

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ HAYVAN DIŞKILARINDA *SALMONELLA*
ETKENLERİNİN KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE SAPTANMASI**

Seyit CANPOLAT

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet AKAN

2007- ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	v
Resimler	vii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1.GEREÇ	28
2.1.1. Kloakal Swap ve Dışkı Örnekleri	28
2.1.2. Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler	33
2.1.3. Kullanılan Cihaz ve Gereç Listesi	34
2.1.4. Antiserumlar	34
2.1.5. Standart Suş	35
2.2. YÖNTEM	35
2.2.1. Örnek Hazırlanması	35
2.2.1.1. Kloakal Swapların Hazırlanması	35
2.2.1.2. Dışkıların Hazırlanması	35
2.2.1.3. PCR İçin Örnekler	35
2.2.1.4. Besiyerlerin Hazırlanması	36
2.2.2. İzolasyon	37
2.2.3. İdentifikasyon	37
2.2.3.1. Biyokimyasal Testler	37
2.2.3.2. Serolojik Testler	38
2.2.4. Polimerase Chain Reaction (PCR)	38
2.2.4.1. DNA Ekstraksiyonu	38
2.2.4.2. PCR Karışımının Hazırlanması	39

2.2.4.3. DNA Amplifikasyonu	40
2.2.4.4. Agaroz Jel Elektroforez	41
2.2.4.5. Görüntüleme İşlemi	41
3. BULGULAR	42
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	42
3.2. PCR Bulguları	45
4. TARTIŞMA	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
ÖZET	54
SUMMARY	55
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	66

ÖNSÖZ

Ülkemizde hayvan yetiştiriciliğinin en önemli sorunlardan birisi enfeksiyöz hastalıklardır. Enfeksiyöz hastalıklar, yetiştiricilerin ekonomik kayıba uğramasının yanısıra ilave olarak kontrol programlarının geliştirilmesine ve uygulanmasına neden olmaktadır. Yetiştiricilerin ve özellikle bir endüstri kolu haline gelen kanatlı sektörünün karşılaştığı enfeksiyöz hastalıklar arasında *Salmonellosis* önemli bir yer tutmaktadır. Çeşitli hayvansal kaynaklı gıdalarda *Salmonella* görülme sıklığının fazla olması nedeniyle insan sağlığı olumsuz etkilenmektedir. Hayvanlarda *Salmonella* varlığının araştırılması ve erken dönemlerde özellikle enterik türlerin hayvanların sindirim sistemlerine kolonize olmasının engellenmesi için kontrol programlarının uygulanması bir zorunluluk haline gelmiştir. Bu problem özellikle kanatlı sürüleri için daha öncelikli bir konudur. Bağırsaklara kolonize olan *Salmonella* etkenlerinin kesimhanelerde çapraz kontaminasyonla karkaslara bulaşma düzeyinin artmasını ve market zincirinden sonra insanlara ulaşmasını engellemenin en önemli yolu, kümeslerde bu etkenlerin kontrolünden geçmektedir.

Salmonella serovarlarının konvansiyonel metotlarla izolasyonu ve identifikasyonu hem güç olmakta, hem de uzun süre almaktadır. Son yıllarda, bir çok insan ve hayvan hastalığının tanısında oldukça hızlı, duyarlı ve spesifik bir yöntem olduğu kanıtlanan Polymerase chain reaction (PCR) tekniği, *Salmonella* tanısında kullanılmaktadır. Ülkemizde hayvan dışkılarında, özellikle de tavuk dışkılarında, *Salmonella* sıklığının belirlenmesine yönelik çalışmalar bulunmasına karşın, farklı hayvan türlerine ait dışkı örneklerinde yapılan detaylı çalışmalar sınırlı düzeydedir.

Bu çalışmada, çeşitli hayvan dışkılarında *Salmonella* etkenlerinin varlığının belirlenmesi için konvansiyonel teknik olan kültür yöntemin kullanılması ve *Salmonella* pozitif saptanan örneklerde zenginleştirme basamağında PCR tekniğinin uygulanarak elde edilen sonuçların karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmalar sonrasında, altyapısı uygun laboratuvarlarda PCR tekniğinin rutin kullanımlar için standardize edilmesi de hedeflenmiştir.

Tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bana yol gösteren, yardım ve ilgilerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Mehmet AKAN, başta olmak üzere Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nejat AYDIN ve öğretim üyeleri; Prof. Dr. Müjgan İZGÜR, Prof. Dr. K. Serdar DİKER, Prof. Dr. Hakan YARDIMCI ve Prof. Dr. Ömer M. ESENDAL'a, Tez İzleme Komitesi üyesi Prof. Dr. Haluk ÇELİK'e ayrıca Araş. Gör. Dr. Barış SAREYYUPOĞLU, Araş. Gör. Zafer CANTEKİN, laboratuvar çalışmalarım süresince deneyim ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Gülay ALTAY ve teknisyen Hülya MERT'e teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC	Alfa-Beta Kromojenik
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
bp	base pair
CAS	CHROMagar Salmonella
DIASALM	Diagnostic Semi-Solid Salmonella Medium
DNA	Deoksiribonükleik asit
EIA	Enzyme Immunoassay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Sequence
g	Gram
HE	Hektoen Enteric Agar
H ₂ S	Hidrojen Sülfür
IL	Interleukin
IFN _γ	İnterferon-gama
LB	Laktoz Broth
MgCl ₂	Magnezyum klorür
μl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MR	Metil Red
MSRV	Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis Medium
NB	Nutrient Broth
<i>NRAMP1</i>	Natural Resistance Associated Macrophage Protein1
PCR	Polimerase Chain Reaction
Pm	Pikomolar
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RV	Rappaport-Vassiliadis Broth
<i>SALI</i>	Leads to Increased Macrophage Activity Against Salmonella

SC	Selenite-Cysteine Broth
SM-ID	<i>Salmonella</i> Detection and Identification Medium
SPI	<i>Salmonella</i> Patojenite Adası
SS	Salmonella-Shigella Agar
TBE	Tris Borat Edta
TTB	Tetrathionat Broth
TPS	Tamponlanmış Peptonlu Su
XLD	Xylose-Lysine-Desoxycholate
XLT4	Xylose-Lysine- Tergitol-4

RESİMLER

Resim 3-1: XLT4 agarda <i>Salmonella</i> şüpheli kolonilerinin görünümü	42
Resim 3.2. Tavuk dışkılarından yapılan PCR bulguları	46
Resim 3.3. Sığır dışkılarından yapılan PCR bulguları	46

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. <i>Salmonella</i> 'ların tür ve alttürlerine ait serotip ve sayıları	3
Çizelge 2.1. Materyal alınan tavuk sürülerine ait bazı özellikler ve örnek sayıları	28
Çizelge 2.2. Sığır dışkı örneklerinin alındığı bölge ve örnek sayıları	32
Çizelge 2.3. Koyun dışkı örneklerinin alındığı bölge ve örnek sayıları	32
Çizelge 3.1. Broyler sürülerine ait <i>Salmonella</i> izolatlarının biyokimyasal test sonuçları.	43
Çizelge 3.2. Broyler sürülerine ait <i>Salmonella</i> izolatlarının serogrupları ve bölgeleri	44
Çizelge 3.3. Sığır <i>Salmonella</i> izolatının biyokimyasal test sonuçları	45

1. GİRİŞ

Doğada yaygın olarak bulunan *Salmonella* etkenleri, insan ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olabildikleri gibi gıda zehirlenmelerinin ve özel bazı lokal enfeksiyonların sorumlusu olarak da bilinmektedir. *Salmonella* etkenleri tarafından meydana getirilen enterik enfeksiyonların, hayvanlar arasında bulaşma eğiliminin hızlı olması nedeniyle ekonomik önemleri fazladır. Ayrıca, bazı *Salmonella* türleri insanlara bulaşması nedeniyle zoonotik bir önem taşımaktadır. *Salmonella* enfeksiyonlarının insanlara bulaşmasında, kontamine yumurta, süt, et gibi hayvansal kaynaklı gıdalar önemli rol oynamaktadırlar (Koneman ve ark., 1992; Quinn ve ark., 1994; Anon., 2005). Her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 76 milyon gıda kaynaklı hastalık, 325.000 hastanede yatan vaka ve 5000 ölüm olayı görülürken, bunlardan 1,4 milyon insan Salmonellozis vakası ve yaklaşık olarak 500-600 adet *Salmonella*'ya bağlı ölüm olayı görülmektedir (Mead ve ark., 1999; Anon., 2005).

Salmonella'lar, adlarını Amerikalı bakteriyolog Salmon'dan almaktadır (İzgür, 2006). *Salmonella* genusunun ilk sınıflandırması bir serotip-bir tür kavramından köken almış ve her bir serotipin ayrı bir tür olduğu düşünülmüştür. Örneğin; *S. paratyphi A*, *S. newport*, *S. enteritidis*. Eğer bu kavram günümüzde geçerli olsaydı şu anda 2541 *Salmonella* türü mevcut olurdu (Brenner ve ark., 2000). "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'nin 1. baskısında (1923) *Salmonella* genusu biyokimyasal özelliklerine göre 17 tür, 1948'de aynı kitabın 6. baskısında ise 150 *Salmonella* serotipi tanımlanmıştır. "Approval Lists of Bacterial Names" 1980 yılında, *Salmonella* genusunun 5 tür ve 2000'den fazla serovardan oluştuğu belirtilmiştir (Ezaki ve ark., 2000). Le Minor ve ark. (1985), I, II, III ve IV *Salmonella* subsp. ait suşların *S. choleraesuis* olmak üzere tek tür altında *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, *S. choleraesuis* subsp. *salamae*, *S. choleraesuis* subsp. *arizonae*, *S. choleraesuis* subsp. *diarizonae*, *S. choleraesuis* subsp. *houtenae* ve *S. choleraesuis* subsp. *bongori* şeklinde sınıflandırmayı önermişler, fakat 1987 yılında Le Minor ve Popoff (1987), tek tür adının *S. enterica* olması gerektiğini savunmuşlardır. Quinn ve ark. (1994), *Salmonella*'ları 7 alt grup olarak gruplandırmışlardır. Günümüzde, *Salmonella* genusu, *S. enterica* ve *S. bongori*

olmak üzere iki türe ayrılmaktadır. *S. enterica* biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak *S. enterica* subsp. *enterica* (subsp. I), *S. enterica* subsp. *salamae* (subsp. II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (subsp. IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (subsp. IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (subsp. IV), *S. enterica* subsp. *indica* (subsp. VI) olmak üzere 6 altgrupa ayrılmaktadır (Le Minor ve Popoff, 1987; Holt ve ark., 1994; Brenner ve ark., 2000). *S. bongori*'nin ise alt türü bulunmamaktadır (Reeves ve ark., 1989; Popoff ve ark., 2001). Bu çalışmaların sonucunda uzun süredir adlandırılan *Salmonella* serovarlarını tür olarak kullanma sistemi artık geçerliliğini yitirmiştir. Daha önce *Salmonella typhimurium* olarak adlandırılan bir bakteri artık *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium (kısaltılmış olarak da *Salmonella* ser. Typhimurium veya *Salmonella* Typhimurium) olarak adlandırılmaktadır (Brenner ve ark., 2000; Anon., 2004).

Antijenik yönden klasifikasyonu yapılan *Salmonella*'lar Kauffmann-White şemasında sıralanmıştır. İdentifiye edilen yeni *Salmonella* serovarları "World Health Organisation (WHO) Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*" tarafından bu şemaya eklenip güncelleştirilmektedir. Bu yeni serovarlar Pasteur Enstitüsü yayını olan "Research in Microbiology" dergisinde hemen hemen her yıl yayınlanmaktadır (Popoff ve ark., 2000). 2000, 2001, 2003 ve 2004 yıllarında yayınlanan makalelerde sırasıyla 14, 12, 22 ve 18 yeni *Salmonella* serotipi tanımlanmış ve böylece toplam *Salmonella* serovar sayısı 2541'e ulaşmıştır (Popoff ve ark., 2000; Popoff ve ark., 2001; Popoff ve ark., 2003; Popoff ve ark., 2004). Tür ve alt türlere ait serovar sayısı Çizelge 1.1 de gösterilmiştir (Popoff ve ark., 2004).

S. enterica subsp. *enterica*'ya ait serovarların genellikle ilk izole edildiği coğrafi bölgeye göre isimlendirilmeleri en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu isim latin harfleriyle yazılır ve ilk harf büyük harf ile başlar (Popoff ve ark., 2000; Popoff ve ark., 2001). Örneğin, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin (*S.* serovar Dublin) gibi. Fakat *Salmonella*'lar farklı şekillerde de isimlendirilmektedir. Örneğin; *Salmonella* Typhimurium ismi bu serovarin farelerde tifoya neden olmasından esinlenerek konulmuştur (Anon., 2004).

Çizelge 1.1. *Salmonella*'ların tür ve alt türlerine ait serotip ve sayıları (Popoff ve ark., 2004).

<i>S. enterica</i>	
subsp. <i>enterica</i>	1504
subsp. <i>salamae</i>	502
subsp. <i>arizonae</i>	95
subsp. <i>diarizonae</i>	333
subsp. <i>houtenae</i>	72
subsp. <i>indica</i>	13
<i>S. bongori</i>	22
TOPLAM	2541

Salmonella'lar 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm boyutlarında, kapsülsüz, sporsuz, çomak şeklinde bakterilerdir. Metilen mavisi, karbol fuksin gibi boyalarla kolaylıkla boyanabilme özelliğine sahip olan bu bakteriler Gram negatiftirler (Holt ve ark., 1994). *Enterobacteriaceae* familyasının genel özelliklerini taşıyan *Salmonella*'lar, peritrik flagellaları sayesinde hareketli, normal şartlarda *Salmonella Gallinarum* ve *S. Salmonella Pullorum* hareketsizdir (Bisping ve Amtsberg, 1988). Daha önceden hareketsiz ve flagellasız olarak bilinen *Salmonella Pullorum*'un özel besiyeri koşullarında hareketli olduğu, hareketli *Salmonella Pullorum* kültürlerinin elektron mikrografisinde hücreden çıkan flagellayı andıran uzun fibröz çıkıntıların görüldüğü ve bu çıkıntıların *Salmonella Enteritidis* flagellasından daha az sayıda ve daha ince olduğu (Holt ve Chaubal, 1997), *Salmonella Pullorum* ve *Salmonella Gallinarum*'un faz 1 antijenini kodlayan *fliC* genine sahip olduğu tespit edilmiştir (Kilger ve Grimont, 1993). *Salmonella*'lar, genel olarak katı besiyerinde 1-2 mm çapında, düzgün kenarlı, yuvarlak, hafif kubbeli ve parlak koloniler oluştururlar. Smooth kolonilerin sıvı kültürleri buyyonda homojen bir şekilde hafif bulanıklık meydana getirerek ürerler. Rough kolonilerin sıvı kültürlerinde yoğun granüler sediment ve üst kısımda berrak süpernatant sıvı meydana gelir. *Salmonella*'ların optimal üreme dereceleri 37 °C olmasına rağmen, üreme ısı sınırları oldukça geniştir. En uygun pH 7,4 tür. Hidrojen Sülfür (H₂S) pozitif, laktoz negatiftirler. Vogues Proskauer (VP), indol, oksidaz testleri negatif olup, metil red (MR) ve katalaz pozitifler. Jelatin eritirler, nitratları nitrite indirgerler ve fakültatif anaerobiktirler. Sitrat, lizin ve ornitin dekarboksilaz (LDC ve ODC) genellikle pozitifdir. *Salmonella* etkenlerinin

tümü üreaz enzimine sahip olmadıkları için üreyi ayrıştırmazlar (Holt ve ark., 1994; Bekar, 1997; İzgür, 2006). Dulsitol, mukat, sorbitol, ksiloz, arabinaz, ramnoz, mannoz, mannitol, maltoz, trehaloz, inositol ve melibiozu asit oluşturarak fermente ederler. Adonitol, laktoz, salisin, sukroz, rafinoz, sellobioz, galakturonatı fermente etmezler (Le Minor ve Popoff, 1987).

Salmonella'lar genellikle laktozu kullanmazlar, fakat Arizona gurubunun çoğu suşu laktozu yavaş ya da hızlı olarak fermente eder. *Salmonella*'ların büyük çoğunluğu gaz oluştururlar yani aerojeniktirler. Ancak *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Gallinarum gaz oluşturmazlar sadece asit oluştururlar. *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Paratyphi A'nın dışındaki *Salmonella* serovarları sitrat pozitifler. *Sallmonella* Paratyphi A ve *Salmonella* Choleraesuis'in bazı suşları hariç *Salmonella*'lar H₂S üretmektedirler. *Salmonella* Paratyphi A dışındaki *Salmonella*'ların çoğu için LDC reaksiyonu pozitifdir. *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Gallinarum'un ODC reaksiyonu negatif olmasına karşın diğer *Salmonella*'lar genellikle ODC pozitifdir (Bisping ve Amtsberg, 1988; Holt ve ark., 1994).

Salmonella serovarlarının antijenik klasifikasyonu mevcut spesifik antijenik komponentlerinin belirlenmesi ile yapılmaktadır. İlk önce ısıya dayanıklı ve polisakkarit yapıda olan somatik "O" antijenleri belirlenir. Somatik "O" antijenleri 1, 2, 3, 4, gibi sayılarla ifade edilir. *Salmonella* serogrupları *Salmonella*'lara özel olan grup somatik antijenlerle belirlenir. Özel "O" somatik antijenine sahip olan bu serovarlar belli bir serogrubun içinde yer alırlar (Holt ve ark.,1994) ve grup adları alfabetik harflerle (A, B,Z) isimlendirilmektedir. Örneğin; "1, 2, 12" somatik antijenleri A serogrubunu belirlerken, "1, 4, (5), 12" B serogrubunu belirlemektedir. Şimdiye kadar 67 grup ortaya konmuş olup, harfler yeterli gelmediğinden harf+rakam ile belirtilmiştir (Holt ve ark., 1994; İzgür, 2006).

Flagellar "H" antijenleri protein yapısında, ısıya duyarlı, formole dirençli antijenik yapılardır (İzgür, 2006). "H" antijeninin yapısında bulunan faktörler, faz-1

ve faz-2 olmak üzere 2 grupta incelenir. Faz-1 antijenleri a, b, c,z'ye kadar küçük harflerle adlandırılmaktadırlar. Faz-2 antijenleri ise 1, 2, 3,...olarak ifade edilirler. Faz-1 antijenleri, *Salmonella*'larda çok az serovar arasında ortakken, faz-2 antijenleri nonspesifik özellikte olup farklı *Salmonella* serovarlarında bulunmaktadırlar. Örneğin; *Salmonella* Enteritidis "1, 9, 12 : g, m : -, -" antijenik kompozisyonuna sahipken, *Salmonella* Montevideo'nun antijenik kompozisyonu "6, 7 : g, m, s, (p) : (1, 2, 7)"dir (Holt ve ark., 1994; Anon., 2004). *Salmonella*'ların "H" antijen grubundan sadece bir çeşit Faz antijen faktörlerini içerenler monofazik, hem Faz-1 ve hem de Faz-2 antijenlerini birlikte taşıyanlar ise difazik bakteriler olarak adlandırılmaktadır (İzgür, 2006).

Yüzeysel antijenler, bakteri hücre duvarının dışında bulunan antijenik yapılardır. Bunlar *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A ve *Salmonella* Paratyphi C' nin bazı suşlarında ve istisna olarak bazı *Salmonella* Dublin suşlarında bulunan virulens ile ilgili olduğu düşünülen "Vi", *Salmonella* Paratyphi B'nin mukoid koloni oluşturan suşlarında "M" ve yine bazı *Salmonella* türlerinde bulunan Pilus antijenleridir. Vi antijeni bazı *E. coli* ve *Citrobacter* suşlarında da tespit edilmiştir (Bekar, 1997; İzgür, 2006).

Salmonella'lar endotoksin, enterotoksin ve sitotoksin sentezlemektedirler. Sentezledikleri endotoksinler, özellikle, bağırsak mukozasında harabiyete neden olmakta ve bu tür toksinleri sentezleyen *Salmonella*'larla infekte olan bireylerde şiddetli akut toksemi tablosu şekillenmektedir. *Salmonella*'ların enterotoksinleri mukozal cAMP miktarını artırarak adenilat siklazı aktive etmekte ve böylece bağırsak epitellerinden aşırı sıvı salgılamasına neden olmaktadır. *Salmonella*'ların sitotoksinleri, bağırsak mukozasındaki epitellerde protein sentezini engelleyerek etkili olurlar (İzgür, 2006).

Salmonella'lar, genellikle, dışkı-ağız yoluyla alınmaktadır. Ancak, konjunktiva ve üst solunum yolunun mukoz membranları aracılığıyla bulaşma da şüphelidir. *Salmonella*'nın enterik enfeksiyonu başlatması için kolon veya alt ince bağırsağa

kolonize olması gerekmektedir. Bağırsaktaki normal anaerobik floranın ürettiği uçucu organik asitler *Salmonella*'nın üremesini engeller ve normal flora *Salmonella* türlerinin yapışacağı bölgelere (reseptörlere) yapışarak *Salmonella*'nın yapışmasını bloke etmektedir. Antibiyotik tedavisi, besin ve su kısıtlaması gibi faktörlerle normal floranın yıkımlanması konakçının enfeksiyona duyarlılığını artırmaktadır. Aşırı kalabalık ve nakile bağlı peristaltik azalması *Salmonella*'nın bağırsağa kolonizasyonuna predispozisyon oluşturmaktadır. *Salmonella*'nın bağlanması genellikle fimbria aracılığıyla olmaktadır (Quinn ve ark., 1994).

Bağırsak epitel hücrelerine *Salmonella*'ların invazyonunun, *Salmonella* enfeksiyonun patogeneğinde zorunlu olduğu bilinmektedir. İnvazyon, *Salmonella* Patojenite Ada 1 (SPI-1) üzerinde bulunan genler tarafından sağlanmaktadır. *Salmonella* Patojenite Ada 1'in ana düzenleyicisi *HilA* genidir (Bajaj ve ark., 1996; Bohez ve ark., 2006). Kanatlılarda iç organlar ve bağırsağa *Salmonella* kolonizasyonunda *HilA* geninin rolünü değerlendirmek için yapılan bir çalışmada, *HilA* geninin tavuk bağırsağında kolonizasyon ve uzun dönem saçılmayla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Bohez ve ark., 2006).

Tavuklarda sistemik Salmonellozis'e direnç, *Salmonella*'ya karşı makrofaj aktivitesinde artmaya yol açan gen (leads to increased macrophage activity against *Salmonella*-*SAL1*) ve doğal direnç ile ilişkili makrofaj proteini 1 (natural resistance associated macrophage protein1-*NRAMP1*) genlerini de içeren birçok gen tarafından kodlanmaktadır (Wigley, 2004; Cheeseman ve ark., 2007).

Sitokinler memelilerde *Salmonella*'ya karşı immün yanıtın parçasıdır. Özellikle artan mRNA salınımı, kemokinlerin protein sentezi, Th1 sitokinler (IFN_{γ} , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) ve MIP-1 β 'nın çeşitli *Salmonella* türleri ile enfeksiyonu takiben arttığı gözlenmiştir. Interleukin (IL)-12 ve interferon-gama (IFN_{γ}) üretimi *Salmonella* gibi intrasölüler patojenlere karşı konakçı savunmasında kritiktir. IFN_{γ} üretiminin artmasıyla IL-18, bakteriyel eliminasyonu ve konakçı direncini desteklemektedir. Cheeseman ve ark. (2007), *Salmonella* Enteritidis sekal taşıyıcılığına duyarlı genç

civcivlerde, dirençli ve sağlıklı kontrolleri kıyasladıklarında, IFN γ 'nın salınımının düşük olduğunu gözlemişlerdir. Sadeyen ve ark. (2004), IFN γ salınım düzeyinin, tavuklarda sindirim sisteminde *Salmonella*'nın varlığıyla ilişkili immun yetmezliğin kıymetli bir göstergesi olduğunu ve IFN γ 'nın *Salmonella* taşıyıcılığının azaltılmasında uygulanacak profilaktik önlemlerin geliştirilmesinde düşünülebilecek bir faktör olabileceğini bildirmişlerdir.

IL-12 ve IL-18, IFN γ 'nın sentezini indükler. IFN γ *Salmonella* üzerinde makrofaj bakterisidal aktivitesini artırır (Dybing ve ark., 1999). Ayrıca, defensin, nitrik oksit ve *NRAMP1*'in bakterilerin konak hücresi içerisine girişinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. *NRAMP1* proteini kodlayan *SLC11A1* geninin sistemik *Salmonella* enfeksiyonuna ve *Salmonella* taşıyıcılık durumuna karşı hayvanların direnç düzeyi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hu ve ark., 1997; Sadeyen ve ark., 2004).

Tavuk ırkları arasında enfeksiyona duyarlılık dereceleri değişmektedir (İzgür, 2002). Beyaz Leghorn tavuklarda yapılan çalışmalarda, *Salmonella* Gallinarum veya *Salmonella* Typhimurium ile ağız ve intravenöz yolla enfeksiyon sonrası LD₅₀, patogenezis ve organlardaki *Salmonella* sayılarında büyük farklılıklar ortaya konulmuştur (Bumstead ve Barrow, 1988; Bumstead ve Barrow, 1993). Daha sonra yapılan denemeler, W1, 6₁ ve N hatlarının sistemik hastalığa karşı dirençli olduğunu, buna karşın C, 7₂ ve 151 hatlarının oldukça duyarlı olduğunu göstermiştir (Hu ve ark., 1997). Berthelot-Herault ve ark. (2003), *Salmonella* Enteritidis'in sekum kolonizasyonu yönünden B13, L2, PA12 ve Y11 tavuk hatlarını karşılaştırmışlar ve *Salmonella* Enteritidis'in B13 ve L2 hatlarında PA12 ve Y11 hatlarına göre daha yüksek oranda sekuma kolonize olduğunu tespit etmişlerdir.

S. enterica subsp. *enterica*'ya ait serovarlar insan ve memeli hayvanlarda hastalık oluştururlar. *S. enterica* subsp. *enterica*'ya ait serovarlardan *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi ve *Salmonella* Hirschfeldii gibi çok az serovar insan patojenidir ve hayvanlarda bulunmaz ve hastalığa neden olmazlar. Nontifoidal

Salmonella serovarları olarak da adlandırılan geriye kalan *Salmonella* serovarları zoonotik öneme sahiptir. *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indica*, *S. bongori* genellikle poikilotermelerde (sürüngenler, amfibianlar ve balıklar) ve çevrede bulunmaktadır. Bu mikroorganizmaların bazıları nadiren insanlarda hastalığa neden olurlar (Brenner ve ark., 2000; Anon., 2005).

Kanatlılarda konakçılarına göre *Salmonella* serovarlarını üç büyük kategoriye ayırmak mümkündür. Birinci grupta *Salmonella* Pullorum ve *Salmonella* Gallinarum gibi sadece kanatlılarda hastalık yapan serovarlar bulunmaktadır. İkinci grupta insanlarda ve kanatlılarda hastalık oluşturan en önemli iki serovar *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium'dur. Üçüncü grupta ise, insanlarda besin zehirlenmelerine neden olan fakat genellikle kanatlılarda hastalık meydana getirmeyen serovarlar bulunmaktadır. Bu gruba *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Kedougou örnek olarak verilebilir (Horrox, 1995).

Salmonella'lar, çoğu hayvanların safra kesesi ve bağırsaklarında asemptomatik olarak taşınmaktadırlar ve dışkı aracılığıyla sürekli veya aralıklı olarak saçılmaktadırlar. Mezenterik lenf nodüllerinde ve tonsillerde latent olarak da bulunabilirler ve böyle durumda dışkı aracılığıyla saçılmazlar. Ancak, stres veya immunosupresyon durumunda yeniden aktive olurlar. Fomitler ve vektörler *Salmonella*'ların yayılmasına neden olabilirler. Kanatlılarda vitellin membran, albumin ve yumurta sarısının *Salmonella* ile kontaminasyonu sonucu vertikal bulaşma da olmaktadır. Hayvanlar kontamine yemler, içme suları ve infekte hayvanlarla yakın temas sonucunda da infekte olabilirler (Lemarchand ve Lebaron, 2003; Anon., 2005).

Salmonella'lar dış ortamda, özellikle, sıcak ve nemli ortamlarda uzun süre canlı kalabilir (Anon., 2005). *Salmonella*'ların sığır dışkısında 11–12 hafta, gübre atılmış toprakta aylarca canlılıklarını koruyabildikleri rapor edilmiştir (Friend, 1999). *Salmonella* Choleraesuis dışkıda birkaç ay, domuz etinde 450 gün kadar canlı

kalabilirken, *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Dublin çevrede bir yıl civarında canlı kalabilmektedir (Anon., 2005)

Salmonella'lar ısıya dayanıklı değildir, 55 °C'de 20 dakika da tahrip olurlar. Ancak düşük ısıya oldukça dirençlidirler. Özellikle soğukta saklanan yiyeceklerde, uzun süre canlı kalmaları nedeniyle *Salmonella*'lardan ileri gelen gıda zehirlenmelerinde bu dirençlilik unutulmamalıdır (İzgür, 2002). *Salmonella*'lar, -37 °C'de dondurulmuş ve -21 °C'de saklanan tavuk karkaslarında 13 ay boyunca canlı kalabilmişlerdir (Nagaraja ve ark., 1991).

Davies ve Breslin (2003), *Salmonella* Enteritidis PT4'ün dirençliliği üzerine yaptıkları çalışmalarını, etkenin identifiye edildiği bir damızlık çiftliğinde, kümesin boşaltılmasını takiben 26 ay boyunca belli dönemlerde örnekler alarak yürütmüşlerdir. Altlık, kuru dışkı ve yemde etken sürekli olarak bulunurken, tozda sürekli olarak bulunamamıştır. *Salmonella* Enteritidis PT4, 8 ay sonrasında toprakta bulunurken, 13 ay sonrasında topraktan izole edilememiştir. Aynı zamanda, etken fare, tilki ve kedilerin dışkılarında bulunurken, porsuk ve vahşi kuşların dışkılarında tespit edilememiştir. Etken, ayrıca topraktaki böcek ve kırkayakların yetişkin ve larva formlarında da bulunmuştur.

Hilton ve ark. (2002), aktif *Salmonella* infestasyon bölgesinden topladıkları ratların dışkı, rektal svap, ayak, kürk ve tırnaklarından örnekler alarak, *Salmonella* yönünden incelediklerinde, dışkı örneklerinin %8'inden ve rektal svapların ise %10'undan *Salmonella* izole etmişler ancak, ratların dış yüzeylerinden aldıkları örneklerde pozitiflik saptamamışlardır.

Hayvanlarda asemptomatik *Salmonella* enfeksiyonları yaygındır. Evcil hayvanların yaklaşık %1-3'ünün *Salmonella* taşıyıcısı olduğu düşünülmektedir. Ancak, bazı türlerde prevalans daha yüksektir. *Salmonella* taşıyıcılığı sürüngenler arasında %30'dan %80-90'dan daha yüksek oranlara kadar değişmektedir. Yüksek prevalans oranları memeli ve kanatlılarda da mevcuttur. Kaliforniya'da test edilen

hindilerin %41'inden ve Massachusetts'de ise incelen tavukların %50'sinden *Salmonella* izole edilmiştir (Anon., 2005).

Salmonella enfeksiyonlarının bir haftalıktan küçük civcivlerde yüksek mortalite ile seyrettiği, ergin tavuklarda ise büyüme ve gelişmede bozukluk şekillendirdiği rapor edilmiştir (Lister, 1988). Çoğu klinik vakalar çok genç tavuklarda görülmektedir. İştahsızlık, uyuşukluk, diyare, susuzluk ve merkezi sinir sistemi belirtileri görülebilir (Anon., 2005). Hastalık, solunum belirtileri, düşkünlük ve beyazımtırak bir ishale seyreden septisemik form halindedir. Perakut seyrettiği durumlarda artritis ve omfalitis de görülebilir. Ergin hayvanlarda genellikle semptom görülmez. Ancak, akut olgularda halsizlik, düşkünlük, yumurta veriminde düşüş, ilk günlerde ateş, iştahsızlık ve 10 gün içinde ölüm izlenebilir (İzgür, 2006). Paratifo enfeksiyonlarından kaynaklanan civciv ölümleri en çok 6 ve 10'uncu günler arasında olmakla birlikte, ölümlere yumurtadan çıktıktan sonraki ilk iki hafta boyunca daha çok rastlanmaktadır (Nagaraja ve ark., 1991).

Ruminantlarda *Salmonella*'ların belirtisi enteritis ve septisemidir. Yetişkin hayvanlarda ve buzağılarda en yaygın form akut enteritistir. Bu form diyare, dehidrasyon, depresyon, abdominal ağrı ve iştahsızlıkla karakterizedir. Dışkı yapışkan ve sulu, iğrenç kokulu olup mukus, mukoz membran parçaları ve kan içerebilir. Ateş çoğunlukla enfeksiyonun başlangıcında oluşur. Ancak, ishal gelişinceye kadar kaybolur. Süt ineklerinde süt üretimi durur. Bağırsak Salmonellozisi genellikle 2-7 gün sürer. Ölüm, dehidrasyon ve tokseminin sonucu olarak oluşur. Subakut enteritis yetişkin at, sığır ve koyunlarda görülebilir. En belirgin semptom diyare veya süregelen yumuşak dışkı ve kilo kaybıdır. Orta düzeyde ateş, iştah kaybı ve dehidrasyon da şekillenebilir. Kronik enteritis daha ileri yaştaki buzağılarda ve yetişkin sığırlarda görülmektedir. Zayıflama, aralıklı ateş ve iştah kaybı oluşur. Dışkı genellikle az ve normal, mukus veya kan içerebilir (Anon., 2005).

Genç buzağlarda ve kuzularda septisemi sıklıkla şekillenebilmektedir. Belirgin depresyon, yüksek ateş ve genellikle 2-3 gün içinde ölüm, merkezi sinir sistemi belirtileri ve pnemoni de görülebilir. Gebe ruminatlarda abort olabilir. Sığırlarda genellikle *Salmonella* Dublin, koyunlarda *Salmonella* Abortusovis abortlarla ilgili serovarlardır. Subakut enteritisli ineklerde abortusu birkaç gün süren diyare, koyunlarda abortusu koyu kırmızı renkte vajinal prolapsus ve bazen ölüm izler (Anon., 2005).

Perakut enfeksiyonlardan ölen tavuklarda herhangi bir bulgu görülmeyebilir. Akut enfeksiyonlarda ise karaciğer dalak ve böbrekler hemorajik görünümlü olup karaciğerde küçük nekrotik odaklar göze çarpar ve karaciğer hipertroftir. Cıvıclerde, yüksek oranda emilmemiş yumurta sarı kesesi görülür (İzgür, 2006). O'Brien (1988), iki haftalık infekte broylerlerin perikarditis ve karaciğerlerinde nekrotik odaklar görüldüğünü ifade etmiştir.

Ruminatlarda bağırsak lezyonları çok yaygındır ve lezyonlar ileumun alt kısımlarında ve kalın bağırsakta şiddetlidir. Nekropsi bulguları patognomonik değildir. Akut enteritiste mukozal erozyonlarla birlikte şiddetli hemorajik enteritis ve bağırsak içeriğinde kan bulunmaktadır. Bazı vakalarda difterik membranlar görülebilmekte ve benzer lezyonlar abomazumda da bulunabilmektedir. Mezenterik lenf nodülleri genellikle ödematöz ve kanamalıdır. Safra kesesinin duvarında yangı bulunabilir. Karaciğerde dejenerasyon, seröz boşluklarda kanlı sıvı, kalpte ve bazı organlarda kanamalar şekillenebilir. Kronik Salmonellozis'li sığırlarda, bağırsak duvarı kalınlaşmakta, sekum ve kolon mukozasında nekroz alanları bulunabilmektedir (Anon., 2005).

Salmonella'lardan ileri gelen enfeksiyonların kesin teşhisinde klinik ve nekropsi bulguları yeterli olmadığından *Salmonella* izolasyonu ve identifikasyonu şarttır (Bisping ve Amtsberg, 1988; İzgür, 2006).

Septisemi veya atık olgularından sağlanan organ materyallerinden yapılan ekimlerde *Salmonella* izolasyonu kolay olmasına rağmen, portör hayvanların belirlenmesinde kullanılan dışkı kültürlerinde ya da yem örneklerinde *Salmonella* aranmasında, zenginleştirme yönteminin kullanılması izolasyon şansını artırmaktadır (İzgür, 2006).

Salmonella izolasyonu için, genellikle, ön zenginleştirme, zenginleştirme ve selektif ekim olmak üzere üç kültürel prosedür aşaması kullanılmaktadır (Horrox, 1995). Uluslararası düzeydeki standart analiz kuruluşları ve yapılan bir çok çalışmada (Morinigo ve ark., 1986; Knight ve ark., 1990), ön zenginleştirme aşaması için farklı besiyerleri ve inkübasyon koşulları önerilmektedir. Ön zenginleştirmede selektif olmayan besiyerleri kullanılmaktadır (Horrox, 1995). Bu amaçla en çok kullanılan besi yerleri Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS) ve Laktoz Broth (LB)'dur (Fricker, 1987).

Selektif zenginleştirme basamağında, *Salmonella*'ların üremesini destekleyen, diğer bakterilerin üremelerini inhibe eden besi yerleri kullanılır. Bu amaçla, Tetrathionate (TT broth) broth, Selenite-Cysteine (SC) broth, Selenite broth ve Rappaport-Vassiliadis (RV) broth gibi besi yerleri kullanılmaktadır. Tetrathionatlı buyyon, içerdiği pepton ve safra maddeleri ile *Salmonella*'ların üremesini sağlarken, yine içerdiği kalsiyum karbonat, sodyum tiyosülfat, iyot ve potasyum iyodür ile koliformların üremesini inhibe eder. Bu besiyeri dışkı, idrar, su, lağım suyu ve enfekte materyalden *Salmonella*'ların izolasyonunda kullanılmaktadır (Horrox, 1995; Bekar, 1997; İzgür, 2006)

Voogt ve ark. (2001), broyler ve yumurtacı tavukların dışkılarından *Salmonella* saptanmasında yarı katı besiyerleri (diagnostic semi-solid *Salmonella* medium-DIASALM ve modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium-MSRV) ve RV besiyerinin sonuçlarını karşılaştırmışlar, DIASALM ve MSRV'nin performansını RV'ye göre relatif olarak iyi bulmuşlardır. Araştırmacılar, yarı katı besiyerlerinden biri

ile RV besiyerinin kombine edilmesi durumunda, *Salmonella* içeren örneklerin yaklaşık %95'inin saptanabildiğini bildirmişlerdir.

Sandberg ve ark. (2003), koyun dışkılarından *Salmonella enterica* IIIb 61:k:1,5,(7) izolasyonunda, ön zenginleştirmenin bir avantaj sağlamadığını, direkt SC'e ekim yapıldığında daha başarılı olduğunu rapor etmişlerdir.

Nye ve ark. (2003), dışkıdan *Salmonella*'ların izolasyonunda kullanılan SC ve Mannitol Selenite zenginleştirme brothlarının performansını karşılaştırmak amacıyla, 4658 dışkı örneklerini incelemişlerdir. *Salmonella* izolasyon oranını Mannitol Selenite ile %1,55 bulurken, SC ile %1,48 bulmuşlar ve aradaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını belirtmişlerdir.

Selektif katı besiyeri olarak Brilliant Green (BG) agar, Xylose-Lysine-Desoxycholate (XLD) agar, Hektoen Enteric (HE) agar, MacConkey agar, Salmonella-Shigella (SS) agar, Eosyn Methylene Blue (EMB) agar, Brilliant Green Sulfa (BGS) agar ve Bizmuth Sulphite (BS) agar kullanılmaktadır. Arizona gurubu *Salmonella*'ların %70'i laktoz pozitif olduğu için sülfid içeren selektif besiyerlerinde daha iyi identife edilirler (Bisping ve Amtsborg, 1988; Quinn ve ark., 1994; Bekar, 1997).

Son yıllarda, *Salmonella*'ların izolasyonuna yönelik birçok kromojenik besiyerleri geliştirilmiştir (Rambach, 1990; Dusch ve Altwegg, 1995; Perry ve ark., 1999; Maddocks ve ark., 2002). Rambach agar (Ra), *Salmonella* suşlarının propylene glycolü fermente etme özellikleri temel alınarak geliştirilmiş ve bu agarda neutral red ile kırmızı koloniler oluşturması sağlanmıştır. Xylose-Lysine-Tergitol-4 (XLT4) agarda tipik *Salmonella* kolonileri siyah ya da siyah merkezli pembe-kırmızı koloniler şeklinde ürerler. H₂S negatif *Salmonella* kolonileri pembemsi kırmızı renktedir. XLT4 agarda *Proteus*, *Pseudomonas*, *Providencia*, *Yersinia enterocolitica*, *Acinetobacter calcoaceticus* üremez (Bekar, 1997).

Salmonella Gallinarum ve *Salmonella* Pullorum'un izolasyonu için besiyerlerine novobiyosin katmanın faydası olmadığı, buna karşın *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Infantis'in izolasyonunda bu işlemin önemli olduğu vurgulanmıştır (Çarlı, 1990).

Arda ve ark. (1995), 550 adet dışkı örneğini *Salmonella* izolasyonu için TT broth da birinci zenginleştirmeye tabi tuttukten sonra, Rambach (propylene glycol'lü besi yeri), MacConkey ve Brilliant Green selektif agarlarına ekmişlerdir. Bu selektif besiyerlerindeki *Salmonella* izolasyon oranlarını sırasıyla 79 (%14,4), 77 (%14,0) ve 42 (%7,6) olarak bulmuşlardır.

Dusch ve Altwegg (1995), dışkılarından nontifoidal *Salmonella* izolasyonu amacıyla direkt olarak MSRV, Novobiocin-Brilliant Green- Glycerol-Lactose agar, XLT4 agar, Salmonella Detection and Identification Medium (SM-ID), Rambach agar, HE agara ekim yaparak ayrıca TT broth'ta zenginleştirme yaptıktan sonra aynı besiyerlerine ekim yaptıklarında MSRV'nın diğer besiyerlerine göre daha iyi sonuç verdiğini tespit etmişlerdir.

Perry ve ark. (1999), *Salmonella* spp. izolasyonunu kolaylaştırmak için iki kromojenik substrat (3,4-cyclohexenoesculetin- β - D-galactoside and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α - D-galactopyranoside) içeren $\alpha\beta$ -chromogenic medium (ABC) besiyerine ekilen 1022 *Sallmonella* suşunun 1019 (%99,7)'unun karakteristik siyah koloni verdiğini rapor etmişlerdir.

Maddocks ve ark. (2002), dışkılarından izole edilen 115 adet *Salmonella* izolatu ile 500 adet dışkı örneğini, geliştirilen yeni bir kromojenik besiyeri olan CHROMagar Salmonella (CAS) besiyeri ile, XLD agar, SS agar ve HE agarla karşılaştırdıklarında, CAS besiyerinin daha iyi ve daha çabuk sonuç verdiğini ve özellikle H₂S negatif *Salmonella*'ların izolasyonunda diğer besiyerlerine göre daha başarılı olduğunu tespit etmişlerdir.

Perez ve ark. (2003), kromojenik besiyerleri olan CAS agar, COMPASS Salmonella agar, SM ID agar, ABC besiyeri, HE agar besiyerlerine direk ve Selenit broth'ta zenginleştirmeden sonra yapılan ekimler sonucunda dışkılarda *Salmonella* saptanmasında COMPASS Salmonella agar ve CAS besiyerlerinin daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Salmonella'ların kesin identifikasyonu, selektif katı besiyerinden elde edilen saf kültürlerle bir seri biyokimyasal ve serolojik testlerin uygulanmasıyla yapılır. *Salmonella* identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler çeşitli kuruluşlara göre değişmektedir. "Food and Drug Administration (FDA)"nın yönteminde toplam 10 besiyerinde 17 biyokimyasal test önerilirken (Andrews ve ark., 1998), "International Organisation for Standardisation (ISO)" *Salmonella* identifikasyon yönteminde ise kullanılan biyokimyasal test sayısı 8 adet olup 5 tüpte gerçekleştirilmektedir (Anon., 1988).

Enterobacteriaceae familyasına ait mikroorganizmaların identifikasyonunda son yıllarda çabuk sonuca giden sistemler geliştirilmiştir. Bu identifikasyon sistemleri klasik identifikasyon metotlarıyla büyük uyum göstermektedir. Bu metotlardan biri de Norveç üçlü tüp sistemidir. Bu sistem sayesinde 13 farklı biyokimyasal test üç tüp üzerinde saptanabilmektedir (Lassen, 1975; Bekar, 1997). Serolojik identifikasyon, Kauffmann-White Şeması'na göre yapılmaktadır (Holt ve ark., 1994).

Epidemiyolojik çalışmalarda *Salmonella* izolatlarının ilişkisini saptamak için birçok metot kullanılmaktadır. Antimikrobiyal duyarlılık testleri, biyotiplendirme, kolisin tiplendirme, faj tiplendirme, izoenzim profili, tüm hücre protein profili, dış membran protein profili gibi fenotiplendirme metotları; plazmid profil analizi, plazmid restriksiyon analizi, oligohibridizasyon, ribotiplendirme, PCR fingerprinting gibi genetik karakterizasyon ile kombine edilebilmektedir (Carraminana ve ark., 1997).

Cins düzeyinde *Salmonella* etkenlerini %97 oranında lize edebilen *Salmonella* O-1 fajı, özellikle *Salmonella* genusunun identifikasyonunda güvenilir, cins spesifik bir bakteriyofajdır. Ayrıca *Salmonella*'ların birçok türünün identifikasyonunda kullanılan tür spesifik fajlar da bulunmaktadır (İzgür, 2006).

Salmonella etkenlerinin konvansiyonel tekniklerle teşhisi; etkenin besi yerlerinde üretilmesi, biyokimyasal ve serolojik testlere dayanmakta olup, bu işlemlerin tamamlanması en az bir haftalık süre almaktadır. Etkenin saptanması amacıyla floresan antikor tekniği (FAT), aglutinasyon ve enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) yöntemlerinden de yararlanılmaktadır. Ancak, bu testlerin spesifiteleri aynı antijenik determinanta sahip olan diğer bakterilerin de saptanabilmeleri gibi nedenlerle sınırlıdır ve bu yüzden hatalı pozitif reaksiyonlar da görülebilir (Amavisit ve ark., 2000; Sibley ve ark., 2003; Myint ve ark., 2006). Bu nedenle, işlemlerin uzun süre alması ve fazla sayıda manipulasyon içermesi alternatif metotların ve özellikle de moleküler tekniklerin kullanımını artırmıştır.

Çeşitli hayvansal kaynaklarda *Salmonella* etkenlerinin saptanmasında en sık kullanılan metotlar arasında PCR bulunmaktadır (Cohen ve ark., 1994; Fadl ve ark., 1995; Guo ve ark., 1999; Amavisit ve ark., 2000). Makino ve ark. (1999), yaptıkları bir çalışmada, çeşitli hayvanlardan aldıkları materyalleri Tryptic Soy buyyonda (TSB) zenginleştirdikten sonra direkt olarak PCR ile etkenleri saptamışlardır. Way ve ark. (1993), yaptıkları bir çalışmada, multipleks PCR kullanarak *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Enteritidis'i saptadıklarını bildirmişlerdir. Woodward ve Kirwan (1996), yumurtalarda; Şeker ve ark. (2003), tatlı su midyelerinde *Salmonella* etkenlerini PCR'la saptamışlardır.

Jouy ve ark. (2005), Fransa'da damızlık ve yumurtacı sürülerde düzenli aralıklarla *Salmonella* taramalarının yapıldığını ve bu taramaların fekal ve çevresel swap örneklerinin bakteriyolojik incelemesine dayandığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, yaptıkları çalışmalarında, ELISA ve bakteriyolojik metodu

karşılaştırmışlar ve bakteriyolojik incelemenin ELISA'dan daha uygun olduğu sonucuna varmışlardır.

Türkiye'de tavuk sürülerinde 1980'li yıllarda daha çok *Salmonella* Gallinarum ve *Salmonella* Typhimurium bildirilmesine karşın, 1990'lı yıllarda bu serovarlar yerine daha çok *Salmonella* Enteritidis görülmeye başlanmıştır (Çarlı, 1990; Çarlı ve ark., 2001a; Eyigör ve ark., 2005; Kılınç ve Aydın, 2006). Çarlı ve ark. (2001a), bakteriyolojik olarak inceledikleri 814 ileosekal bağırsak örneğinin 151 (%18,6)'ini *Salmonella* yönünden pozitif bulmuşlar ve bu pozitif örneklerin %81,5'inin *Salmonella* Enteritidis, %10,1'inin *Salmonella* Thompson, %7,6'sının *Salmonella* Agona ve %0,8'inin de *Salmonella* Sarajane olduğunu bildirmişlerdir.

Bursa bölgesinde 1989 yılında, klinik olarak Salmonellosis'ten şüpheli 301 (185'i yumurta ve 116'sı broyler tipi) tavuğun kloakal svaplarından toplam 197 *Salmonella* suşu izole edilmiş ve bunların 186'sının *Salmonella* Gallinarum, 7'sinin *Salmonella* Typhimurium, 2'ser adedinin *Salmonella* Pullorum ve *Salmonella* Infantis olduğu bildirilmiştir ve *Salmonella* Infantis'in Türkiye'de tavuklardan ilk izolasyon olduğu rapor edilmiştir (Çarlı, 1990).

Goncagül ve Çarlı (1999), Bursa, İstanbul ve İzmir bölgelerinde 20 adet damızlık, 17 adet yumurtacı ve 13 adet broyler olmak üzere toplam 50 işletmeden alınan svapları *Salmonella* yönünden incelediklerinde 7 adet *Salmonella* Typhimurium, 6 adet *Salmonella* Enteritidis ve 5 adet *Salmonella* Gallinarum izole ettiklerini belirtmişlerdir.

Kalender ve Muz (1999), 527 tavuğun 57 (%10,81)'sinden *Salmonella* suşu izole etmişler, koaglutinasyon ve lam aglutinasyon testleri ile yaptıkları serogruplandırma sonucunda toplam 57 suşun 53'ünü D1 serogrubunda, 4'ünü B serogrubunda bulmuşlardır. D1 serogrubundaki suşların 39'unu *Salmonella* Enteritidis, 14'ünü *Salmonella* Gallinarum, B serogrubundaki suşların ise tümünü *Salmonella* Typhimurium olarak serotiplendirmişlerdir. *Salmonella* Enteritidis

suşlarının faj tiplendirmesi sonucunda 39 suşun 30'unu *Salmonella* Enteritidis PT4, 6'sını PT1 ve 1'ini PT7 olarak tiplendirmişlerdir.

Altay ve Yardımcı (2001), tavuklarda *Salmonella* Enteritidis antikorlarını serum ve yumurta sarısında ELISA ile saptamak amacıyla 11 yumurtacı ve damızlık işletmeye ait tavuklardan 473 serum ve 430 yumurta sarısı almışlardır. Serumların 173 (%36,6)'ünü ve yumurta sarılarının 76 (%17,7)'sini ELISA ile pozitif bulmuşlardır.

Van yöresinde 2003 yılında ticari ve aile tipi işletmelerde tavuk (400), hindi (400), bıldırcın (200) ve devekuşu (200) kloakalarından steril svaplarla alınan toplam 1200 dışkı örneği *Salmonella* yönünde incelenmiş ve %4,08 oranında *Salmonella* spp. izole ve identifiye edilmiştir. Bu çalışmada tavuk dışkı örneklerinden identifiye edilen %7 *Salmonella* suşunun %35,1'i *Salmonella* Gallinarum, %35,71'i *Salmonella* Enteritidis, %21,43'ü *Salmonella* Corvallis, %3,57'si *Salmonella* Typhimurium ve %3,57'si *Salmonella* Agona olarak serotiplendirilmiştir. Hindi dışkı örneklerinden izole edilen %5 *Salmonella* suşunun %45'i *Salmonella* Enteritidis, %20'si *Salmonella* Augustenborg, %15'i *Salmonella* Anatum var.015+, %10'u *Salmonella* Gallinarum, %5'i *Salmonella* Virchow, %5'i *Salmonella* Cambridge olarak serotiplendirilmiştir. Bıldırcın dışkı örneklerinden sadece bir adet *Salmonella* Gallinarum suşu izole edilirken devekuşu dışkılarından ise *Salmonella* izole edilememiştir. Ayrıca bu çalışmada, *Salmonella* Cambridge, *Salmonella* Anatum var.015+, *Salmonella* Augustenborg ve *Salmonella* Virchow suşları Türkiye'de ilk defa dışkıdan izole edildiği belirtirmiştir (Aksakal, 2003).

Goncagül ve ark. (2005), tavuk etlerinde *Salmonella* serogruplarının prevalansını araştırmak için toplamış oldukları 315 adet tavuk kanadının 27'sinden serogrup D'de yer alan *Salmonella* Enteritidis, 30'unda da A, B, C, D serogruplarına ait olmayan ve tiplendirilemeyen *Salmonella* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Kayseri yöresinde, *Salmonella* enfeksiyonundan şüpheli canlı veya agoni halinde olan 578 adet kanatlı hayvana ait kalp, karaciğer, dalak ve yumurta keseleri

Salmonella yönünden incelenmiş ve izole edilen 61 adet *Salmonella* spp.'nin %75,4'ünün D₁ serogrubunda, %24,6'sının B serogrubunda olduğu, D₁ serogrubundaki 46 izolatın %71,7'sinin *Salmonella* Enteritidis, %28,3'ünün *Salmonella* Gallinarum, B serogrubundaki 15 izolatın hepsinin *Salmonella* Typhimurium olduğu rapor edilmiştir (Kılınç ve Aydın, 2006).

Erdoğrul ve ark. (2002), 123 bildiricin yumurtası örneğinde *Salmonella* Enteritidis varlığını araştırmışlar; koaglutinasyon ve lam aglutinasyon testleri sonucunda serogruplandırma yapmışlar ve yapılan testler sonucunda 123 bildiricin yumurtasından 7 tanesini (%5,69) *Salmonella* Enteritidis olarak saptamışlardır. Faj tiplendirmesi sonucunda, toplam 7 suşun 3'ünü *Salmonella* Enteritidis PT4, 2'sini PT1, 1'i PT7 olarak tespit etmişler ve ancak, 1'ini tiplendirememişlerdir.

Çiflik hayvanlarında *Salmonella* izolasyonu ile ilgili çalışmalarda, Çarlı ve ark (1991), Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği'ndeki ineklere mikroaglutinasyon testi (MA) uygulamaları sonucunda 74 ineğin 64'ünde *Salmonella* Typhimurium antikorlarını tespit etmelerine karşın, yalnızca 1 ineğin dışkılarından *Salmonella* Typhimurium izolasyonu yaptıklarını belirtmişlerdir. Çarlı ve ark. (1994), 196 adet sığır ve koyun safra keselerinden *Salmonella* izolasyonu yapılamadığını bildirmişlerdir. Gökçen ve ark. (1995), İzmir ve Manisa mezbahalarında kesilen 298 sığra ait safra keselerini, mezenteriyel lenf yumrularını ve ince bağırsak içeriklerini *Salmonella* yönünden incelediklerinde, bir sığra ait ince bağırsak içeriğinden *Salmonella* Typhimurium izole ederlerken, iki sığra ait mezenteriyel lenf yumrusundan da E₂ grubu *Salmonella* spp. ve *Salmonella* Typhimurium olmak üzere toplam 3 adet *Salmonella* izolasyonu yaptıklarını rapor etmişlerdir.

Arda ve ark. (1983), Et ve Balık Kurumu Ankara Mezbahası'nda kesilen 108 adet koyun ve 104 adet sığra ait toplam 212 adet safra kesesini *Salmonella* yönünden incelemişler ve sığır safra keselerinden *Salmonella* izolasyonu yapılamadığını, koyunlarda ise sadece bir adet safra kesesinden *Salmonella* izole

ettiklerini bildirmişlerdir. Çalıcioğlu ve ark. (2005), Elazığ'daki bir mezbahada kesilmiş ve 24 saat soğutulmuş sığır karkaslarının yüzeylerindeki mikrobiyolojik kontaminasyon seviyesini belirlemek amacıyla alınan 44 adet örneğin, hiçbirinden *Salmonella* izolasyonu yapılamadığını bildirmişlerdir.

Busato ve ark. (1999), 395 buzağının her birinden 3-4 fekal örnek alarak bakteriyolojik olarak incelemişler fakat hiç birinden *Salmonella* izole edememişlerdir. Kabagambe ve ark. (2000), 91 sığır sürüsünden 25'inin (%27,5) dışkılarıyla *Salmonella* saçıktıklarını tespit etmişlerdir. McEvoy ve ark. (2003), İrlanda'da sığır kesimhanelerinde kesilen sığırların karkasları ile dışkı ve rumen içeriklerini *Salmonella* yönünden incelediklerinde, dışkı ve rumen içerik örneklerinin %2'sinden ve karkasların ise %7,6'sından *Salmonella* izole etmişlerdir. *Salmonella* izolasyonunun daha çok Ağustos ile Ekim ayları arasında yapıldığını, *Salmonella* pozitif örneklerin %72'sinin *Salmonella* Dublin ve %14'ünün *Salmonella* Agona ve yine %14'ünün *Salmonella* Typhimurium olduğunu belirtmişlerdir. Fossler ve ark. (2005), New York, Michigan, Wisconsin ve Minnesota'da, 2000-2001 yılları arasında yaptıkları çalışmalarında, 20,089 süt sığırının 1026 (%4,9)'sının dışkı örneğinden *Salmonella* saptamışlardır. Fossler ve ark. (2005a), 129 buzağı çiftliğinin 40 (%31)'inde ve önceden süttten kesilmiş 4673 buzağının 176 (%3,8)'sının dışkı örneğinden *Salmonella* izolasyonu yapmışlardır.

Koyunlarda *Salmonella* etkenlerinin varlığını belirlemek amacıyla Norveç'te yapılan bir çalışmada, Alvseike ve Skjerve (2002), 10 farklı kesimhaneden toplam 133 koyun sürüsüne ait dışkı örneklerini, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7) yönünden incelediklerinde 16 (%12) sürüyü pozitif bulmuşlardır. Hjartardottir ve ark. (2002), İzlanda'nın değişik bölgelerindeki 50 çiftlikten 2592 adet gebe koyuna ait dışkıların hiç birinden *Salmonella* izolasyonu yapamadıklarını belirtmişlerdir. Salehi (2004), koyunlarda en yaygın bulunan *Salmonella* serotiplerinin *Salmonella* Abortusovis, *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Montevideo ve *Salmonella* Typhimurium olduğunu bildirmiş ve yaptığı çalışmada, koyunlardan aldığı 10 dışkı, 96 karaciğer, 86 böbrek ve 110 mezenterik lenf nodülü olmak üzere toplam

302 adet örneği incelediğinde, 2 mezenterik lenf nodülünden D serogrubuna ve 1 adet böbrekten de B serogrubuna ait olmak üzere 3 adet *Salmonella* izole etmiştir.

Woldemariam ve ark. (2005), sağlıklı 60 keçi ve 47 koyundan aldıkları toplam 642 örneği (dışkı, mezenterik lenf nodülü, dalak, karaciğer, abdominal ve diyafram kası) *Salmonella* yönünden incelemişler ve 10 (%9,3) keçi ve 3 (%2,8) koyun olmak üzere toplam 13 (%12,1) hayvanı *Salmonella* pozitif olarak tespit etmişlerdir. Toplam 107 hayvana ait dalak, dışkı, karaciğer ve mezenterik lenf nodüllerinde sırasıyla 2 (%1,9), 3 (%2,8), 5 (%4,7), 7 (%6,5) *Salmonella* pozitif bulmuşlardır. *Salmonella* izolatlarının içerisinde *Salmonella* Infantis (%45,5), *Salmonella* Butantan (%24,2), *Salmonella* Braenderup ve *Salmonella* Kingabwa (%6,1), *Salmonella* Zanzibar, *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Kottbus ve *Salmonella* Hadar (%3) bulmuşlardır.

Padungtod ve Kaneene (2006), tavuk, domuz, sığır, temasta olan ve temasta olmayan çiftlik çalışanları ve ishali çocuklarda *Salmonella* epidemiyolojisini tespit etmek için bir çalışma yapmışlar ve kümesteki tavuklarda, kesimhanede ve marketteki tavuk etlerinde sırasıyla %4, %9 ve %57 oranında *Salmonella* izole etmişlerdir. Sığırlardaki *Salmonella* prevalansını ise %3 bulmuşlardır. Çiftlik hayvanları ile temasta olan ve temasta olmayan çiftlik çalışanlarından sırasıyla %36 ve %33 *Salmonella* izole etmişlerdir. İshali çocuklarda ise %7 oranında *Salmonella* bulmuşlardır. İnsanlardan ve tavuklardan daha çok *Salmonella* Weltevreden izole etmişlerdir. Çalışmada insanlardan ve hayvanlardan izole ettikleri *Salmonella* türlerinde antimikrobiyel direncin bulunduğunu ve tetrasiklin ve nalidiksik asite direncin yaygın olduğunu açıklamışlardır.

Vietnam’da yapılan bir çalışmada 56 insan ve 241 hayvan orjinli (dışkı, karkas, et) toplam 297 adet nontifoidal *Salmonella* izolatları arasında en yaygın serovarların *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Weltevreden, *Salmonella* Emek, *Salmonella* Rissen olduğunu ve *Salmonella* Typhimurium izolatları arasında

en yaygın bulunan izolatın *Salmonella* Typhimurium phage type 9 olduğunu belirtmişlerdir (Vo ve ark., 2006) .

ABD’de 2002 yılında insanlardan en çok izole edilen *Salmonella* serovarları sırasıyla *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Javiana, *Salmonella* Montevideo, *Salmonella* Muenchen, *Salmonella* Oranienburg ve *Salmonella* Saintpaul’dur. Yine 2002 yılında ‘‘National Veterinary Services Laboratory (NVSL)’’ ve ‘‘Center for Disease Control and Prevention (CDC) ’’ raporlarına göre hasta hayvanlarda en sık rastlanan serotiplerin sırasıyla *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Cholerasesuis, *Salmonella* Montevideo, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Senftenberg ve *Salmonella* Dublin olduğunu bildirmişlerdir (Anon., 2005).

Soumet ve ark. (1999), kanatlı kümeslerinden aldıkları çevresel örneklerden *Salmonella* saptanmasında kültür ve multiplex-PCR (m-PCR)’i denemişlerdir. MSRV ile kombine ettikleri m-PCR (%95) ile bakteriyolojik metottan (%92,5) daha yüksek duyarlılık elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Çarlı ve ark. (2001b), saf *Salmonella* enterica serovar Enteritidis 64K suşunu TPS, Nutrient broth (NB), TT-hajna ve TT broth’ta zenginleştirdikten sonra kapillar PCR ile saptamışlardır. Aynı kültürü, bağırsak homojenatı ile karıştırıp aynı uygulamaları yaptıklarında kapillar PCR ile sadece TT-hajna ve TT brotht zenginleştirmelerinde başarı elde etmişlerdir.

Gentry-Weeks ve ark. (2002), sığır ve at dışkılarını *Salmonella* yönünden PCR ile incelerken iki farklı primer (*invE-A* ve *hisJ*) denemişler ve kültür ile karşılaştırdıklarında *invE-A* ile sensitivite ve spesifitenin sırasıyla %80 ve %98,6, *hisJ* ile ise sırasıyla %93,3 ve %85,6 bulmuşlardır.

Whyte ve ark. (2002), 40 broyler sürüsünden topladıkları toplam 198 boyun derisi örneğini konvansiyonel kültür metodu ve PCR ile incelemişler; kültür metodu ile 32 (%16)'sini, PCR ile 38 (%19)'ini *Salmonella* yönünden pozitif bulmuşlardır. Her iki testi kombine ettiklerinde ise sürülerin %55'inin *Salmonella* pozitif olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, PCR'nin kültür metoduna göre daha sensitif olduğunu; broyler karkaslarında etkenin saptanmasında kültür ile birlikte PCR uygulamasının oldukça spesifik ve sensitif olduğunu kanıtlamışlardır.

LigthCycler real-time PCR, konvansiyonel PCR metodundan 10 kat daha hızlı ve kapillar jel elektroforezis ile kombine edilen kapillar PCR'dan da daha kısa sürede sonuç vermektedir. Eyigör ve ark. (2002), 47 kanatlı sürüsünden aldıkları 492 bağırsak homojenatı ve 27 svabın LigthCycler real-time PCR ve kültür ile sırasıyla 65 (%12,5) ve 35 (%6,8)'ini *Salmonella* pozitif bulmuşlardır. Araştırmacılar, kanatlı hayvanlarda *Salmonella* taramalarında standart bakteriyoloji ile beraber real-time PCR uygulamasıyla hızlı ve doğru olarak sonuca ulaşılabilceğini bildirmişlerdir.

Kumao ve ark. (2002), 1998-1999 yılları arasında, Japonya'da, 1505 insanın etkilendiği *Salmonella* Oranienburg salgınından izole ettikleri 82 izolatın moleküler alt tiplendirmesinde Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), enterobacterial repetitive intergenic sequence PCR (ERIC2-PCR), 16S/23S rRNA ribotiplendirme metotlarını denemişler ve Oranienburg serovarının intraserovar tiplendirmesinde, ERIC2-PCR yöntemini daha duyarlı bulmuşlardır. Buna karşın, native plasmid profiling, genetik ve epidemiyolojik olarak ilişkili salgın suşlarının 9 farklı alt grupta olduğunu ortaya koymuşlardır.

Fratamico (2003), perakende tavuk, hindi ve sığır etinde *Salmonella* saptanmasında kültür, PCR, Taqman *Salmonella* ve Transia Card *Salmonella* assay'i denemiş ve PCR'a dayalı testlerin kültür metodundan daha duyarlı olduğunu, kültür ve PCR'a dayalı testlerin ise immunoassaydan daha spesifik olduğunu belirlemiştir. Araştırmacı, kültürle hindi etlerinin %16,8'ini, PCR ile %24'ünü, TaqMan PCR ile

28,8'ini ve Transia Card *Salmonella* assay ile %26,4'ünü pozitif bulurken; tavuk etlerinin sırasıyla %18, %28,5, %35,5 ve 34,9'unu pozitif olarak saptamışlardır.

Ziemer ve Steadham (2003), fekal örneklerden PCR ile *Salmonella* saptamasına yönelik çalışmalarında, 9 primer setinin spesifitelerini değerlendirmişlerdir. Hedef genler olarak; 16S rDNA, *Salmonella* patojenite ada virulens geni, *Salmonella* enterotoksin geni(*stn*), *invA* geni, fur-regulated gen, histidin transport operon geni, *Sip B* ve *SipC* virulens genleri arasındaki bağlantı, *Salmonella* spesifik repetitive DNA fragmenti, virulens plazmidine ait *invA* ve *spvC* multipleks gen hedeflerini seçmişlerdir. Sadece 3 primer çiftinin (16S rDNA, *stn* ve histidin transport operon) fekal örneklerde PCR ile *Salmonella* saptanmasında uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Uyttendaele ve ark. (2003), doğal ve yapay kontamine kanatlı ve domuz etlerinde *Salmonella* saptanmasında real-time PCR, Vidas ELISA ve DIASALM kullandıkları konvansiyonel kültür metodunu karşılaştırmışlardır. DIASALM metodu ile doğal olarak kontamine olan 120 örneğin 45'ini *Salmonella* yönünden pozitif bulurlarken, real-time PCR ile %92'sini, Vidas ELISA ile %95'ini pozitif saptamışlardır.

Eyigör ve ark. (2005), Marmara bölgesinde 2000-2003 yılları arasında 191 tavuk sürüsünden bağırsak, klokal svap, drag svap ve altlıktan alınan 1785 adet örneği *Salmonella* yönünde incelemişlerdir. Ocak 2000 ve Haziran 2001 arasında toplanan 1242 örneğin SYBR green-based real-time polymerase chain reaction (SGBRT-PCR) ile %5,87, bakteriyolojik metotla %4,10 *Salmonella* pozitif bulmuşlar, haziran 2001 den Aralık 2003 yılına kadar toplanan 543 örneğin ise, probe-specific real-time polymerase chain reaction (PSRT-PCR) ile %11,42'sini, bakteriyolojik metotla %5,52 oranında *Salmonella* izolasyonu yaptıklarını rapor etmişlerdir. *Salmonella* serovarları arasında en yaygını *Salmonella* Enteritidis olduğunu belirtmişlerdir.

Mikasova ve ark. (2005), hayvan orijinli *Salmonella* Typhimurium suşlarını amplified fragment length polymorphism (AFLP) ve PCR-faj tiplendirme metotlarıyla tiplendirmişlerdir. Her iki moleküler tiplendirme metodunun uygulanabilir olduğunu ve ayrıca AFLP'nin daha yüksek ayırma gücüne sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Myint ve ark. (2006), çiğ tavuk etlerinde doğal *Salmonella* kontaminasyonunu belirlemek için iki ayrı selektif zenginleştirme besiyeri ve PCR yöntemini karşılaştırmışlardır. TPS-TT hajna ile 90 örneğin 25 (%28)'inde, TPS-RV ile 20 (%22)'sinde *Salmonella* tespit etmişlerdir. TPS-TT hajna ve TPS-RV kombinasyonlarından sonra pozitif örneklerle uygulanan PCR yönteminin %100 duyarlılığa sahip olduğunu; pozitif örneklerin ön zenginleştirme aşamasından sonra yapılan PCR'nın duyarlılığının %85, ön zenginleştirme yapılmayan örneklerde ise PCR'ın tespitte başarısız olduğunu rapor etmişlerdir.

Cortez ve ark. (2006), tavuk kesimhanelerinden dışkı, tüy, iç organ, haşlama suyu, soğutma suyu ve karkas gibi materyallerden *Salmonella* izole etmişler ve izole ettikleri suşlara m-PCR uygulamışlardır. Toplam 288 örneğin 52'sinden *Salmonella* izole ederlerken, bunun 29 (%10)'unu *Salmonella* spp., 16 (%5,6)'sını *Salmonella* Enteritidis ve 7'sini *Salmonella* Typhimurium olarak tanımlamışlardır.

Fakhr ve ark. (2006), doğal kontamine hindi etlerinden *Salmonella* saptanmasında real-time PCR, immunnocapture assay RapidCheck ve konvansiyonel kültür metodunu karşılaştırmışlardır. Real-time PCR ile ön zenginleştirme aşamasından sonra 99 örneğin 56'sını, selektif zenginleştirme aşamasından sonra da 66'sını *Salmonella* yönünden pozitif bulurken, konvansiyonel kültür metodu ile 49'unu, immunnocapture assay RapidCheck metodu ile de 38'ini pozitif bulmuşlardır.

Salmonella'ların işletmelere giriş kaynaklarının farklılığı ve çokluğu nedeniyle, birçok faktör içeren iyi planlanmış programlar uygulanmalıdır. Yumurta, civciv veya

tavuklar *Salmonella* ari damızlık kümeslerden alınmalıdır. Kümeslerde rutin olarak temizlik ve dezenfeksiyon yapılması, rodent ve insekt kontrolleri, hasta ve portör hayvanların belirlenmesi ve ayıklanması, yem ve su kalitesinin ayarlanması gibi birçok faktör koruma ve kontrolün temelini oluşturmaktadır. *Salmonella* enfeksiyonlarıyla mücadelede ilaç uygulamalarına ek olarak yarışla dışlama (competitive exclusion, CE) kültürleri veya aşı uygulanabilmektedir. 9R apatojenik *Salmonella* Gallinarum suşu ile hazırlanmış aşılardan *Salmonella* Gallinarum kontrolünde başarı sağlandığı rapor edilmiştir (Arda ve ark., 1983a).

Salmonella'nın eliminasyonu ve kontrol önlemleri etkili şekilde temizlik ve dezenfeksiyon ile gerçekleştirilir. İngiltere'de yumurtacı sürülerinde sürekli *Salmonella* kontaminasyonu görülmekte ve *Salmonella* Enteritidis ile kontamine vektörler ilişkilendirilmektedir (Wales ve ark., 2006).

Salmonella'lar %1 sodyum hipoklorid, %70 etanol, %2 gluteraldehit, iyot, fenol ve formaldehit içeren çoğu dezenfektanlara karşı duyarlıdır (Anon., 2005). Davison ve ark. (1996), fenol, kuarternar amonyum, klorin, gluteraldehit ve kuarternar amonyum-formaldehit kombinasyonu olmak üzere beş adet dezenfektanın *Salmonella* Enteritidis üzerine etkisini araştırmışlar ve fenol, kuarternar amonyum ve kuarternar amonyum ile formaldehit kombinasyonunun daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Tosun ve Tamer (2000), daldırmalı soğutma işleminin kanatlı karkaslarının mikrobiyal kalitesine ve *Salmonella*'nın çapraz bulaşmasına etkilerini incelenmişler; daldırmalı soğutma işlemiyle koliform ve *Escherichia coli* düzeylerinin önemli ölçüde azaldığını, fakat *Salmonella* içeren karkas sayısını artırdığını rapor etmişlerdir. Kanatlı karkaslarında *Salmonella*'nın eliminasyonunda ve işlenmiş karkasların raf ömrünün uzatılmasında laktik asitin kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, çeşitli hayvan dışkılarından *Salmonella* etkenlerinin varlığının araştırılması ve izole edilen etkenlerin PCR ile doğrulanması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.GEREÇ

2.1.1. Kloakal Svap ve Dışkı Örnekleri

Salmonella izolasyonu amacıyla; Ağustos 2005-Kasım 2006 tarihleri arasında Ankara ve Bolu civarındaki kanatlı kesimhanelerinden 109 tavuk sürüsünden toplanan 3880 adet kloakal svaptan hazırlanan 388 örnek (10 kloakal svap 1 örnek), Kazan mezbahası ve çeşitli küçük işletmelere ait 27 koyun sürüsünden 107 ve sığırlardan ise 106 adet dışkı toplanmış olup toplam 601 adet örnek incelendi.

Tavuk sürülerine ait örnekler, kesim öncesi steril kuru svapla kloakadan alındı. Alınan örnekler aynı gün içinde laboratuvara getirilerek *Salmonella* izolasyon çalışmalarına başlandı. Kesimhanelerden alınan toplam 109 sürüye ait örneklerin sayısı ve bu sürülere ait bazı özellikler Çizelge 2.1 de gösterilmiştir. Örnekler, Martin ve ark. (1992) tarafından tanımlanan örnekleme yöntemine göre alındı.

Çizelge 2.1. Materyal alınan tavuk sürülerine ait bazı özellikler ve örnek sayıları.

Sürü Numarası	Kümes Orijini	Yaş (Gün)	Kümes Kapasitesi	Alınan Örnek Sayısı
1	ESKİŞEHİR-Günyüzü	42	12800	60
2	ESKİŞEHİR-Günyüzü	42	7784	40
3	AFYON-Sultandağı	43	6700	40
4	AFYON-Sultandağı	43	9632	50
5	ANKARA-K.Hamam	43	7623	40
6	AFYON-Sultandağı	43	7300	40
7	ANKARA-Polatlı	42	13000	70
8	ANKARA-Polatlı	42	8900	40

Çizelge 2.1. Devamı, materyal alınan tavuk sürülerine ait bazı özellikler ve örnek sayıları.

9	ANKARA-Polatlı	40	2250	10
10	ANKARA-Polatlı	40	2000	10
11	ESKİŞEHİR-Günyüzü	42	8000	40
12	KONYA-Akşehir	45	7600	40
13	ESKİŞEHİR-Günyüzü	41	4664	30
14	AFYON-Sultandağı	44	8206	40
15	KONYA-Akşehir	45	2500	20
16	ESKİŞEHİR-Günyüzü	46	5088	30
17	ANKARA-Elmadağ	40	4700	30
18	ANKARA-K.Hamam	46	9688	50
19	ANKARA-Elmadağ	47	10824	50
20	AFYON-Sultandağı	46	14112	70
21	AFYON-Sultandağı	46	6040	30
22	ESKİŞEHİR-Günyüzü	43	4000	20
23	ANKARA- Kazan	46	16780	80
24	ANKARA - Çubuk	45	2940	20
25	ESKİŞEHİR-Günyüzü	41	3000	20
26	ESKİŞEHİR-Günyüzü	41	3200	20
27	ANKARA-K.Hamam	47	9086	50
28	ESKİŞEHİR-Günyüzü	43	3700	20
29	ANKARA-Kazan	45	17848	90
30	ANKARA-Çubuk	46	11792	60
31	ANKARA-Çubuk	46	2400	10
32	ÇANKIRI	43	2900	20
33	AFYON-Sultandağı	45	10036	50
34	ESKİŞEHİR-Günyüzü	46	12800	70
35	ANKARA- Kazan	39	2240	10
36	AFYON-Sultandağı	39	2880	20
37	AFYON-Sultandağı	47	11000	60
38	ANKARA-Elmadağ	40	3500	20
39	ANKARA-K.Hamam	44	6500	40
40	ANKARA-K.Hamam	44	7700	40

Çizelge 2.1. Devamı, materyal alınan tavuk sürülerine ait bazı özellikler ve örnek sayıları.

41	AFYON-Sultandağı	43	9200	50
42	ANKARA-Polatlı	39	2700	20
43	ANKARA- Beypazarı	46	13100	70
44	ANKARA-Polatlı	39	2600	20
45	AFYON-Sultandağı	45	9850	50
46	ANKARA-K.Hamam	44	7600	40
47	ANKARA- Kazan	45	6650	40
48	ANKARA- Kazan	45	3464	20
49	ÇANKIRI- Eldivan	43	3000	20
50	ÇANKIRI- Eldivan	43	10600	50
51	ANKARA-Polatlı	45	14100	70
52	ÇANKIRI	44	7900	40
53	ANKARA-K.Hamam	43	3000	20
54	ANKARA- Kazan	43	9100	50
55	ANKARA-Polatlı	45	13200	70
56	ANKARA-Polatlı	45	3240	20
57	ANKARA-Elmadağ	38	3016	20
58	ÇANKIRI- Eldivan	41	13400	70
59	ÇANKIRI- Eldivan	41	2688	20
60	ANKARA-K.Hamam	44	6700	40
61	ANKARA-K.Hamam	43	5200	30
62	KONYA- Akşehir	39	7900	40
63	ÇANKIRI- Tünay	42	9545	50
64	KONYA- Akşehir	39	7600	40
65	KONYA- Akşehir	39	5088	30
66	ANKARA-Polatlı	40	3240	20
67	ANKARA- Polatlı	48	18000	90
68	AFYON-Sultandağı	47	8130	40
69	AFYON-Sultandağı	41	2464	10
70	AFYON-Sultandağı	41	2200	10
71	ANKARA- Beypazarı	41	4240	20
72	ANKARA-Polatlı	48	8400	40

Çizelge 2.1. Devamı, materyal alınan tavuk sürülerine ait bazı özellikler ve örnek sayıları.

73	ANKARA-K.Hamam	45	1792	10
74	ANKARA-Polatlı	48	7450	40
75	ANKARA-K.Hamam	44	8100	40
76	ANKARA-K.Hamam	44	4100	20
77	ANKARA-Hasanoğlu	44	4200	20
78	ANKARA-Bala	45	3900	20
79	ANKARA-Polatlı	44	3400	20
80	ANKARA-K.Hamam	45	3600	20
81	BOLU	46	4000	20
82	BOLU	46	2200	10
83	BOLU	44	2400	10
84	BOLU	42	8000	40
85	BOLU	40	7800	40
86	BOLU	42	7200	40
87	BOLU	42	7750	40
88	BOLU	42	5200	30
89	BOLU	43	7150	40
90	BOLU	44	4120	20
91	BOLU	44	4322	20
92	BOLU	47	3210	20
93	BOLU	44	7808	40
94	BOLU	44	5210	30
95	BOLU	43	7652	40
96	BOLU	43	7600	40
97	BOLU	46	3700	20
98	ANKARA -K.Hamam	43	6056	30
99	ANKARA -K.Hamam	45	2200	10
100	ANKARA -Hasanoğlu	47	11000	60
101	AFYON-Sultandağı	47	2950	20
102	AFYON-Sultandağı	46	5700	30
103	ANKARA -Bala	43	6650	40

Çizelge 2.1. Devamı, materyal alınan tavuk sürülerine ait bazı özellikler ve örnek sayıları.

104	ANKARA -Polatlı	42	4250	20
105	ANKARA -K.Hamam	42	9600	50
106	ANKARA -K.Hamam	44	9850	50
107	ANKARA -Kazan	41	4900	30
108	ANKARA- Mamak	44	6000	30
109	AFYON-Sultandağı	41	9700	50
	TOPLAM		731.548	3.880

Kazan mezbahası, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi uygulama çiftliği ve 3 köyden sağlıklı sığır ve koyunlara ait dışkı örnekleri steril dışkı kaplarına alındı ve soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı. Dışkı örneklerinin alındığı yerler ve örnek sayıları Çizelge 2.2 ve 2.3 de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Sığır dışkı örneklerinin alındığı bölge ve örnek sayıları.

Örneklerin Alındığı Bölgeler	Örnek Sayısı
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Uygulama Çiftliği	10
Kazan Mezbahası	63
Çağabey Köyü- Ayaş	9
Akkaya Köyü- Ayaş	13
Saray Köyü- Kazan	11
TOPLAM	106

Çizelge 2.3. Koyun dışkı örneklerinin alındığı bölge ve örnek sayıları.

Örneklerin Alındığı Bölgeler	Sürü Sayısı	Hayvan Sayısı	Alınan Örnek Sayısı
Ankara Üniversitesi Veteriner Fak. Uygulama Çiftliği	1	35	2
Kazan Mezbahası	15	2190	70
Çağabey köyü- Ayaş	4	450	14
Akkaya köyü- Ayaş	3	270	9
Saray köyü	4	370	12
TOPLAM	27	3315	107

2.1.2. Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler

İzolasyon, biyokimyasal testler ve PCR için aşağıda sıralanan besiyerleri ve kimyasal maddeler kullanıldı.

Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS) (MERCK, 107228)

Tetrathionat broth (TTB) (LAB M, LAB-97)

Xylose Lysine Tergitol 4 (XLT4) agar (MERCK, 113919)

Nutrient Broth (NB) (MERCK, 105443)

Nutrient Agar (NA) (MERCK, 105450)

Kligler Iron Agar (LAB M, 077785/257)

Pepton (BD, 211677)

Neopepton (BD, 211681)

Mannitol (MERCK, 3167286)

Agar (MERCK, 101613)

Potasyum Nitrat (AppliChem, 7757-79-1)

Fenol Red (AppliChem, 143-74-8)

Di Potasyum Hidrojen Fosfat (K_2HPO_4) (AppliChem, 16788-57-1)

Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4) (MERCK, 4871)

L- triptofan (MERCK, 108374)

Sodyum chloride (AppliChem, 7647-14-5)

Etanol (%95'lik) (MERCK, 100986)

Urea (MERCK, 108487)

Sodium hydroxide (NaOH) (MERCK, Art.6462)

Cloroform (MERCK, K4361731)

L-fenilalanin (MERCK, 107256)

Iron(III) chloride-solution ($FeCl_3$)(AppliChem, A3542)

2-Nitrophenyl-B-D-galactopyranoside (ONPG) (AppliChem, 369-07-3)

Cellulose Acetate Membrane (0,22 μm) (Orange Scientific, 1520014)

Kovacs (MERCK, 109293)

Oxidase (MERCK, 113300)

Metyl red (AppliChem, 493-52-7)

Ninhydrin (AppliChem, 485-47-2)

Tris Borat Edta (TBE) (AppliChem, A0972)
 Taq DNA Polimeraz (12406, Fermentas, Lithuania)
 10X Buffer (19111, Fermentas, Lithuania)
 25 mM MgCl₂ (19112, Fermentas, Lithuania)
 Primer-1 (22 baz) Primer-2 (21 baz) (C61813, C61817, Fermentas, Lithuania)
 25 mM dNTP set (9001, Fermentas, Lithuania)
 DNA marker (100 bp) (SM0241, Fermentas, Lithuania)
 Agarose (prona agarose, basica le) (091629PR, Fermentas, Lithuania)
 Etidyum bromür (Fermentas, Lithuania)
 Ticari kit (K0512, Fermentas, Lithuania)
 6Xloadingdye (RO611, Fermentas, Lithuania)

2.1.3. Kullanılan Cihaz ve Gereç Listesi

DNA Thermal Cycler (Biyometra, Germany)
 Elektroforez tankı ve güç kaynağı (Wealtec elite 3000 plus USA)
 UV transillüminatörlü bilgisayarlı jel dokümantasyon sistemi (Gene, Genius, B10 Imaging, system, England)
 Steril laminar akımlı güvenlik kabini (Bioair Instruments, Aura 2000, MAC, Italy)
 Termal printer (Sony, Japan)
 Santrifüj (Hettich, Germany)
 Vortex (Fine Vorex, Kore)
 Hassas terazi (Scaltec sbc41, Germany)
 Derin dondurucu (-20°C)(Bosch,Germany)
 Etüv (EN120, Nüve,Türkiye)
 pH metre (RL150, USA)
 Otoklav (OT4060, Nüve, Türkiye)

2.1.4. Antiserumlar

İzole edilen etkenlerin serotiplendirilmesinde *Salmonella* Polyvalan “O” Antiserumu ve Grup Spesifik Antiserumlar (Statens Serum Institut, Danimarka) kullanıldı.

2.1.5. Standart Suş

İzolasyon, identifikasyon ve PCR aşamalarında kontrol suşu olarak *Salmonella* Enteritidis (Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü) kullanıldı.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Örnek Hazırlanması

2.2.1.1. Kloakal Svapların Hazırlanması

Tavuk sürülerinden steril kuru svapla kloakadan alınan 10 svap bir örnek teşkil edecek şekilde steril bir makasla uçları kesilerek, 50 ml TPS solusyonu içeren steril erlenmayer içerisine bırakıldı. Her örnek hazırlanmasından sonra, örnekler arasında kontaminasyonu önlemek amacıyla, makaslar %70'lik alkol ile alevde sterilize edildi (Fricker, 1987; Jouy ve ark., 2005).

2.2.1.2. Dışkıların Hazırlanması

Sığır ve koyunlarda alınan dışkı örnekleri steril dışkı kapları içerisinde laboratuvara ulaştırıldıktan sonra 50 ml TPS solusyonu içeren steril erlenmayer içerisine 5 gram dışkı konularak vortekslendi (Gebreyes ve ark., 2000; Pao ve ark., 2005).

2.2.1.3. PCR İçin Örnekler

PCR'da kullanılmak üzere zenginleştirme basamağı olan tetrasyonat kültürlerinden 1'er ml ependorf tüplerine alınarak, -20 °C'de saklandı (Makino ve ark., 1999; Çarlı ve ark., 2001b).

2.2.1.4. Besiyerlerin Hazırlanması

İzolasyon amacı ile kullanılan besiyerleri üretici firmaların belirttiği formülasyona göre hazırlandı. Biyokimyasal testler için *Salmonella*'ların biyokimyasal karakterizasyonu için Norveç üçlü tüp metodu uygulandı. Bu metodun prensibi üç besiyeri tüpünde 13 biyokimyasal testin yapılmasıdır. Glikoz, laktoz, H₂S ve gaz testleri için tüp I, mannitol–mobilité testleri için yarı katı besiyeri tüp II, üreaz ve indol aktivitesini tespit etmek için sıvı bir besiyeri olan tüp III hazırlandı (Lassen, 1975; Bekar, 1997).

Tüp I Kligler Iron Agar, üretici firmanın belirttiği formülasyona göre hazırlandı.

Tüp II besiyerinin hazırlanması:

Pepton	0,5 g
Neopepton	0,5 g
Mannitol	0,2 g
Agar	0,25 g
Potasyum Nitrat	0,17 g
Fenol Red(%0,2'lik)	2 ml
Distile su	100 ml

Karışım kaynatılıp eritildikten sonra 5-6 ml miktarda tüplere dağıtılarak 121 °C de 15 dakika otoklavda sterilize edildi (Lassen, 1975; Bekar, 1997).

Tüp III besiyerinin hazırlanması:

L-triptofan	0,3 g
Dipotasyum Hidrojen Fosfat	0,1 g
Potasyum Dihidrojen Fosfat	0,1 g
Sodyum Klorür	0,5 g
Üre	2 g
Etanol (%95'lik)	1 ml
Fenol Red(%0,2'lik)	1,25 ml
Distile su	100 ml

Karışım iyice karıştırıldıktan sonra 0,22 µm'lik filtre ile steril edilerek 0,8–0,9 ml miktarda steril tüplere dağıtıldı (Lassen, 1975; Bekar, 1997).

2.2.2. İzolasyon

Hayvanlara ait dışkı ve svap örneklerinde *Salmonella* izolasyonu ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme ve selektif besiyerlerine ekim şeklinde gerçekleştirildi. TPS (50 ml) içerisine konulan svap ve dışkı örnekleri 37 °C'de 24 saat inkubasyona bırakılarak ön zenginleştirme işlemi yapıldı. TPS kültürlerinden 0,1 ml alınarak, 10 ml'lik TTB'a inokule edildi ve 41,5 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, TTB'dan iki öze dolusu kültür alınarak XLT4 agara tek koloni düşecek tarzda ekimler yapıldı ve petri kutuları 37 °C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra siyah ya da siyah merkezli pembe-kırmızı koloniler ile H₂S negatif pembesi sarı koloniler *Salmonella* şüpheli bulunarak değerlendirmeye alındı (Makino ve ark., 1999; Gebreyes ve ark., 2000; Jouy ve ark., 2005).

2.2.3. İdentifikasyon

2.2.3.1. Biyokimyasal Testler

XLT4 agarda *Salmonella* şüpheli bulunan kolonilerden bir koloni saf olarak alınarak Nutrient broth'a inokule edildi ve 37 °C' de 18 saat inkubasyona bırakıldı. Nutrient broth kültüründen Nutrient agara tek koloni düşecek şekilde ekim yapıldı. Nutrient agarda saf kültürleri hazırlanan mikroorganizmalardan oksidaz testi negatif olanların biyokimyasal testleri yapıldı. NB'den alınan bir öze dolusu bakteri kültürü I nolu tüpteki besiyerinin eğik yüzeyine yayıldıktan sonra öze besiyerinin kenarından tüp dibine kadar batırılıp çekildi. Ayrıca, bir öze dolusu kültür II nolu tüpteki yarı katı besiyerinin ortasından aşağı doğru dikey olarak ekildi ve yine bu kültürden 3-4 damla III nolu üre-indol besiyerine geçildi ve üç besiyeri tüpü de 37 °C' de 24 saat inkubasyona bırakıldı. Onüç testin 8'i üç tüpde doğrudan değerlendirilirken diğer 5 testin uygulanması için ilave kimyasal maddeler kullanıldı (Lassen, 1975; Bekar, 1997).

Tüp 1’de glikoz ve laktoz fermentasyonu, gaz ve H₂S oluşumu, lizin dekarboksilasyonu, fenilalanin deaminaz ve ONPG testleri değerlendirildi (Lassen, 1975; Bekar, 1997).

Tüp 2’de mannitol fermentasyonu, hareket ve nitrat redüksiyonu testlerinin sonuçları değerlendirildi (Lassen, 1975; Bekar, 1997).

Tüp 3’de üreaz oluşumu, indol reaksiyonu ve triptofan deaminaz deneyi uygulandı ve sonuçları değerlendirildi (Lassen, 1975; Bekar, 1997).

2.2.3.2. Serolojik Testler

Biyokimyasal testler sonucu *Salmonella* şüpheli olarak kabul edilen mikroorganizmalara polyvalan “O” antiserumu ile bakılıp, aglütinasyon veren örnekler pozitif olarak değerlendirildi. Polyvalan “O” antiserumu ile aglütinasyon veren örneklerin *Salmonella* Grup Spesifik antiserumlarla aglütinasyon verip vermedikleri araştırıldı (Ouinn ve ark., 1994).

2.2.4. Polimerase Chain Reaction (PCR)

PCR işlemi, *Salmonella* pozitifliği saptanan örneklerde izolasyon aşamasında kullanılan tetrasyonat kültürlerinde bu etkenlerinin varlığını araştırmak amacıyla yapıldı. PCR işlemi, DNA ekstraksiyonu, amplifikasyon, elektroforez ve görüntüleme olmak üzere dört aşamada gerçekleştirildi.

2.2.4.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için, ön çalışmada kaynatma yöntemi ve bir ticari kit denendi.

Kaynatma Yöntemi: Kaynatma yönteminde, -20 °C’de saklanan 1 ml’lik hacimdeki tetrasyonat besiyerleri çözdürüldükten sonra vortekslenerek 2500 x g’de 4 dk. santrifuj edildi. Supernatant dökülerek peletin üzerine 500 µl steril distile su

eklenerek vortekslendi ve santrifuj eklenerek yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Sonuncu yıkama işlemini takiben supernatant atılarak 100 µl steril distile su içerisinde pelet süspanse edildi. Örnekler PCR tüplerine aktarılarak 10 dk. 99 °C’de tutularak kaynatma işlemi yapıldı (Schrank ve ark., 2001). Kaynatma işleminin ardından örnekler yukarıda belirtilen koşullarda santrifuj edilerek supernatant PCR testinde DNA olarak kullanıldı.

Ticari Kit ile DNA Ekstraksiyonu: Ekstraksiyon üretici firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirildi.

- 200 µl tetrathionat kültürü 400 µl lizis solüsyonu ile karıştırıldı ve 65 °C’de 5 dakika inkube edildi.
- 600 µl kloroform ilave edilerek karıştırıldı ve 10000 rpm’de 2 dakika santrifuj edildi.
- Presipitasyon solüsyonu, 720 µl steril distile su ile 80 µl 10x konsantre solüsyonu ile karıştırılarak hazırlandı.
- Santrifüjden sonra üsteki sıvı kısım yeni bir tüpe aktarılarak 800 µl presipitasyon solüsyonu ilave edildi ve 10000 rpm’de 2 dakika santrifuj edildi.
- Üsteki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, pelete 100 µl 1,2 M NaCl ilave edilerek vortekslendi.
- 300 µl soğuk etanol ilave edilerek 10 dakika -20 °C’de DNA’nın presipitasyonu sağlandı ve 10000 rpm’de 3 dakika santrifuj edildi. Üsteki etanol dökülerek pelet % 70’lik soğuk etanol ile yıkandı ve DNA 100 µl steril distile suda çözdürülerek iyice karıştırıldı.

2.2.4.2. PCR Karışımının Hazırlanması

Bu çalışmada Baumler ve ark. (1997)’nın belirttiği *iroB* genine spesifik primerler ticari olarak sentezletirildi (Fermentas). Primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir.

Primer 1: 5’-TGCGTATTCTGTTTGTCGGTCC-3’

Primer 2: 5'- TACGTTCCCACCATTCTTCCC-3'

PCR Karışımı, her bir örnek için;

10 x PCR tamponu, 2,5 µl

MgCl₂, 2mM

dNTP (10 mM), 200 µM

Primer I, 10 pmol

Primer II, 10 pmol

Taq DNA Polimeraz, 1U olacak şekilde distile su ile 23 µl'lik hacme tamamlanarak hazırlandı.

Bu ana karışımdan 23'er µl dağıtıldı ve her tüpe 2 µl örnek DNA'sı eklenerek toplam reaksiyon hacmi 25 µl'ye tamamlandı. Bu karışıma göre hazırlanan örnekler çoğaltma için önceden programlanmış thermal cycler cihazına yerleştirildi. Örneklerin hazırlanması sırasındaki hata ve kontaminasyonları belirlemek için pozitif ve tepkime karışımında kalıp DNA'nın yerine distile su negatif kontrol olarak kullanıldı.

2.2.4.3. DNA Amplifikasyonu

Amplifikasyon işlemi Baumler ve ark. (1997)'nin belirttiği protokole göre uygulandı. Hedef DNA başlangıçta, 94 °C'de 3 dakika bekletilerek denature edildi. Bu aşamadan sonra;

94 °C'de 40 saniye denaturasyon

55 °C'de 40 saniye primer bağlanması

72 °C'de 40 saniye primerlerden yeni DNA zincirinin sentezlenmesi

olmak üzere toplam 30 döngü yapıldı. En son aşamada 72 °C'de 7 dakika bekletilerek reaksiyon tamamlandı. Amplifikasyon sonrasında reaksiyon tüpleri değerlendirme aşamasına kadar +4 °C'de bekletildi.

2.2.4.4. Agaroz Jel Elektroforez

Agaroz Jelin Hazırlanması

Amplifikasyon sonrasında oluşan ürünlerin değerlendirilmesi için %1,5 luk agaroz jel hazırlandı. Agaroz jel hazırlanırken tampon solüsyon olarak 0,5 TBE tamponu kullanıldı. Agaroz 200 ml TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritildikten sonra, 10 µl ethidium bromid ilave edilerek, 20 cm'lik yatay jel elektroforez tablasına döküldü. 5 mm kalınlığında dökülen agaroz üzerine elektroforez tırağı takılarak, jelin katılaşması için 20 dakika beklenildi. Bu süre sonunda taraklar jele zarar vermeden çıkartıldı (Sambrook ve ark., 1989).

Elektroforez İşlemi

Jel elektroforez tablası elektroforez tankına yerleştirildikten sonra, elektroforez tankının içerisine TBE tampon solüsyonu jelin 1 mm üstüne gelecek kadar ilave edildi. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinden 10 µl alınarak, 2 µl 6X loading dye ile karıştırıldı. Bu karışımın hepsi jele yüklendi. DNA örnekleri 160 voltta 70 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu (Sambrook ve ark., 1989).

2.2.4.5. Görüntüleme İşlemi

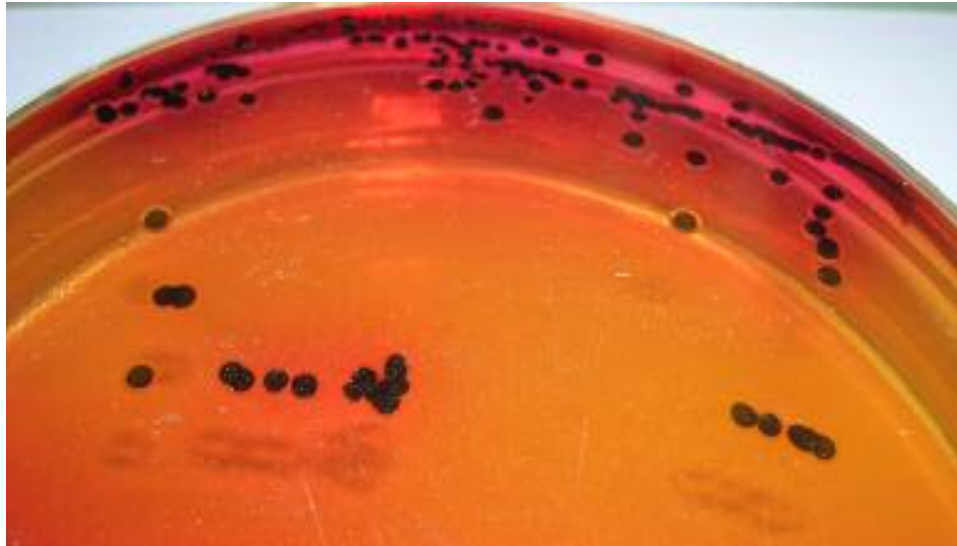
Jeldeki örnekler bilgisayarlı UV transillüminatör kutusu içine yerleştirilerek görüntülendi ve fotoğrafları çekilerek termal printerden kopyaları alındı.

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Tavuk örnekleri için Afyon, Ankara, Bolu, Çankırı, Eskişehir ve Konya illerinde yetiştirilen 109 sürüden toplanan 3880 adet kolakal svapdan oluşturulan 388 (aynı kümeden alınan 10 svap 1 örnek) adet örnek oluşturulmuş ve bu örneklerden yapılan ekimler sonucunda 64 adet örnekte *Salmonella* şüpheli koloni bulunarak, identifikasyon testlerine tabi tutuldu. XLT4 agar üzerinde üreyen, *Salmonella* şüpheli koloniler Resim 3.1 de gösterilmiştir.

Çalışmada, incelenen 109 broyler sürünün 11 (%10,09)'inden *Salmonella* izolasyonu yapıldı. Biyokimyasal testler sonucunda 11 sürüden toplam 12 adet *Salmonella* spp. identifiye edildi. *Salmonella* suşlarının biyokimyasal özellikleri Çizelge 3.1 de verilmiştir. Çalışmada, incelenen 388 adet örnekden izole edilen 12 (%3,09) adet *Salmonella* suşunun 9 (%75)'u B serogrubu, 3 (%25)'ü de D serogrubu olarak tespit edilmiştir. İzolasyon ve identifikasyonu yapılan *Salmonella* izolatlarının serogrupları Çizelge 3.2 de gösterilmiştir.



Resim 3.1. XLT4 agarda *Salmonella* şüpheli kolonilerinin görünümü.

Çizelge 3.1. Broyler sürülerine ait *Salmonella* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları.

Sürü- Örnek Numarası.	Oksidaz	Laktoz	Glukoz	H ₂ S	Gaz	ONPG	LDC	FAD	Mannitol	Hareket	Nitrat	Üreaz	İndol	TDA
1-2	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
10-1	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
14-2	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
14-3	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
38-2	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
57-1	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
71-1	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
75-2	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
84-1	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
103-1	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
104-2	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
106-2	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-

Çizelge 3.2. Broyler sürülerine ait *Salmonella* izolatlarının serogrupları ve bölgeleri.

Sürü Numaraları	Örnek Sayısı	İzolasyon Sayısı	Serogrup	Bölge
1	6	1	B	ESKİŞEHİR-Günyüzü
2-9	33	İY	-	
10	1	1	B	ANKARA-Polatlı
11-13	11	İY	-	
14	4	2	B	AFYON-Sultandağı
15-22	30	İY	-	
23-37	60	İY	-	
38	2	1	D	ANKARA-Elmadağ
39-56	73	İY	-	
57	2	1	B	ANKARA-Elmadağ
58-70	49	İY	-	
71	2	1	B	ANKARA- Beypazarı
72-74	9	İY	-	
75	4	1	B	ANKARA-K.Hamam
76-83	14	İY	-	
84	4	1	B	BOLU
85-102	57	İY	-	
103	4	1	D	ANKARA –Bala
104	2	1	D	ANKARA –Polatlı
105-	5	İY	-	
106	5	1	B	ANKARA -K.Hamam
107-109	11	İY	-	
TOPLAM	388	12		

İY: İzolasyon yok

Kazan mezbahası, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi uygulama çiftliği ve 3 köyden toplanan 106 adet sığır ve 27 sürüye ait 107 adet koyun dışkısı örneği incelendi. Sığırlardan toplanan 106 adet dışkı örneğinden yapılan ekimler sonucu 1 (%0,94) adet *Salmonella* izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen *Salmonella* suşunun biyokimyasal özellikleri Çizelge 3.3 de gösterilmiştir. Serogruplandırma işlemi

sonucunda bu izolatın B serogrubunda olduğu belirlendi. İncelenen koyun dışkı örneklerinden *Salmonella* izole edilemedi.

Salmonella izolasyon çalışmaları sırasında XLT4 agar üzerinde *Salmonella* şüpheli olarak değerlendirilen kolonilerin incelenmesi sonrasında, bazı kolonilerin *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. olduğu belirlendi.

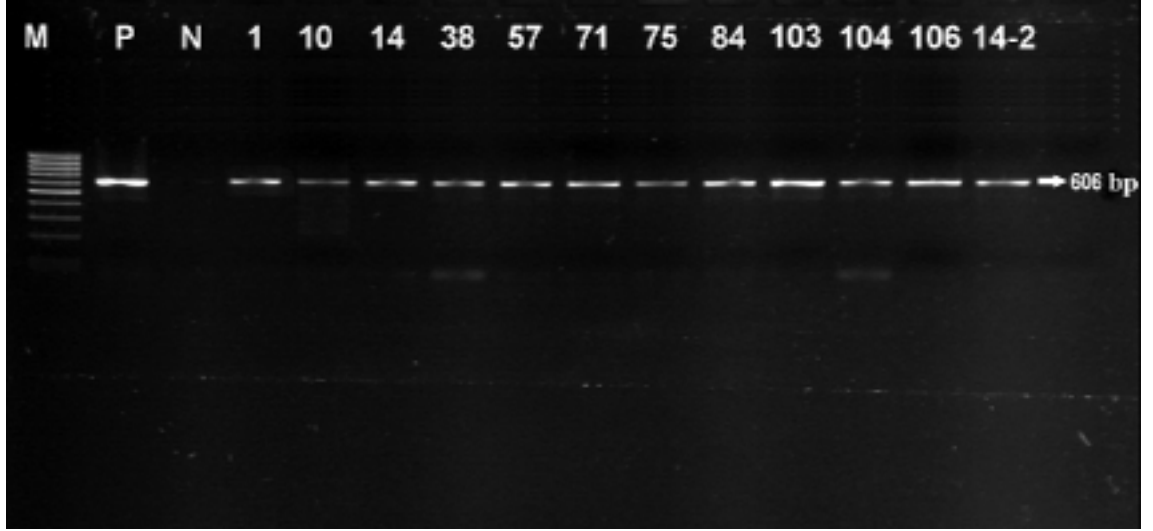
Çizelge 3.3. Sığır *Salmonella* izolatının biyokimyasal test sonuçları.

Yapılan Biyokimyasal Testler	Test Sonuçları
Oksidaz	-
Glukoz Fermantasyonu	+
Laktoz Fermantasyonu	-
H ₂ S Üretimi	+
Gaz	+
ONPG	-
Lizin Dekarboksilasyonu	+
Fenilalanin Deaminaz Testi	-
Mannitol Fermantasyonu	+
Hareket	+
Nitrat Redüksiyonu	+
Triptofan Deaminaz Testi	-
Üreaz Oluşumu	-
İndol Oluşumu	-

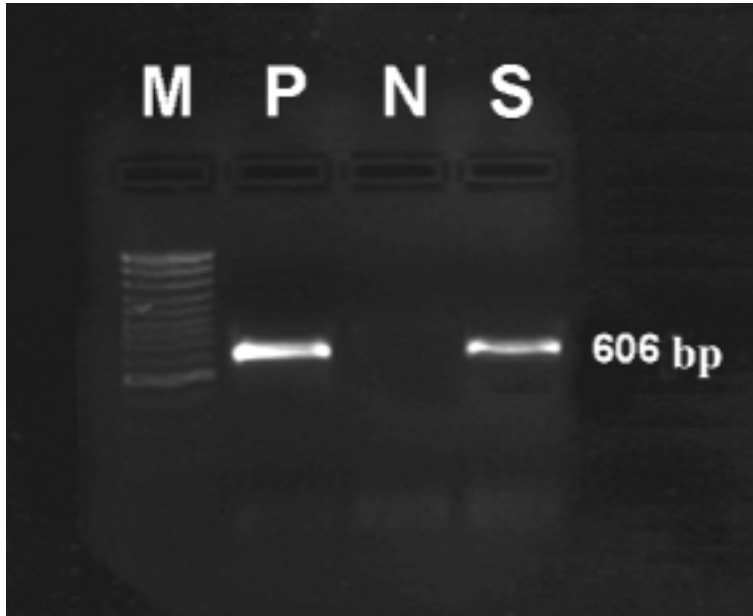
3.2. PCR Bulguları

DNA ekstraksiyonu için, ön çalışmada kaynatma yöntemi ve ticari kit denendi. Standardizasyonda ticari kitin daha iyi sonuç verdiği gözlemlendi. Biyokimyasal ve serolojik testler sonucunda *Salmonella* spp. olarak değerlendirilen izolatların elde edildiği 13 adet (kanatlı orijinli 12 adet ve sığır orijinli 1 adet) tetrasyonat kültürlerinden ticari kit kullanılarak DNA ekstraksiyonları yapıldı. PCR işlemi sonrasında gerçekleştirilen elektroforez işleminden sonra agaroz jeller UV

transilluminatör ile incelendi ve tüm örneklerde *Salmonella* cinsi için spesifik olan 606 bp bantlar görüldü (Resim 3.2 ve Resim 3.3). Bu sonuç, dışkılarda *Salmonella* varlığını araştırmada PCR yönteminin kullanılabilirliğini ortaya koydu.



Resim 3.2. Tavuk dışkılarından yapılan PCR bulguları (M: marker; P: pozitif kontrol; N: negatif kontrol; 1, 10, 14, 38, 57, 71, 75, 84, 103, 104, 106, 14-2: pozitif sürü numaraları).



Resim 3.3. Sığır dışkılarından yapılan PCR bulguları (M: marker; P: pozitif kontrol; N: negatif kontrol; S: pozitif sığır örneği).

4. TARTIŞMA

Salmonellozis, çok sayıda *Salmonella* serotipinin neden olduğu, insan ve tüm hayvan türlerinde görülebilen bir enfeksiyondur. *Salmonella* gıdalarda bulunan önemli bir patojendir ve gıda zehirlenmelerinin sıklıkla karşılaşılan etiyolojik ajanlarından biri olarak bilinmektedir. *Salmonella* serovar sayısının 2500'un üzerinde bulunması ve konakçı türlerinin çeşitliliği, hayvansal üretimde *Salmonella*'ların kontrolünü zorunlu kılmaktadır. (Mead ve ark., 1999; Anon., 2005).

Tavukların sindirim sisteminde *Salmonella* varlığını araştıran bir çok çalışma bulunmaktadır. Özellikle broylerlerde *Salmonella*'ların düşük düzeyde bile bulunması, kesimhanelerde çapraz bulaşmada önemli olmaktadır ve karkaslardan izolasyon oranı artmaktadır. Aksakal (2003), 400 adet tavuk kloakal svap örneğinden %7 oranında *Salmonella* spp. izole etmiştir. Eyigör ve ark. (2005), Ocak 2000 ve Haziran 2001 ile Haziran 2001 ve Kasım 2003 arasında yaptıkları çalışmalarında, tavuk örneklerinin sırasıyla % 4,10 ve % 5,52'sinde bakteriyolojik olarak *Salmonella* tespit etmişlerdir. Özbey ve Ertaş (2006), tavuk bağırsaklarının % 7,2'sinde *Salmonella* varlığını belirlemişlerdir. Eyigör ve ark. (2002), 47 kanatlı sürüsünden aldıkları 492 bağırsak homojenatı ve 27 svabın kültür ile 35 (%6,8)'ini *Salmonella* pozitif bulmuşlardır. Padungtod ve Kaneene (2006), Tayland'da 425 adet tavuk kloakal svap örneğinden %4 oranında *Salmonella* izole etmişlerdir. Carraminana ve ark. (2004), İspanya'da broyler dışkısında %6 oranında *Salmonella* saptamışlardır. Wedderkopp ve ark. (2001), Danimarka'da kloakal svap aldıkları 8911 broyler sürüsünün 490 (%5,5)'inden, Beli ve ark.(2001), Arnavutluk'da tavuklardan alınan 461 örneğin 30 (%6,5)'undan *Salmonella* izole edilmiştir. Çarlı ve ark. (2001a), 28 broyler sürüsünün 11 (%39,3)'inden *Salmonella* izolasyonu yaptıklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, örnek bazında değerlendirildiğinde elde edilen izolasyon oranı (%3,09), yukarıda belirtilen hem Türkiye'deki hem de yurt dışında yapılan çalışmalarda elde edilen izolasyon oranlarına göre düşük bulunmuştur. Sürü bazında ise, bulunan sonuç (%10,09), Wedderkopp ve ark.

(2001)'nın sürü bazında değerlerinden yüksek bulunurken, Çarlı ve ark. (2001a) tarafından yapılan çalışmada elde edilen bulgulardan düşüktür. Sürü ve örnek bazında elde edilen sonuçlar arasında oransal olarak farklılığın çıkma nedeni, örneklerin 10 swap örneğinin birleştirilerek incelenmesi ve *Salmonella* pozitifliğinin sürü içinde düşük düzeyde olması ile açıklanabilir. Yapılan diğer çalışmalarda sonuçların sadece tek swap olarak veya sürü bazında değerlendirilmesi nedeniyle bu çalışmada elde edilen bulguların diğer araştırıcı bulguları ile karşılaştırılması mümkün olamamıştır. Sürü bazında elde edilen sonuçlar ise, Wedderkopp ve ark. (2001)'nın elde ettiği bulgulara göre yüksek bulunurken, Türkiye'de Çarlı ve ark. (2001a)'nın sonuçlarına göre düşük bulunmuştur. Bu farklılığın genel olarak nedenleri, *Salmonella* pozitifliğinin bölge ve zaman farklılığı, örnekleme prosedürü, hayvanların kontaminasyon düzeyleri ve uygulanan metot farklılığından etkilenmesidir. Ayrıca, Türkiye'de entegrasyon modelinde yetiştirilen broylerlerde entegrasyondaki biyogüvenlik durumu ve entegrasyon içindeki bulaşma kaynakları da sonuçları etkileyebilmektedir. Sürü bazında elde edilen sonucun Çarlı ve ark. (2001a)'nın yaptığı çalışmaya göre düşük çıkması, araştırıcıların birincil zenginleştirme ve gecikmiş ikincil zenginleştirme yöntemleri uygulamaları ile de açıklanabilir. Bu çalışmada ise sadece birincil zenginleştirme metodu kullanılmıştır.

Kanatlılardan izole edilen *Salmonella* etkenlerinin serogrupları farklılık göstermektedir. Kalender ve Muz (1999), tavuklardan izole ettikleri toplam 57 *Salmonella* suşunun 53'ünü D₁ serogrubunda, 4'ünü B serogrubunda bulmuşlardır. Goncagül ve ark. (2005), 315 adet tavuk kanat etinin 27'sinden serogrup D, 30' unda da A, B, C, D serogruplarına ait olmayan ve tiplendirilemeyen *Salmonella* izole ettiklerini belirtmişlerdir. Kılınç ve Aydın (2006), kanatlılardan izole edilen 61 adet *Salmonella* spp.'nin %75,4'ünün D₁ serogrubunda, %24,6'sının B serogrubunda olduğunu belirtmişlerdir. Goncagül ve Çarlı (1999), 50 işletmeden aldıkları swapları *Salmonella* yönünden incelediklerinde 7 adet *Salmonella* Typhimurium, 6 adet *Salmonella* Enteritidis ve 5 adet *Salmonella* Gallinarum izole ettiklerini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, izole edilen 12 *Salmonella* suşunun 9 (%75)'u B serogrubu, 3 (%25)'ü de D serogrubu olarak tespit edilmiştir. Türkiye'de diğer araştırmacıların kanatlılarda yapmış oldukları çalışmalarda daha çok D serogrubuna ait suşlar izole edilirken, bu çalışmada ise daha çok B serogrubuna ait *Salmonella* izole edilmiştir. Serogrupların diğer çalışmalara göre farklı olması ve dominant olarak B grubu olması, *Salmonella* izolasyonu yapılan örneklerin bir entegrasyondan sağlanması ve bu entegrasyonda bulaşmanın bir kaynaktan olabileceğini düşündürdü. Ülkemizde entegrasyon düzeyinde *Salmonella* gibi enfeksiyonların broyler sürülerinde dağılımı etkileyen en önemli etkenlerden birisi, yem, kuluçka ve broyler kasaları gibi ortak kullanımda olan ekipman ve yemlerin bulaşmada etkin olmasıdır.

Salmonella etkenlerinin sığır dışkılarından izolasyonu ile ilgili çalışmalarda; Akbarut (1996) 119 sığır dışkı örneğini *Salmonella* yönünden incelemiş ancak *Salmonella* izole edememiştir. Çarlı ve ark (1991), Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği'ndeki 74 ineğin yalnızca 1 (% 1,35)'inin dışkısından *Salmonella* izolasyonu yaptıklarını belirtmişlerdir. Gökçen ve ark. (1995), 298 sığıra ait ince bağırsak içeriğini *Salmonella* yönünden incelediklerinde, bir sığıra ait ince bağırsak içeriğinden *Salmonella* Typhimurium izole etmişlerdir.

Padungtod ve Kaneene (2006), sığırlardan alınan 125 adet dışkı örneğinde %3 oranında *Salmonella* bulmuşlardır. Busato ve ark. (1999), 395 buzağının her birinden 3-4 fekal örnek alarak bakteriyolojik olarak incelemişler fakat hiç birinden *Salmonella* izole edememişlerdir. McEvoy ve ark. (2003), İrlanda'da sığır kesimhanelerinde kesilen sığırların dışkılarını *Salmonella* yönünden incelediklerinde, dışkıların %2'sinden *Salmonella* izole etmişlerdir. Fossler ve ark. (2005), New York, Michigan, Wisconsin ve Minnesota'da, 2000-2001 yıllarında yaptıkları çalışmalarında, 20,089 süt sığırının 1026 (%4,9)'sının dışkı örneğinden *Salmonella* saptamışlardır.

Bu çalışmada, sığırlardan toplanan 106 adet dışkı örneğinden yapılan ekimler sonucu 1 (%0,94) adet *Salmonella* izolasyonu yapılmıştır. Bu izolatin

serogruplandırması sonucunda B serogrubunda olduğu bulunmuştur. Elde edilen bulgular diğer araştırmacıların sonuçlarıyla oransal olarak benzerdir. Elde edilen bu düşük düzeyde izolasyon oranı, örnekleme yapılan hayvanların sağlıklı olması ve sindirim sistemi ile ilgili herhangi bir klinik bulgu olmaması ile açıklanabilir.

Woldemariam ve ark. (2005), sağlıklı 47 koyundan aldıkları dışkı örneklerini *Salmonella* yönünden incelemişler ve 1 adet dışkı örneğini (%2,1) *Salmonella* pozitif olarak saptamışlardır. Pao ve ark. (2005), Amerika’da test ettikleri 287 adet küçük ruminantın 17’sinin dışkısından *Salmonella* tespit etmişlerdir. Hjartardottir ve ark. (2002), İzlanda’nın değişik bölgelerindeki 50 çiftlikten 2592 adet gebe koyuna ait dışkıların hiç birinden *Salmonella* izolasyonu yapamadıklarını belirtmişlerdir.

Bu çalışmada 27 sürüye ait 107 adet koyun dışkısı örneği *Salmonella* yönünden incelenmiş; ancak, bunların hiç birinden *Salmonella* izolasyonu yapılamamıştır. İzolasyonun yapılamamasının nedenlerinden biri, etkenin dışkı ile aralıklı olarak çıkarılması, bir kez örnekleme yapılması ve sağlıklı görümlü hayvanlardan örnek alınması ile açıklanabilir.

Bağırsak içeriği ve kloakal svap örneklerinden *Salmonella* izolasyonunda farklı besiyerlerinin kullanıldığı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan en çok tercih edilen besiyeri TTB-XLT4 ve TTB-BGN kombinasyonlarıdır. Yapılan birçok araştırmada TTB-XLT4 kombinasyonunun TTB-BGN kombinasyonundan daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir (Çarlı ve ark., 2001a; Eyigör ve ark., 2002; Eyigör ve ark., 2005). Miller ve ark.(1991) 24 saat içerisinde XLT4 agarda siyah koloni oluşturma yeteneğindeki tek genusun *Salmonella* olduğunu ve XLT4 agarda *Salmonella*’nın diğer mikroorganizmalardan kolaylıkla ayrıldığını bildirmişlerdir. H₂S negatif suşların XLT4 agar pleytlerinde pembemsi sarı koloniler oluşturduklarını rapor etmişlerdir. Ayrıca, laboratuvarların çoğu selektif besiyerlerinden XLT4 agarı tercih ettiğinden dolayı bu çalışmada da *Salmonella* izolasyonunda TTB-XLT4 kombinasyonu uygulanmıştır.

Birçok ülkede optimize edilmiş bir bakteriyolojik sistem kadar güvenilir, fakat daha hızlı bir yöntem olan PCR-tabanlı testler kullanılmaya başlanmıştır. Bu testlerde temel olarak alınan örnek içinde *Salmonella* spesifik DNA segmenti aranmaktadır. Bu gen segmenti başka bir organizmada bulunmamaktadır (Chaudhuri ve ark., 1997; Satorov ve ark., 1998; Çarlı ve ark., 2001; Anon, 2004). PCR’de *Salmonella* DNA’sının yeterli miktarda olması için, numune içindeki *Salmonella* sayısının artırılması gerekmektedir. Böylece, ön zenginleştirmeden sonra PCR uygulamasıyla hızlı ve doğru olarak sonuca ulaşılacağı bildirilmiştir (Stone ve ark., 1994; Baumler ve ark., 1997; Feder ve ark., 2001; Anon., 2004). Birçok araştırmacı teşhis açısından PCR testi ile klasik kültür metodunu karşılaştırmışlar ve PCR’ın daha yüksek oranda *Salmonella* etkenlerini saptadığını bildirmişlerdir. Whyte ve ark. (2002), 40 broyler sürüsünden kültür metodu ile 32 (%16)’sini, PCR ile 38 (%19)’ini *Salmonella* yönünden pozitif bulmuşlardır. Soumet ve ark. (1999), m-PCR (%95) ile bakteriyolojik metottan (%92,5) daha yüksek duyarlılık elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Eyigör ve ark. (2002), 47 kanatlı sürüsünden aldıkları 519 adet örneğin, LigthCycler real-time PCR ve kültür ile sırasıyla 65 (%12,5) ve 35 (%6,8)’ini *Salmonella* pozitif bulmuşlardır. Fakhr ve ark. (2006), doğal kontamine 99 hindi et örneğinde real-time PCR ile 66’sını *Salmonella* yönünden pozitif bulurken, konvansiyonel kültür metodu ile 49’unu pozitif bulmuşlardır.

Bu çalışmada izolasyon yapılan örneklerin selektif zenginleştirme basamağından sonra kültüre paralel olarak PCR işlemi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, kültür sonuçlarıyla kıyaslandığında birebir uyumlu olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, özellikle çok sayıda materyalin işlendiği laboratuvarlarda, PCR işleminin *Salmonella* varlığını araştırmada kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. PCR işleminde pozitif bulunan örneklerin kültür ile doğrulanması hem laboratuvar manipulasyonlarını azaltmada hem de negatif bulunan örneklerle ilave işlemler yapılmaması açısından oldukça önemlidir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada, incelenen 109 broyler sürünün 11 (%10,09)'inden *Salmonella* izolasyonu yapılmıştır. Biyokimyasal testler sonucunda 11 sürüden toplam 12 adet *Salmonella* spp. identifiye edilmiştir. Sığırlardan ise toplanan 106 adet dışkı örneğinden yapılan ekimler sonucu 1 (%0,94) adet *Salmonella* izolasyonu yapılırken, 27 sürüye ait 107 adet koyun dışkısı örneğinin hiç birinden *Salmonella* izolasyonu yapılamamıştır. Bu çalışma bulguları değerlendirildiğinde, aşağıdaki sonuçlara ulaşılmış ve öneriler sunulmuştur.

- Broyler sürülerinin kloakal svap örneklerinde sürü bazında elde edilen %10,09'luk oran oldukça önemlidir. Bu sonuç, kesimhane işlemleri sırasında karkaslardaki pozitiflik oranını artırarak insanlar için potansiyel bir sağlık problemi oluşturabileceğini düşündürdü. Bu nedenle entegrasyon düzeyinde *Salmonella* varlığının devamlı olarak izlenerek, işletmeler için *Salmonella* kontrol programının uygulanması yararlı olacaktır. Ayrıca, konu ile ilgili geniş çaplı çalışmalar yapılması, konunun değerlendirilmesi ve kontrol önlemlerinin düzenlenmesi bakımından da önem arz etmektedir.
- İzole edilen *Salmonella* etkenlerinin çoğunun B grubu ve diğer bölümünün de D grubunda olması, insanlardaki enfeksiyonlardan izole edilen *Salmonella* serogrupları ile benzerliği dikkati çekti.
- Sığırlardan elde edilen düşük düzeydeki pozitiflik, konu ile ilgili çalışmaların arttırılması ve özellikle klinik olarak şüpheli hayvanlarda *Salmonella* varlığının araştırılması açısından önemlidir.
- Koyunlardan sağlanan örneklerde *Salmonella* izolasyonu yapılamamıştır. Bu sonuç, her ne kadar bu grup etkenlerin dağılımı ile ilgili bilgi vermesine karşın, daha detaylı çalışmaların yapılmasında yarar vardır.
- Dışkılarda *Salmonella* varlığının kültür yöntemi ile araştırılması önemli bilgiler sağlamaktadır. Ancak, bu yöntemin zaman alıcı olduğu da bir gerçektir. Bu nedenle, bu çalışmada ve diğer çalışmalarda elde edilen

bulgular birlikte değerlendirildiğinde, zenginleştirme basamağında PCR yönteminin uygulanması hem iř gücü hem de maliyet açısından bir avantaj sağlamaktadır. Çok sayıda örneğin işlendiği çalışmalarda/laboratuvarlarda PCR işleminin öncelikle uygulanması ve pozitif bulunan örneklere kültür işleminin yapılması standart yöntem olarak değerlendirilebilir.

ÖZET

Hayvan Dışkılarında *Salmonella* Etkenlerinin Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle Saptanması

Bu çalışmada, 109 tavuk sürüsüne ait 388 adet kloakal svap örneği (Afyon, Ankara, Bolu, Çankırı, Eskişehir ve Konya yörelerinden toplam 3880 kloakal svap), 27 koyun sürüsünden 107 adet (Kazan mezbahası, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi uygulama çiftliği ve 3 köyden) ve sığırlardan ise 106 adet dışkı (Kazan mezbahası, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi uygulama çiftliği ve 3 köyden) olmak üzere toplam 601 adet örnek *Salmonella* varlığı yönünden incelenmiştir.

İzolasyon çalışmalarında, ön zenginleştirme için Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS), selektif zenginleştirme için Tetrathionat broth (TTB) ve izolasyon için selektif besiyeri olan Xylose Lysine Tergitol 4 (XLT4) agar kullanılmıştır. *Salmonella* şüpheli bulunan kolonilerin identifikasyonu, biyokimyasal ve serolojik yöntemlerle gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, incelenen 109 broyler sürünün 11 (%10,09)'ünden *Salmonella* izolasyonu yapılmıştır. 3880 kloakal svaptan hazırlanan 388 (10 kloakal svap 1 örnek) adet örnekten identifiye edilen 12 (%3,09) adet *Salmonella* izolatının 9 (%75)'ü B serogrubu, 3 (%25)'ü de D serogrubu olarak tespit edilmiştir. Sığırlardan toplanan 106 adet dışkı örneğinden yapılan ekimler sonucu 1 (%0,94) adet B serogrubuna ait *Salmonella* izolasyonu yapılmıştır. 27 koyun sürüsüne ait 107 adet koyun dışkı örneğinden yapılan incelemede *Salmonella* tespit edilememiştir.

Biyokimyasal ve serolojik testler sonucunda *Salmonella* izole edilen örneklerin tetratiyonat buyyon kültürleri ile *IroB* gen spesifik primerlerle PCR gerçekleştirilmiş ve sonuçta kültür ile pozitif elde edilen tüm örneklerde *Salmonella* cinsine özgün 606 bp büyüklüğünde PCR ürünleri saptanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada, hayvan dışkılarından ve kloakal svaplardan *Salmonella* etkenlerinin kültür ile prevalansı saptanmıştır. Ayrıca, *Salmonella* izole edilen tüm örneklerin PCR yöntemi ile de benzer sonuç vermesi, PCR'nun *Salmonella* etkenlerinin dışkılarda araştırılmasında rutin teşhis amacıyla uygulanabilirliğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: İzolasyon, dışkı, hayvan, PCR, *Salmonella*.

SUMMARY

Detection of *Salmonella* strains from animal faeces by conventional and molecular methods

In this study, 388 cloacal swab samples (prepared from totally 3880 cloacal swabs) were collected from 109 poultry flocks from the region of Afyon, Ankara, Bolu, Çankırı, Eskişehir and Konya; 107 faecal samples were collected from 27 sheep herds from three villages and the Application Farm of Ankara University of Faculty of Veterinary Medicine; 106 bovine faecal samples were collected from the Kazan Slaughterhouse, three villages and the Application Farm of University of Ankara, Faculty of Veterinary Medicine. Total of 601 faecal samples of different animals were examined for the existence of *Salmonella* spp. in this study.

For the isolation of *Salmonella*, nonselective preenrichment by TPS was followed by selective enrichment by TTB and plating on selective agar XLT4. Suspect colonies were confirmed biochemically and serologically.

Salmonella was isolated in 11(10.09 %) of the 109 broiler flocks tested. Of the 12 (3.09 %) *Salmonella* strain identified from 388 (10 swabs/sample) poultry cloacal swap samples, 9 (75 %) were detected as serogroup B, and 3(25 %) were detected as serogroup D. From the total of 106 bovine faecal samples, 1 (0.94 %) was isolated as *Salmonella* serogroup B. *Salmonella* was not isolated from 107 sheep faecal samples collected from 27 sheep herds.

Isolates taken from tetrathionate cultures and determined as *Salmonella* spp. after biochemical and serological tests were also tested by PCR with primers specifically amplifying 606 bp portion of *iroB* gene. In all of the *Salmonella* positive cultures *Salmonella* spp. specific PCR products were detected.

In this study, prevalence of *Salmonella* strains in animal faecal and cloacal swab samples was determined by using conventional technique. As a result, PCR technique is found to be useful for routine examinations of *Salmonella* in animal faecal samples since all *Salmonella* spp. isolated samples were confirmed by PCR.

Key Words: Animal, isolation, faeces, PCR, *Salmonella*.

KAYNAKLAR

- AKBARUT (1996) Bursa bölgesindeki sığırlardan izole edilen *Salmonella* türleri üzerine bakteriyolojik ve serolojik çalışmalar. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji ABD.
- AKSAKAL (2003) Bazı kanatlıların dışkılarında *Salmonella* türlerinin varlığı ve yaygınlığı ile antibiyotiklere duyarlılıkları. *YYÜ. Vet. Fak. Derg.*, **14**: 95-101.
- ALTAY, G., YARDIMCI, H. (2001) Tavuklarda *Salmonella Enteritidis* Antikorlarının Serum ve Yumurta Sarısında ELISA ile Saptanması. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, **25**: 983- 988.
- ALVSEIKE, O., SKJERVE, E. (2002) Prevalence of a *Salmonella* subspecies *diarizonae* in Norwegian sheep herds. *Prev. Vet. Med.*, **52**: 277-285.
- AMAVISIT, P., BROWNING, G.F., LIGHTFOOT, D., CHURCH, S., ANDERSON, G.A., WHITHEAR, K.G., MARKHAM, P.F. (2000) Rapid PCR detection of *Salmonella* in horse faecal samples. *Vet. Microbiol.*, **79**: 63-74.
- ANDREWS, W.H., JUNE, G.A., SHERROD, P.S., HAMMACK, T.S., AMAGUANA, R.M. (1998) *Salmonella*, chapter 5, In, "Bacteriological Analytical Manual 8nd Ed. US Food and Drug Administration Published and Distributed by Association of Official Analytical Chemist (AOAC)", Virginia.
- ANON. (1988) Microbiology-General Guidance on Methods for Detection of *Salmonella*. Draft International Standart ISO/DIS 6579. International Organization for Standardization ISO. Switzerland.
- ANON. (2004) *Salmonella* standart ve ileri tanı. ISBN 975-98452-0-2. İstanbul.
- ANON. (2005) Salmonellosis. Institute for International Cooperation in Animal Biologics. Erişim: [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/nontyphoidal_salmonellosis.pdf]. Erişim Tarihi: 15.8.2006
- ARDA, M., AKAY, Ö., İZGÜR, M., DİKER, K.S.(1983) Ankara Et ve Balık Kurumu mezbahasında kesilen koyun ve sığır safralarının aerobik mikroflorası üzerine bir araştırma. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **30**: 607-612.
- ARDA, M., AKAY, Ö., AYDIN, N., İZGÜR, M. (1983a) Tavuk tifosuna karşı etkin bir aşı hazırlanması üzerine araştırmalar. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **30**: 420-429.
- ARDA, M., ESENDAL, Ö. M., AKAY, Ö., KESKİN, O., İZGÜR, M. (1995) Tavuk Salmonellosis'inin teşhisinde propylene glycol'lü yeni bir besiyerinin kullanılması. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **42**: 91-96.
- BAJAJ, V., LUCAS, R.L., HWANG, C., LEE, CA. (1996) Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol. Microbiol.*, **22**: 703-714.

- BAUMLER, A.J., HEFFRON, F., REISSBRODT, R. (1997) Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. *J. Clin. Microbiol.*, **35**: 1224-1230.
- BEKAR, M. (1997) Enterobacteriaceae Familyası Mikroorganizmaların Genel Karakterleri ve Tanı Yöntemleri. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Etlik-Ankara, Yayın No: 97-1.
- BELI, E., DURAKU, E., TELO, A. (2001) *Salmonella* serotypes isolated from meat in Albania. *Int. J. Food Microbiol.*, **71**: 263-266.
- BERTHELOT-HERAULT, F., MOMPART, F., ZYGMUNT, M.S., DUBRAY, G., DUCHET-SUCHAUX, M. (2003) Antibody responses in the serum and gut of chicken lines differing in cecal carriage of *Salmonella enteritidis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **96**: 43-52.
- BISPING, W., AMTSBERG, G. (1988) Farbatlas Zur Diagnose Bakterieller Infektionserreger Der Tiere. 1988 Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg, p.: 171-182.
- BOHEZ, L., DUCATELLE, R., PASMANS, F., BOTTELDOORN, N., HAESBROUCK, F., IMMERSEEL, F.V. (2006) *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization of the chicken caecum requires the *HilA* regulatory protein. *Vet. Microbiol.*, **166**: 210-220.
- BRENNER, F.W., VILLAR, R.G., ANGULO, F.J., TAUXE, R., SWAMINATHAN, B. (2000) *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.*, **38**: 2465-2467.
- BUMSTEAD, N., BARROW, P. (1988) Genetics of resistance to *Salmonella typhimurium* in newly hatched chicks. *Br. Poult. Sci.*, **29**: 521-529.
- BUMSTEAD, N., BARROW, P. (1993) Resistance to *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum* and *Salmonella enteritidis* in inbred lines of chickens. *Avian Dis.*, **37**: 189-193.
- BUSATO, A., HOFER, D., LENTZE, T., GAILLARD, C., BURNENS, A. (1999) Prevalence and infection risks of zoonotic enteropathogenic bacteria in Swiss cow-calf farms. *Vet. Microbiol.*, **69**: 251-263.
- CARRAMINANA, J.J., HUMBERT, F., ERMEL, G., COLIN, P. (1997) Molecular epidemiological investigation of *Salmonella* Typhimurium strains related to an egg-borne outbreak. *Res. Microbiol.*, **148**: 633-636.
- CARRAMINANA, J.J., ROTA, C., AGUSTIN, I., HERRERA, A. (2004) High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Vet. Microbiol.*, **104**: 133-139.
- CHAUDHURI, P., SINGH, V.P., SHARMA, B. (1997) PCR amplification of ribosomal DNA spacer regions of *Salmonella enteritidis* isolates. *Indian J. Exp. Biol.*, **35**: 668-669.
- CHEESEMAN, J.H., KAISER, M.G., CIRACI, C., KAISER, P., LAMONT, S.J. (2007) Breed effect on early cytokine mRNA expression in spleen and cecum of

- chickens with and without *Salmonella enteritidis* infection. *Develop. Comp. Immunol.*, **31**: 52-60.
- COHEN, N.D., NEIBERGS, H.L., WALLIS, D.E., SIMPSON, R.B., MCGRUDER, E.D., HARGIS, B.M. (1994) Genus-specific detection of *Salmonellae* in equine feces by use of the polymerase chain reaction. *Am. J. Vet. Res.*, **55**: 1049-1054.
- CORTEZ, A.L.L., CARVALHO, A.C.F.B., IKUNO, A.A., BURGER, K.P., VIDAL-MARTINS, A.M.C. (2006) Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. *Res. Vet. Sci.*, **81**: 340-344.
- ÇALICIOĞLU, M., ÖKSÜZTEPE, G.A., İLHAK, O.İ., DİKİCİ, A. (2005) Elazığ'da sığır karkaslarının yüzey kontaminasyonunun belirlenmesi. *F.Ü. Sağlık Bil. Derg.*, **19**: 69-73.
- ÇARLI, K.T. (1990) Bacteriological and serological studies on the *Salmonella* strains isolated from chickens (broiler and layer) in Bursa district. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.*, **14**: 428-438.
- ÇARLI, K.T., ÇETİN, C., KAHRAMAN, M., DALLILAR, M. (1991) İneklerden *S. typhimurium*'un İzolasyonu ve bu serotipe karşı kan serumlarındaki antikor düzeyleri üzerine bir çalışma. *Uludağ Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **10**: 1-6.
- ÇARLI, K.T., ŞEN, A., KAHRAMAN, M., ÖNCEL, T. (1994) Sığır ve koyunlarda safra kesesinin aerobik mikrobiyal içeriği. *İnfeksiyon Derg.*, **8**: 207-209.
- ÇARLI, K.T., CANER, V., EYİĞÖR, A. (2001) Rapid identification of avian *Salmonella* isolates by air thermal cyclor amplification and capillary gel electrophoresis. *Turk. J. Anim. Sci.*, **25**: 717-720.
- ÇARLI, K.T., EYİĞÖR, A., CANER, V. (2001a) Prevalence of *Salmonella* serovars in chickens in Turkey. *J. Food Protect.*, **64**: 1832-1835.
- ÇARLI, K.T., ÜNAL, C.B., CANER, V., EYİĞÖR, A. (2001b) Detection of *Salmonella* in chicken feces by a combination of tetrathionate broth enrichment, capillary PCR and capillary gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, **39**: 1871-1876.
- DAVIES, R.H. AND BRESLIN, M. (2003) Persistence of *Salmonella* Enteritidis Phage Type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty free-range chicken farm. *Environ. Microbiol.*, **5**: 79-84.
- DAVISON, S., BENSON, C.E., ECKROADE, R.J. (1996) Evaluation of disinfectants against *Salmonella enteritidis*. *Avian Dis.*, **40**: 272-277.
- DUSCH, H., ALTWEGG, M. (1995) Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 802-804.
- DYBING, J.K., WALTERS, N., PASCUAL, D.W. (1999) Role of endogenous interleukin-18 in resolving wild-type and attenuated *Salmonella typhimurium* infections. *Infect. Immun.*, **67**: 6242-6248.

- ERDOĞRUL, Ö.T., ÖZKAN, N., ÇAKIROĞLU, E. (2002) *Salmonella enteritidis* in quail eggs. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **26**: 321-323.
- EYİĞÖR, A., ÇARLI, K.T., ÜNAL, C.B. (2002) Implementation of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of *Salmonella* detection in poultry. *Lett. Appl. Microbiol.*, **34**: 37-41.
- EYİĞÖR, A., GONCAGÜL, G., GÜNAYDIN, E., ÇARLI, K.T. (2005) *Salmonella* profile in chickens determined by real-time polymerase chain reaction and bacteriology from years 2000 to 2003 in Turkey. *Avian Pathol.*, **34**: 101-105.
- EZAKI, T., KAWAMURA, Y., YABUUCHI, E. (2000) Recognition of nomenclatural standing of *Salmonella typhi* (Approved Lists 1980), *Salmonella enteritidis* (Approved Lists 1980) and *Salmonella typhimurium* (Approved Lists 1980), and conservation of the specific epithets enteritidis and typhimurium. Request for an opinion, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**: 945-947.
- FADL, A.A., NGUYEN, A.V., KHAN, M.I. (1995) Analysis of *Salmonella enteritidis* isolates by arbitrarily primed PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 987-989.
- FAKHR, M.K., MCEVOY, J.M., SHERWOOD, J.S., LONGUE, C.M. (2006) Adding a selective enrichment step to the IQ-Check real-time PCR improves the detection of *Salmonella* in naturally contaminated retail turkey meat products. *Lett. Appl. Microbiol.*, **43**: 78-83.
- FEDER, I., NIETFELD, J.C., GALLAND, J., YEARY, T., SARGEANT, J.M., OBERST, R., TAMPLIN, M.L., LUCHANSKY, J.B. (2001) Comparison of cultivation and PCR- hybridization for detection of *Salmonella* in porcine fecal and water samples. *J. Clin. Microbiol.*, **39**: 2477-2484.
- FOSSLER, C.P., WELLS, S.J., KANEENE, J.B., RUEGG, P.L., WARNICK, L.D., BENDER, J.B., EBERLY, L.E., GODDEN, S.M., HALBERT, L.W. (2005) Herd-level factors associated with isolation of *Salmonella* in a multi-state study of conventional and organic dairy farms I. *Salmonella* shedding in cows. *Prev. Vet. Med.*, **70**: 257-277.
- FOSSLER, C.P., WELLS, S.J., KANEENE, J.B., RUEGG, P.L., WARNICK, L.D., BENDER, J.B., EBERLY, L.E., GODDEN, S.M., HALBERT, L.W. (2005a) Herd-level factors associated with isolation of *Salmonella* in a multi-state study of conventional and organic dairy farms II. *Salmonella* shedding in calves. *Prev. Vet. Med.*, **70**: 279-291.
- FRATAMICO, P.M. (2003) Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan *Salmonella*, and transia card *Salmonella* assays for detection of *Salmonella* spp. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. *Mol. Cel. Probes*, **17**: 215-221.
- FRIEND, M., (1999) Salmonellosis. In: Field Manual of Wildlife Diseases: General Field Procedures and Diseases of Birds. Ed.: F. Milton, J. C. Franson. Washington, D.C.
- FRICKER, C. R. (1987) The Isolation of *Salmonellas* and *Campylobacters*. *J. Appl. Bacteriol.*, **63**: 99-116.

- GEBREYES, W.A., DAVIES, P.R., MORROW, W.E.M., FUNK, J.A., ALTIER, C. (2000) Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from swine. *J. Clin. Microbiol.*, **38**: 4633-4636.
- GENTRY-WEEKS, C., HUTCHESON, H.J., KIM, L.M., BOLTE, D., TRAUB-DARGATZ, J., MORLEY, P., POWERS, B., JESSEN, M. (2002) Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of *Salmonella* spp. *J. Clin. Microbiol.*, **40**: 1487-1492.
- GONCAGÜL, G., ÇARLI, K.T. (1999) Tavuklardan *Salmonella* izolasyonunda kloakal swab ve drag metotlarının karşılaştırılması. *Veterinarium*, **1**: 31-33.
- GONCAGÜL, G., GÜNAYDIN, E., ÇARLI, K.T. (2005) Prevalence of *Salmonella* serogroups in chicken meat. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **29**: 103-106.
- GÖKÇEN, S., DENİZLİ, A.N., ERTURUN, H. (1995) İzmir-Manisa mezbahalarında kesilen sığırlarda *Salmonella* etkenlerinin izolasyonu. *Vet. Kont. ve Araşt. Enst. Md. Derg.*, **33**: 85- 96.
- GUO, L., KILLEFER, J., KENNEY, P.B., AMICK- MORRIS, J.D. (1999) Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to study *Salmonella* ecology in a turkey production environment. *Poultry Sci.*, **78**: 24-31.
- HILTON, A.C., WILLIS, R.J., HICKIE, S.J. (2002) Isolation of *Salmonella* from urban wild brown rats (*Rattus norvegicus*) in the West Midlands, UK. *Int. J. Environ. Health Res.*, **12**: 163-168.
- HJARTARDOTTIR, S., GUNNARSSON, E., SIGVALDADOTTIR, J. (2002) *Salmonella* in sheep in Iceland. *Acta Vet. Scand.*, **43**: 43- 48.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Chapter 5. Ed: William, R.H., Williams and Wilkins 428 East Preston Street Baltimore, Maryland 21202, USA. p.: 186-187.
- HOLT, P.S., CHAUBAL, L.H. (1997) Detection of motility and putative synthesis of flagellar proteins in *Salmonella pullorum* cultures. *J. Clin. Microbiol.*, **35**: 1016-1020.
- HORROX, N. (1995) *Salmonella*: All you want to know, but were afraid to ask. *Int. Hatch. Prac.*, **10**: 1-16.
- HU, J., BUMSTEAD, N., BARROW, P., SEBASTIANI, G., OLEIN, L., MORGAN, K., MALO, D. (1997) Resistance to Salmonellosis in the chicken is linked to *NRAMP1* and *TNC*. *Genome Res.*, **7**: 693-704.
- İZGÜR, M. (2002) *Salmonella* Enfeksiyonları. In: *Kanatlı Hayvan Hastalıkları*, Ed.: M. İzgür, M. Akan, Ankara: Medisan Yayınevi, s.: 41-53.
- İZGÜR, M. (2006) *Salmonella* Enfeksiyonları. In: *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*, Ed.: N. Aydın, J. Paracıkoğlu, Ankara: İlke-Emek Matbaacılık ve Yayıncılık, s.: 116-121.

- JOUY, E., PROUX, K., HUMBERT, F., ROSE, V., LALANDE, F., HOUDAYER, C., PICAULT, J.P., SALVAT, G. (2005) Evaluation of a French ELISA for the detection of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in flocks of laying and breeding hens. *Prev. Vet. Med.*, **71**: 91-103.
- KABAGAMBE, E.K., WELLS, S.J., GARBER, L.P., SALMAN, M.D., WAGNER, B., FEDRKA-CRAY, P.J. (2000) Risk factors for fecal shedding of *Salmonella* in 91 US dairy herds in 1996. *Prev. Vet. Med.*, **43**: 177-194.
- KALENDER, H., MUZ, A. (1999) Elazığ bölgesindeki tavuklardan izole edilen *Salmonella* türlerinin tiplendirilmesi. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **23**: 297-303.
- KILINÇ, Ü., AYDIN, F. (2006) Kayseri yöresindeki tavukçuluk işletmelerinden toplanan tavuklardan izole edilen *Salmonella* türlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları. *Sağlık Bil. Derg.*, **15**: 35-40.
- KILGER, G., GRIMONT, P.A.D. (1993) Differentiation of *Salmonella* phase 1 flagellar antigen types by restriction of the amplified fliC gene. *J. Clin. Microbiol.*, **31**: 1108-1110.
- KNIGHT, I.T., SHULTS, S., KASPAR, C.W., COLWELL, R.R. (1990) Direct detection of *Salmonella* spp. in estuaries by using a DNA probe. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 1059-1066.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN, W.C. (1992) Diagnostic Microbiology Fourth Edition. J.B. Lippincott Company. Philadelphia. p.: 105-184.
- KUMAO, T., Ba-THEIN, W., HAYASHI, H. (2002) Molecular subtyping methods for detection of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg outbreaks. *J. Clin. Microbiol.*, **40**: 2057-2061.
- LASSEN, J.(1975) Rapid identification of gram negative rods using a three tube method combined with dictomic key. *Acta microbio scand sec B*, **85**:525-533.
- LE MINOR, L., VERON, M., POPOFF, M.Y. (1985) *S. cholerae-suis subsp. arizonae* comb. nov., *S. cholerae-suis subsp. bongori* subsp. nov., *S. cholerae-suis subsp. cholerae-suis* subsp. nov.(Smith) Weldin, *S. cholerae-suis subsp.diarizonae* subsp. nov., *S. cholerae-suis subsp. houtenae* subsp. nov., *S. cholerae-suis subsp. salamae* subsp. nov. in validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List no.18, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**: 375-376.
- LE MINOR, L., POPOFF, M.Y. (1987) Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. Rev. As the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**: 465-468.
- LEMARCHAND, K., LEBARON, P. (2003) Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. *FEMS Microbiol. Lett.*, **218**: 203-209.
- LISTER, S.A. (1988) *Salmonella enteritidis* infection in broilers and broiler breeders. *Vet. Rec.*, 123: 350.

- MADDOCKS, S., OLMA, T., CHEN, S. (2002) Comparison of CHROMagar Salmonella medium and xylose- lysine- desoxycholate and Salmonella Shigella agars for isolation of *Salmonella* strains from stool samples. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 2999-3003.
- MAKINO, S., KURAZONO, H., CHONGSANGUAM, M., HAYASHI, H., CHEUN, H., SUZUKI, S., SHIRAHATA, T. (1999) Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. *J. Vet. Med. Sci.*, **61**: 1245-1247.
- MARTIN, S.W., SHOUKRI, M.A., THORBURN, M.A. (1992) Evaluating the health status of heds based on tests applied to individuals. *Prev. Vet. Med.*, **14**: 33-44.
- 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. App. Microbiol.*, **94**: 693-700.
- MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., McCAIG, L.F., BRESEE, J.S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P.M., TAUXE, R.V. (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, **5**: 607-625.
- MIKASOVA, E., DRAHOVSKA, H., SZEMES, T., KUCHTA, T., KARPISKOVA, R., SASIK, M., TURNA, J. (2005) Charaterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains of veterinary origin by molecular typing methods. *Vet. Microbiol.*, **109**: 113-120.
- MILLER, R.G., TATE, C.R., MALLINSON, E.T., SCHERRER, R.A. (1991) Xylose-Lysine-Tergitol 4: An improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*. *Poult. Sci.*, **70**: 2429-2432.
- MORINIGO, M.A., BORREGO, J.J., POMERO, P. (1986) Comparative study of different methods for detection and enumeration of *Salmonella* spp. in natural waters. *J. Appl. Bacteriol.*, **61**: 169-176.
- MYINT, M.S., JOHNSON, Y.J., TABLANTE, N.L., HECKERT, R.A. (2006) The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiol.*, **23**: 599-604.
- NAGARAJA, K.V., POMEROY, B.S., WILLIAMS, J.E. (1991) Paratyphoid Infections, Diseases of Poultry, 9nd Ed., Iowa State University Pres, Iowa, USA, 99-130.
- NYE. K.J., FRODSHAM, D., GEE, B., HOWELLS, K., ILIFFE, A., TURNER, T., WARREN, R.E., ANDREWS, S. (2003) Camparison of the perfonmance of selenite cystine and mannitol selenite enrichment broths in the isolation of *Salmonella* spp. from faeces. *Commun Dis. Public Health.*, **6**: 294-296.
- O'BRIEN, J.D.P. (1988) *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. *Vet. Rec.*, **122**: 214.

- ÖZBEY, G., ERTAŞ, H.B. (2006) *Salmonella* spp. isolation from chicken samples and identification by polymerase chain reaction. *Bulgarian J. Vet. Med.*, **9**: 67-73.
- PADUNGTOOD, P., KANEENE, J.B. (2006) *Salmonella* in food animals and human in northern Thailand. *Int. J. Food Microbiol.*, **108**: 346-354.
- PAO, S., DHARTIKA, P., KALANTARI, A., TRITSCHLER, J.P., WILDEUS, S., SAYRE, B.L. (2005) Detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 in feces of small ruminants and their isolation with various media. *App. Environ. Microbiol.*, **71**: 2158-2161.
- PERRY, J. D., FORD, M., TAYLOR, J., JONES, A. L., FREEMAN, R., GOULD, F. K. (1999) ABC medium, a new chromogenic agar for selective isolation of *Salmonella* spp. *J. Clin. Microbiol.*, **37**: 766-768.
- PEREZ, J.M., CAVALLI, P., ROURE, C., RENAC, R., GILLE, Y., FREYDIERE, A.M. (2003) Comparison of four chromogenic media and hektoen agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools. *J. Clin. Microbiol.*, **41**: 1130-1134.
- POPOFF, M.Y., BOCKEMUHL, J., BRENNER, F.W. (2000) Supplement 1998 (no.42) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.*, **151**: 63-65.
- POPOFF, M.Y., BOCKEMUHL, J., BRENNER, F.W., GHEESLING, L.L. (2001) Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.*, **152**: 907-909.
- POPOFF, M.Y., BOCKEMUHL, J., GHEESLING, L.L. (2003) Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.*, **154**: 173-174.
- POPOFF, M.Y., BOCKEMUHL, J., GHEESLING, L.L. (2004) Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.*, **155**: 568-570.
- QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B.K., CARTER, G.R. (1994) Clinical Veterinary Microbiology. Mosby-Year Book Europe Limited, Lynton House, London WC1H9LB, England. p.: 226-234.
- RAMBACH, A. (1990) New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 301-303.
- REEVES, M.V., EVINS, G.M., HEIBA, A.A., PLIKAYTIS, B.D., FARMER III, J.J. (1989) Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J. Clin. Microbiol.*, **27**: 313-320.
- SADEYEN, J.R., TROTEREAU, J., VELGE, P., MARLY, J., BEAUMONT, C., BARROW, P.A., BUMSTEAD, N., LALMANACH, A.C. (2004) *Salmonella* carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals. *Microbes Infect.*, **6**: 1278-1286.

- SALEHI T., Z. (2004) Identification of *Salmonella* serotypes in sheep by PCR. 14th European congress of clinical microbiology and infectious diseases Prague/Czech Republic, May 1-4.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- SANDBERG, M., ALVSEIKE, O., NESBAKKEN, T., SKJERVE, E. (2003) The agreement in isolation of *Salmonella enterica* IIIb 61:k:1,5,(7) from rectal swabs, faecal samples and ileo- caecal lymph nodes from sheep. *Prev. Vet. Med.*, **60**: 167-174.
- SATOROV, S., SUVOROV, A.N., TEZ, V.Y. (1998) The diagnostic and epidemiological use of express-PCR and ribotyping in typhoid fever and *Salmonella* infections. *Folia Vet.*, **42**: 23-27.
- SCHRANK, I.S., MORES, M.A.Z., COSTA, J.L.A., FRAZZON, A.P.G., SONCINI, R., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H., SILVA, S.C. (2001) Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. *Vet. Microbiol.*, **82**: 45-53.
- SIBLEY, J., YUE, B., HUANG, F., HARDING, J., KINGDON, J., TREJO-CHIRINO, M., APPLEYARD, G.D. (2003) Comparison of bacterial enriched-broth culture, enzyme linked immunosorbent assay, and broth culture-polymerase chain reaction techniques for identifying asymptomatic infections with *Salmonella* in swine. *Can. J. Vet. Res.*, **67**: 219-224.
- SOUMET, C., ERMEL, G., ROSE, N., DROUIN, P., SALVAT, G., COLIN, P. (1999) Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Enteritidis* strains from environmental swabs of poultry houses. *Lett. Appl. Mic.*, **29**: 1-6.
- STONE, G.G., OBERST, R.D., HAYS, M.P., MCVEY, S., CHENGAPPA, M.M. (1994) Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *J. Clin. Microbiol.*, **32**: 1742-1749.
- ŞEKER, E., SARIEYÜPOĞLU, M., ÇETİNKAYA, B. (2003) Tatlı su midyesinden (*Unio elongatulus eucirrus Bourguignat*, 1860) izole edilen *Salmonella* 'ların polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile identifikasyonu. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **27**: 201-206.
- TOSUN, H., TAMER, A.Ü. (2000) Soğutma işleminin kanatlı karkasının mikrobiyal kalitesine etkisi ile laktik asitle yüzey dekontaminasyonu üzerine araştırmalar, *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **24**: 527-521.
- UYTTENDAELE, M., VANWILDEMEERSCH, K., DEBEVERE, J. (2003) Evaluation of reel-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **37**: 386-391.
- VO, An T.T., DUIJKEREN, E.V., FLUIT, Ad C., HECK, M.E.O.C., VERBRUGGEN, A., MAAS, H.M.E., GAASTRA, W. (2006) Distribution of *Salmonella enterica*

- Serovars from humans, livestock and meat in Vietnam and the dominance of *Salmonella* Typhimurium Phage Type 90. *Vet. Microbiol.*, **113**: 153-158.
- VOOGT, N., RAES, M., WANNET, W.J.B., HENKEN, A.M., GIESSEN, A.W. (2001) Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. *Lett. Appl. Microbiol.*, **32**: 89-92.
- WALES, A., BRESLIN, M., DAVIES, R., (2006) Assessment of cleaning and disinfection in *Salmonella*-contaminated poultry layer houses using qualitative and semi-quantitative culture techniques., *Vet. Microbiol.*, **116**: 283-293
- WAY, J.S., JOSEPHSON, K.L., PILLAI, S.D., ABBASZADEGAN, M., GERBA, C.P., PEPPER, I.L. (1993) Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 1473-1479.
- WEDDERKOPP, A., GRADEL, K.O., JORGENSEN, J.C., MADSEN, M. (2001) Pre-harvest surveillance of *Campylobacter* and *Salmonella* in Danish broiler flock: a 2-year study. *Int. J. Food Microbiol.*, **68**: 53-59.
- WHYTE, P., MC GILL, K., COLLINS, J.D., GORMLEY, E. (2002) The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. *Vet. Microbiol.*, **89**: 53-60.
- WIGLEY, P. (2004) Genetic resistance to *Salmonella* infection in domestic animals. *Res. Vet. Sci.*, **76**: 165-169.
- 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 Ruminant Res.*, **58**: 19-24.
- WOODWARD, M.J., KIRWAN, S.E.S. (1996) Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs by the polymerase chain reaction. *Vet. Record*, **138**: 411-413.
- ZIEMER, C.J., STEADHAM, S.R. (2003) Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. *Lett. Appl. Microbiol.*, **37**: 463-469.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Seyit
 Soyadı : CANPOLAT
 Doğum yeri ve tarihi : Siverek, 1972
 Uyuğu : T.C.
 Medeni durumu : Evli
 Askerlik durumu : 1996 Vet.Hekim Atđm. ANKARA
 İletişim adresi ve telefonu : seyit.canpolat@yahoo.com 05055867215

II- Eğitimi

1989-1995 İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakóltesi
 1986-1989 Şanlıurfa Lisesi
 1983-1986 Siverek Ortaokulu
 1978-1983 Maraşal Fevzi Çakmak İlkokulu

Yabancı dili :İngilizce, Fransızca

III- Ünvanları

Araştırmacı
 Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi 2001

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneđi

Veteriner Hekimler Derneđi

VI- Bilimsel İlgi Alanları

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Seminerler

Bakterilerin tiplendirilmesinde kullanılan polimeraz zincir reaksiyon metotları.

Radyasyonun mikroorganizmalar üzerine etkisi.

VIII- Diğer Bilgiler

- International Hydrogen Energy Congress and Exhibition IHEC - İstanbul 13-15 Temmuz 2005
- Temel Radyasyondan Korunma, -TAEK 26-30 Nisan 2004
- Nükleer Tekniklerin Bitki Islahı ve Doku Kùltürlerinde Kullanılması-ANTHAM 25-31 Mayıs 2004.
- Nükleer Tekniklerin Tarımda Bitki Besleme ve Bitki Koruma Alanında Kullanılması-ANTHAM 1-7 Haziran 2004.
- Gıda Işınlama ve Endüstride Radyasyonla Sterilizasyon-ANTHAM 8-14 Haziran 2004.
- Nükleer Tekniklerin Hayvancılıkta Kullanılması-ANTHAM 15-21 Haziran 2004