslam Kalkınma Bankası (IDB) tarafından finanse edilen Bilim ve Teknoloji Üniversitesi tarafından düzenlenen Eğitim Geliştirme Sistemi Semineri

2008: İslam Kalkınma Bankası (IDB) tarafından finanse edilen Bilim ve Teknoloji Üniversitesi tarafından düzenlenen Eğitim Geliştirme Sistemi Semineri

2009: İngiliz Akademik merkezine (British Academic center) ilkyardım konusunda kurs sertifikası

2009: İslam Kalkınma Bankası (IDB) tarafından finanse edilen Bilim ve Teknoloji Üniversitesi tarafından düzenlenen Eğitim Geliştirme Sistemi Semineri

2011-2015 Harqan Eğitim ve gelişme Derneği Uluslararası İlişkiler Koordinatörü