



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TAVUKLARDA *SALMONELLA* INFANTIS İZOLASYONU ve PCR TABANLI YÖNTEMLERLE TANISI

Özlem ŞAHAN YAPICIER

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU**

ANKARA

2016

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TAVUKLARDA *SALMONELLA* INFANTIS
İZOLASYONU ve PCR TABANLI YÖNTEMLERLE TANISI**

Özlem ŞAHAN YAPICIER

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU

ANKARA

2016

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Tavuklarda *Salmonella* Infantis İzolasyonu ve PCR Tabanlı Yöntemlerle Tanısı” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Özlem SAHAN YAPICILAR

Tarih:

04.01.2016

İmza:



Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Doktora programı öğrencisi Özlem ŞAHAN YAPICIER'in hazırlamış olduğu Doktora Tezi, aşağıda isimleri bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11/01/2016



Prof.Dr. Hakan YARDIMCI

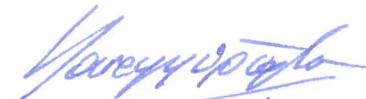
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof.Dr. Mehmet AKAN
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr. Murat YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi



Prof.Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU
Ankara Üniversitesi
Raportör



Prof.Dr. K.Semih GÜMÜŞSOY
Erciyes Üniversitesi

Bu tez, yukarıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiş ve tarih vesayılı Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr.Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv-v
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1.GİRİŞ	
1.1. <i>Salmonella</i> Nomenklatür	2-3
1.2. <i>Salmonella</i> Bakterisinin Yapısal Özellikleri	4-5
1.2.1. <i>Salmonella</i> Serotip Antijenleri	6-7
1.3. Epidemiyoloji	8
1.3.1. <i>Salmonella</i> 'nın Konak Aralığı	8
1.4. Salmonellozis	9
1.4.1. <i>Salmonella</i> 'nın Evcil Hayvanlardaki Durumu	10
1.4.2. <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar Infantis'in Salmonellozis'teki Önemi.	11-12
1.5. <i>Salmonella</i> İzolasyon ve İdentifikasyon Metodu	13
1.6. <i>Salmonella</i> Tanısı için Konvansiyonel PCR	13-14
2.GEREÇ ve YÖNTEM	15
2.1. Gereç	15
2.1.1. Bakteri Suşları	15
2.1.2. Materyal	15
2.1.3. ISO 6579 2002: Appendix D İzolasyon Besiyerleri	16-20
2.1.4. Biyokimyasal Test Besiyerleri	21-25
2.1.5. Serotiplendirmede Kullanılan Besiyerleri ve Antiserumlar	26-27
2.1.6. Moleküler Tanıda Kullanılan Cihaz, Kimyasal ve Tampon Solüsyonlar	27-29

2.2. Yöntem	30
2.2.1. <i>Salmonella</i> İzolasyon ve İdentifikasyon Prosedürü	30
2.2.1.1. Ön Zenginleştirme	30
2.2.1.2. Selektif Zenginleştirme	30
2.2.1.3. Selektif Besiyerlerine Ekim	31
2.2.1.4. Biyokimyasal Konfirmasyon	31-33
2.2.1.5. Serotiplendirme	33-37
2.2.2. <i>Salmonella</i> Infantis'in Moleküler Tanısı	38
2.2.2.1. Örnek DNA Ekstraksiyonu	38-40
2.2.2.2. Primerler	41
2.2.2.3. PCR Optimizasyonu	42
2.2.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Amplifikasyonları	42
2.2.2.5. Agaroz Jel Elektroforez Agaroz Jelin Hazırlanması	43
2.2.2.6. Görüntüleme işlemi	44
2.2.2.7. Ribotiplendirme	44
3. BULGULAR	45
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	45
3.2. Moleküler Tanı Bulguları	48
3.2.1. PCR Bulguları	48-52
4. TARTIŞMA	53-56
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
ÖZET	58
SUMMARY	59
KAYNAKLAR	60-66
EKLER	67
Ek-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	67-68
ÖZGEÇMİŞ	69-72

ÖNSÖZ

Doğada çok yaygın olarak bulunan *Salmonella* etkenleri, ülkemizde ve tüm dünyada kanatlı yetiştiriciliği ve özellikle insan sağlığı açısından son derece önemli zoonozlardır. Salmonellozise sebep olan bu etkenler 1930'lu yıllardan itibaren yapılan çalışmalarla kanatlı tifosu ve pullorum hastalıklarına karşı önemli başarılar alınmıştır. Ancak bu çalışmalar paratifo etkenleri için yetersiz kalmıştır. Paratifo infeksiyonları çok sayıda serotip tarafından oluşturulmasına karşın en yaygın görülen serotipler arasında *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg* bulunmaktadır.

Son yıllarda dünyada çapında paratifoid Salmonellalar gıda kaynaklı hastalık ajanları arasındadırlar. Bu durumun, yumurta ve tavuk tüketimiyle paralel artış göstermesini kanıtlamaktadır. Bu paralel artış içerisinde *S. Infantis* 2007 yılından itibaren diğer serotipler arasından sıyrılmıştır. Yetiştiricilikte ve daha sonrasında ürünün işlenmesi sırasında hijyenik şartlara uyulmaması, etkin bir izleme programının izlenmemesi, alınan geçici çözümler ve çoklu antibiyotik dirençteki artış kanatlılardaki *Salmonella* infeksiyonlarının kontrolünü güçleştirmektedir.

S. Infantis'in etkin bir şekilde izlenebilmesi için gerekli olan laboratuvar teşhis yöntemleri içerisinde izolasyon ve identifikasyon ISO 6579 metodu kullanılmaktadır. Bu prosedür hem yoğun işgücü gerektirmekte hem de çok zaman almaktadır. Aynı zamanda örnek içinde düşük düzeyde *Salmonella* bulunmasıyla yanlış negatif sonuçların elde edilme riski de mevcuttur. Tavuk sürülerinde *S. Infantis*'i en erken şekilde ortaya koyabilecek hızlı bir tanı yönteminin ISO 6579 prosedürünün ön zenginleştirme ve/veya zenginleştirme basamaklarına uyarlanmasıyla oluşturulması klinik vakalar için de faydalı olacaktır. Bu amaçla, PCR tabanlı testlerle hem hızlı hem de basit bir alternatif yöntem oluşturmak hedeflenmiştir.

Tez konumun belirlenmesinde bana yol gösteren, yardım ve ilgilerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU başta olmak üzere Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. K. Serdar DİKER ve öğretim üyeleri Prof. Dr. Müjgan İZGÜR, Prof. Dr. Hakan YARDIMCI, Prof. Dr. Mehmet AKAN ve Yard. Doç. Dr. H.Kaan MÜŞTAK'a, tüm doktora ve yüksekisans yapan arkadaşlarıma, Tez İzleme Komitesi üyesi Doç. Dr. Muammer GÖNCÜOĞLU'na, annem Fatma ŞAHAN, babam Halil ŞAHAN, kardeşim Özgür ŞAHAN'a ve değerli eşim Emrah YAPICIER'e yanımda oldukları ve desteklerini esirgemedikleri için çok teşekkür ediyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

bp	base pair
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DNA	Deoksiribonükleik asit
ddH ₂ O	Double-distilled water
dNTP	Deoxynucleotide
EFSA	European Food Safety Authority
ECDC	European Centers for Disease Control and Prevention
g	Gram
HMC	H- pool antiserum
H ₂ S	Hidrojen Sülfür
IAC	Internal Amplification Control
ISO	International Organization for Standardization
LD	Lizin Dekarboksilaz
LPS	Lipopolisakkarit
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MRSV	Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis Medium
MKTTnB	Mueller Kauffmann Tetrasyonat-novobiocin Broth
NA	Nutrient Agar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ODC	Ornitin Dekarboksilaz
OMB	O- pool antiserum
TBE	Tris Borate EDTA
TPS	Tamponlanmış Peptonlu Su
Ta	Annealing Temperature
Tm	Melting Temperature
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate
XLT ₄	Xylose Lysine Tergitol-4
VP	Voges Proskauer
WHO	World Health Organisation

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Enterobacteriaceae ailesine ait <i>Salmonella</i> bakterisinin antijenik yapıları	5
Şekil 1.2. <i>S. Infantis</i> 'in Kauffmann-White Şeması'na göre formülü	7
Şekil. 2.1. O-antijen tespiti için lam aglütinasyon	36
Şekil. 2.2. Craigie besiyerine ekim	36
Şekil. 2.3. H-faz tespiti için lam aglütinasyon	36
Şekil. 2.4. Faz inversiyon serumlarıyla lam aglütinasyon	37
Şekil 2.5. <i>S. Infantis</i> tanı metodunun akış şeması	38
Şekil 3 1. MRSV besiyerinde inkübasyon sonrası üreme görüntüsü (A);XLD üzerindeki şüpheli <i>Salmonella</i> kolonisi (B)	46
Şekil 3.2. <i>fljB</i> ve <i>fliC</i> primerleri kullanılarak farklı serotiplerle PCR	49
Şekil 3.3. Multipleks PCR primerleriyle farklı serotiplere uygulanan PCR	49
Şekil 3. 4. Cyr F/R dizayn primerleriyle farklı <i>Salmonella</i> serotiplerinin ayrımı	51
Şekil 3. 5. XLD ve XLT4'deki kolonilerin dizayn primeriyle tesbiti	52
Şekil 3.6. Nutrient agarda üremiş kolonilerin dizayn primeri ile tespiti	52

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. <i>Salmonella</i> serovarlarının yıllara göre sayıları	4
Çizelge 2.1. Materyal bazında örneklenen kümes ve kesimhane sayısı	15
Çizelge 2.2. <i>Salmonella spp</i> 'nin biyokimyasal testleri	33
Çizelge 2. 3. PCR tanısı için kullanılan primerler	41
Çizelge 3.1. İzole ve identifiye edilen salmonella serotiplerinin antijenik formülleri	46
Çizelge 3.2. Tüm materyallerin izolasyon ve identifikasyon sonuçları	47
Çizelge 3. 3. <i>S.Infantis</i> 'in 10 katlı dilüsyonunu ve sayım sonucu	50
Çizelge 3.4. ISO 6579 metodu aşamalarında yapılan PCR'ın sonuçları	50

1. GİRİŞ

Soğukkanlı hayvanlardan insana kadar çok geniş bir konakçı çeşitliliği gösteren *Salmonella* serotipleri, dünyada en yaygın gıda kökenli hastalık etkenleridir. Bazı serotipler konakçı spesifik özellik göstermekle birlikte büyük çoğunluğu çapraz infeksiyonlara neden olmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı tüm sıcakkanlı hayvan orijinli *Salmonella* serotipleri insan için potansiyel patojen olarak tanımlanmaktadır (Baird-Parker, 1990; Grimont ve ark., 2007).

Enterobacteriaceae ailesi üyesi olan *Salmonella* cinsi; Gram negatif çomaktır. Medikal olarak önemli bakterilerin en heterojen koleksiyonuna sahiptir (Murray ve ark., 2003; Yan ve ark., 2003). Salmonellalar toprak, su ve dünyadaki bitki örtüsünde ve sıklıkla insan ve hayvanların bağırsak florasında bulunabilmektedir. Salmonellalar spor oluşturmayan, çoğunlukla hareketli ve fakültatif anaerobtur (Yan ve ark., 2003).

1940'lı yıllardan sonra spesifik konakçısı olmayan *Salmonella* serovarlarının insan ve hayvanlardan izolasyonu hızla bir artmakta ve bu serovarlar genç yaştaki tavuklarda önemli kayıplara neden olmaktadır. Paratifoid salmonellalar gıda kaynaklı hastalık ajanları arasında ensık görüleni olup dünya çapında yaygındır, Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation, WHO)'nün raporuna göre, Amerika, Avrupa ve Afrika'daki sağlık ajansları yumurta ve tavuk tüketimine bağlı hastalıklarda benzer bir artış olduğunu bildirmişlerdir (Baird-Parker, 1990; ISO 6579, 2002; İzgür, 2006).

Salmonella'nın doğal habitatı, konak spesifitesi ve klinik olarak ortaya çıkan hastalık tablolarının temel alındığı üç kategoriye ayrılmaktadır: birinci kategoride insanlarda tifo ve paratifoya sebep olan *Salmonella* Typi ve *Salmonella* Paratyphi A, B ve C, ikinci kategoride, ciddi şekilde hayvanlara adapte olmuş paratifo etkenlerinden *Salmonella* Dublin (sığırlar), *Salmonella* Cholerasuis (domuzlar), *Salmonella* Pullorum ve *Salmonella* Gallinarum (kanatlılar), üçüncü kategoride ise hem insanları hem hayvanları infekte eden dünya genelinde gıda kaynaklı hastalıklardan sorumlu, zoonotik önemi olan salmonellalar

bulunmaktadır (Gantois ve ark., 2009).

Salmonella cinsine ait ilk bakteri 19. yüzyılda tanımlanmıştır. *Salmonella* Typhi patojen olarak ilk defa 1880 yılında insanların lenf nodülü ve dalağında bulunmuştur. Bununla birlikte ilk izolasyonu ve morfolojik olarak ilk tanımlamayı Gaffky 1884'de yapmıştır (Le Minor, 1992). Amerikalı bakteriyolojist D. E. Salmon ve Smith tarafından 1885 yılında ilk defa domuz bağırsağından *Bacterium Suispestifer* olarak adlandırılan basil izole edilmiştir. Daha sonra *Salmonella* Cholerasis olarak adı değiştirilmiştir. 1888 yılında Gaetner *Salmonella* Enteritidis'i, 1889 yılında Klein yetişkin kuşlarda kanatlı tifosunu ve 1892 yılında Loefer *Salmonella* Typhimurium'u raporlamışlardır. Jones (1913), agglutinasyon testlerini kullanarak *Salmonella* Pullorum'u tanımlamıştır (Le Minor, 1992).

1.1. *Salmonella* Nomenklatur

Veteriner bilim adamı Danial E. Salmon 1885 yılında ilk *Salmonella* bakterisini bulmasının ardından bilim adamları *Salmonella* nomenklaturu için birçok farklı sistem kullanmışlardır (Yan ve ark., 2003). *Salmonella* nomenklaturunun birörnek olması için bilimadamları, sağlık çalışanları ve halk arasında bir iletişim olması gerektiğini savunmuşlardır. Çünkü birçok nomenklatur sisteminin *Salmonella* cinsini tutarsız bir şekilde türlere, alttürler, altcinslere, gruplara, altgruplara ve serotiplere (serovarları) bölmüş ve bu da karışıklığa sebep olmuştur (Brenner et al., 2000).

Salmonella cinsi 1925 yılında klasifiye edilmeye başlamış ve kullanılan yöntem serolojik metotlar olmuştur. *Salmonella* Typhimurium, Loeffler (1892) ve *Salmonella* Paratyphi, Schottimuller (1899) tarafından bulunmuş ve *Salmonella* cinsine eklenmiştir. Uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Enterobacteriaceae Alt Komitesi (Subcommittee of Enterobacteriaceae of the International Committee on Systematic Bacteriology) 1986 yılında XIV. Uluslararası Mikrobiyoloji Kongresi'nde toplanarak, 1952 yılında Kauffmann ve

Edwards tarafından teklif edilen *Salmonella enterica* tür isminin kullanılmasını önermiştir. 1987 yılında WHO İşbirliği Merkezi (Collabrating Centre)’nden Le Minor ve Popoff Sistematik Bakteriyoloji Uluslararası Komitesi’nin Adalet Komisyonu’na ‘Bir Görüş Önerisi’ni resmi olarak sundular. Aynı yıl Salmonellaların 7 altcinsinin, alttür olarak adlandırılmasını önerdiler. Altains III, IIIa ve IIIb olmak üzere hem genomik yakınlıkları hem de biyokimyasal özelliklerine göre ayrıldı. Alttür IIIa (*S. enterica subsp. arizonae*) monofazik Arizona serotipini ve alttür IIIb (*S. enterica subsp. diarizonae*) difazik serotipleri içermektedir. Tüm Arizona serotipleri 1979 yılında Rohde tarafından Kauffmann-White şemasına eklenmiştir. Bu öneri 1986 yılında CDC ve Ewing tarafından kabul görerek Edward ve Ewing’in Enterobacteriaceae İdentifikasyonu’nun 4. baskısında ve diğer kaynaklarda yayınlanmıştır. Popoff ve ark. (1996) *Salmonella* genusu için yaptıkları klasifikasyonuna göre salmonellaları iki türe ayırmışlardır: *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori*. DNA-DNA hibridizasyonuna göre *S. bongori* ayrı bir türdür. Bu son sınıflandırma Bergey’s Manual’de yerini almıştır ve tüm *Salmonella* serovarları bu iki türün içine girmiştir. *Salmonella bongori*, en fazla 10 farklı serotipe sahiptir. *Salmonella enterica* ise fenotipik ve genotipik olarak 6 alttüre ayrılmıştır. Bunlar; *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* ve *indica*’dır. Öncelikli olarak özellikle amino asit ve karbonhidrat metabolizmasını içeren biyokimyasal testlerle ayrımları yapılabilmektedir (Forshell ve ark., 2006). Türler ve alttürleri takiben *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I), 1547; *Salmonella enterica* subsp. *salamae* (II), 513; *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), 100; *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), 341; *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* (IV), 73; *Salmonella enterica* subsp. *indica* (VI), 13 serovara sahiptir (ISO 6579, 2002). İnsanlarda *Salmonella* kaynaklı hastalıklarda sadece 200 adet serovar sıklıkla gözlenmektedir (Baird-Parker, 1990). *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *arizonae* ve *diarizonae* reptil ve soğukkanlı hayvanların bağırsaklarında bulunmakla birlikte *arizonae* hindi ve koyunlarda problem oluşturabilmektedir (Ewing, 1986). *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* ve *Salmonella bongori* çevrede rastlanır ve tipik olarak insanlarda patojendir. *Salmonella subterranean* üçüncü tür olarak düşünülmüştür fakat DNA temelli çalışmalarda *Salmonella* genusuna ait olup olmadığı tam olarak belirlenememiştir (Grimont ve ark., 2007). Sözü edilen tür/alttür ve serotipler çizelge 1.1’de verilmiştir.

Antijenik klasifikasyonu yapılan salmonellalar White-Kauffmann-Le Minor (Kauffmann-White) şemasında yer almaktadır. İdentifiye edilen yeni serovarlar WHO’nun Paris’te Pastör Enstitüsü’nde bulunan “Dünya Sağlık Örgütü (WHO) *Salmonella* Araştırma

ve Referans İşbirliği Merkezi (WHO Collaborating Centre)” tarafından bu şemaya eklenip güncelleştirilmektedir. Bu yeni serovarlar Kauffman-White şemasında güncellenerek listelenmektedir (Brenner ve ark., 2000).

Çizelge 1.1. *Salmonella* serovarlarının yıllara göre sayıları

Türler/allttürler	Yıllar		
	1998	2001	2007
Serovar Sayıları			
<i>Salmonella enterica</i>	2443	2502	2587
subsp. <i>enterica</i>	1454	1492	1547
subsp. <i>salamae</i>	489	500	513
subsp. <i>arizonae</i>	94	95	100
subsp. <i>diarizonae</i>	324	331	34
subsp. <i>houtane</i>	70	71	73
subsp. <i>indica</i>	12	13	13
<i>Salmonella bongori</i>	20	21	23
Toplam serovarlari (<i>Salmonella</i> cinsi)	2463	2523	2610

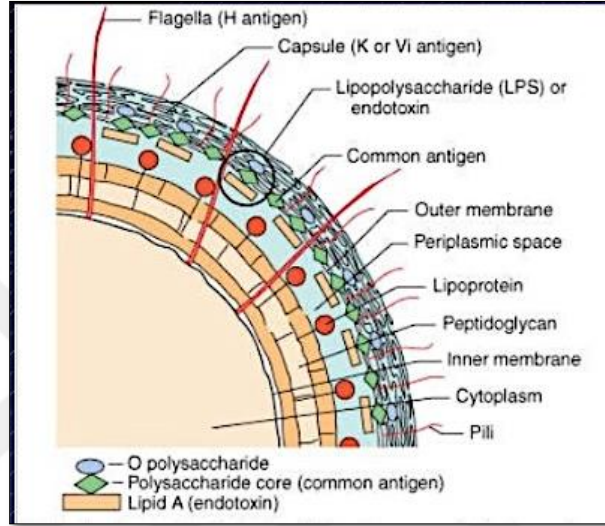
1. Supplement 1998(Popoff ve ark., 2000)

2. Supplement 2001(Popoff ve ark., 2003)

1.2. *Salmonella* Bakterisinin Yapısal Özellikleri

Enterobacteriaceae ailesi üyesi olan *Salmonella* cinsi; Gram-negatif, fakültatif anaerob, katalaz enzim sistemine sahip, çomak morfolojisinde (0.7-1.5 X 2-5 µm) ve genellikle peritrik flagella ile hareket edebilen bakterileri içermektedir. Ancak *Salmonella* Pullorum ve *Salmonella* Gallinarum gibi bazı serotipler ise hareketsizdir (Akan, 2008, Aydın ve ark.,2008; İzgür, 2002; İzgür, 2006). *Salmonella* Pullorum’un özel besiyeri koşullarında hareketli olduğu, hareketli *Salmonella* Pullorum kültürlerinin elektron mikrofrafisinde

hücreden çıkan flagellayı andıran uzun fibröz çıkıntılarının 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 (Grimont, 1993).



Şekil 1.1. Enterobacteriaceae ailesine ait *Salmonella* bakterisinin antijenik yapıları

Metilen mavisi, karbol fuksin gibi boyalarla kolaylıkla boyanabilme özelliğine sahiptirler (Holt ve ark., 1994). 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. Salmonellaların optimal üreme dereceleri 37 °C olmasına rağmen, üreme ısı sınırları oldukça geniştir. En uygun pH 7,4'te ürerler. Hidrojen Sülfür (H₂S) pozitif, laktoz negatiftirler. Vogues Proskauer (VP), indol, oksidaz testleri negatif olup, metil red (MR) ve katalaz pozitifler. Jelatini eritirler, nitratlar nitrite indirgerler ve fakültatif anaerobiktirler. Sitrat, lizin (LDC) ve ornitin dekarboksilaz (ODC) genellikle pozitifdir. *Salmonella* etkenlerinin tümü üreaz enzimine sahip olmadıkları için üreyi ayrıştıramazlar (Holt ve ark., 1994; İzgür, 2002; 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 ve galakturonat fermente etmezler (Le Minor ve

Popoff, 1987). Salmonellalar genellikle laktozu kullanmazlar, fakat Arizona gurubunun çoğu laktozu yavaş ya da hızlı olarak fermente eder. Salmonellaların 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* serovaryları sitrat pozitifler. *Salmonella* Paratyphi A ve *Salmonella* Choleraesuis'in bazı suşlar hariç salmonellalar H₂S üretmektedirler. *Salmonella* Paratyphi A dışındaki salmonellaların çoğu için LDC reaksiyonu pozitifdir. *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Gallinarum'un ODC reaksiyonu negatif olmasına karşın diğer salmonellalar genellikle ODC pozitifdir (Holt ve ark., 1994; OIE 2012).

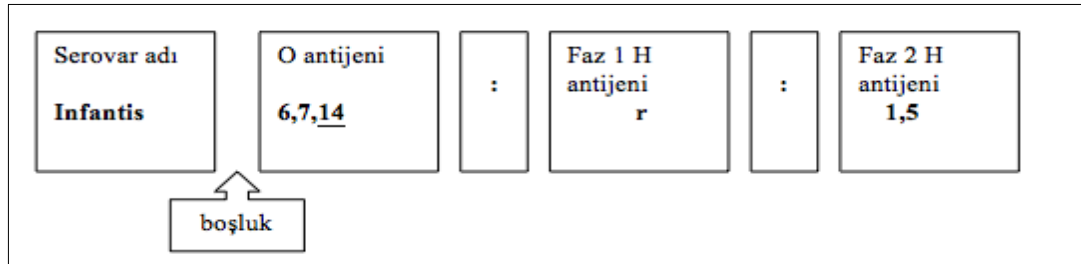
Salmonellanın ortak 3 kompartmanı bulunmaktadır. İlk kompartman sitozol; genetik replikasyon ve protein ekspresyonunun gerçekleştiği yerdir. İkinci kompartman hücre duvarını içerir; patojenitenin kritik yapısı ve fonksiyonunu içerir. Diğer kompartman ise yüzey yapıları hücre zarfının dışına yayılmış yüzey yapılarıdır (kapsüller; K antijenleri, flagella; H antijeni) ve şekil 1.1.'de gösterilmiştir (Murray ve ark., 2002).

1.2.1. *Salmonella* Serotip Antijenleri

O antijenleri (polisakkarit de denir) karbonhidrat yapısındadır ve lipopolisakkarit (LPS) komponentini oluşturmaktadır. O altünitesinin polimeridir; her O altünitesinin varyasyonu karbonhidrat içeriğinin ve altüniteyi oluşturan karbonhidratlar arasındaki ve O antijen polimerlerin formunu oluşturan kovalent bağların yapısından kaynaklı olarak farklılıklar görülmektedir. O antijenleri sayılarla dizayn edilmiştir ve serogruplara ayrılır. Serogruplara 'O' grubu adı verilmektedir. O gruplarının çoğu harflerle dizayn edilmiştir (örneğin, *S. Typhimurium* Grup B ile ifade edilen Grup O: 4'e aittir, *S. Enteritidis* Grup D1 ile ifade edilen Grup O: 9'a aittir.) *Salmonella* O gruplarına ait birden fazla O antijeni bulunabilir ve bu gruba ait tüm serotiplerde de vardır. Çoklu O faktörleri ardışık olarak listelenmiştir ve virgülle ayrılmaktadır.

H antijenleri bakteriyal flagellanın filamentöz parçasıdır. Flagellin adı verilen protein altünitelerinden meydana gelmiştir. Flagellinin sonu sınırlanmıştır ve karakteristik yapının filamentlerinin oluşturmaktadır. Antijenik olarak değişken olan parçası flagellinin yüzeyde bulunmaktadır. Salmonella serotipleri için iki farklı H antijeni eksprese edilebilir ve iki farklı gen tarafından kodlanır. İki genin ekspresyonu koordinelidir böylelikle sadece bir flagellar antijen tek bir bakteride aynı zamanda eksprese olmaktadır. Birbirinden ayrı flagellar antijenler Faz 1 ve Faz 2 olarak adlandırılmıştır. Monofazik izolatlar tek bir flagellinin eksprese olmuş halidir. Bazı serotiplerde (örneğin; *S. Enteritidis*, *S. Typhi*, çoğu IIIa ve IV alttür serotiplerinde) veya Faz 1 veya Faz 2 antijenini kodlayan genin kaybedilmesi veya inaktivasyonu sonucunda şekillenmektedir. Bazı Salmonella serotiplerinde H antijenleri çoklu faz faktörleri içerdiklerinde virgülle ile ayrılırlar (örneğin; ikinci faz antijeni bulunan *S. Typhimurium* gibi).

Kauffmann-White Şeması'nda tüm serotipler formülle ifade edilirler. Şemanın ilk sütunu *S. enterica* subsp. *enterica* serovarların adlarını içerir, şekil 1.2 'de gösterilmiştir (örneğin; Enteritidis, Hadar, Infantis, Typhimurium, v.s.). *Salmonella enterica*'nın alttürleri ise Romen rakamlarıyla ifade edilir (örneğin, *S. enterica* subsp. *salamae*; II, *S. enterica* subsp. *arizonae* ; IIIa, v.s.) (Popof 1998).



Şekil 1.2. *S. Infantis*'in Kauffmann-White Şeması'na göre formülü

O ve H faktörlerinin varlığı değişkenlik gösterebilir. Bu tarz durumlarda bakteriyofaj tarafından kodlanıyorsa serotip formülünde altı çizili olarak bulunur (örneğin, 1) veya antijen değişken olarak bulunuyorsa kare parantez içerisine alınarak gösterilir (örneğin, [5]). Zayıf antijenik yapıyla temsil ediliyorsa parantez içine alınmış halde gösterilir (örneğin, (k)). H antijeninin bulunmadığı serotipler eksi ('-') ile ifade edilir (örneğin, *S. Enteritidis*;

1,9,12:g,m:-). Serotipler nadiren de olsa 3. H antijenini de eksprese edebilirler, bu gibi durumlarda Faz 2 H antijenini takiben ifade edilir (örneğin, S. II; 13,23: b: (1,5): z₄₂).

1.3. Epidemiyoloji

1.3.1. *Salmonella*'nın Konak Aralığı

Salmonella serovarları konak prevalansı ve neden oldukları klinik tablolara bağlı olarak 3 gruba ayrılmaktadır (Malorny ve ark., 2004). Aseptomatik durumlardan ciddi hastalık tablolarına kadar klinik bulguları farklılık göstermektedir (Jones ve ark., 2008). İlk gruptaki serovalar konak bağımlı olarak bilinir, ilişkili türlerde sınırlı sistemik hastalıklara sebep olur. En bilinen temsilcisi insan ve bazı primatlarda Tifo hastalığına sebep olan *S. enterica* serovar Typhi'dir. *S. enterica* serovar Gallinarum, kanatlıya adapte olmuştur ve kanatlı tifosunun sebebidir. İkinci gruptaki konak bağımlı serovarlar spesifik hayvanlarda sistemik hastalıklara sebep olmakta, fakat nadiren de diğer memelileri infekte etmektedir (Kingsley ve Bäuml, 2000). Örneğin, *S. enterica* serovar Choleraesuis domuzlarda sistemik paratifoid hastalıklara sebep olur ancak seyrek olarak da insanları etkilemektedir. Benzer olarak, *S. enterica* serovar Dublin sığırlarla ilişkilidir ve sistemik hastalık oluşturur fakat invaziv insan infeksiyonları nadir de olsa bildirilmiştir (Wollin, 2007). Diğer grupların tersine üçüncü gruptaki serovarlar kanatlı ve memeli konaklarında geniş çaplı hastalığa sebep olmaktadır. Bu grubun en bilinen serovarları *S. enterica* serovar Typhimurium ve serovar Enteritidis'tir. Kuluçkadan yeni çıkmış civcivlerde *S. enterica* serovarları Enteritidis ve Typhimurium gastroenteritlere sebep olmaktadır, fakat ileri yaştaki tavuklarda aseptomatik taşıyıcı olmaktadır. İmmün sistemi yeterli olan insanlarda sınırlı bir diyare görülmektedir ancak immün yetmezliği olan insanlar yüksek mortaliteyle seyreden sistemik hastalığa yakalanırlar (Kingsley ve ark., 2009; Dougan ve ark., 2011). Serovarin patojenite genleriyle konak adaptasyonu kuşların, memelilerin veya soğuk kanlı omurgalıların immün sisteminin spesifik orgaizasyonu ile engellenir (Bäuml ve ark., 1998; Kingsley ve Bäuml, 2002).

1.4. Salmonellozis

Salmonellalar dünya çapında yaygın olup insan, hayvan ve çevrede farklı sıklıklarda görülmektedir. Hayvanlardan insanlara veya insanlardan hayvanlara bulaşma gösterdiği için zoonotiktir. Etkenin doğal habitatı genellikle bağırsaktır. Hayvanlardan insanlara çoğunlukla kontamine hayvansal (özellikle kanatlı, domuzlar ve sığırlar) gıdalar aracılığıyla bulaşmaktadır (Thorns, 2000). Diğer salmonella infeksiyonları insandan insana, su kaynağı aracılığıyla, çevresel veya hayvansal maruziyet bağlı bulaşma sebebiyle olmaktadır (Bertrand ve ark., 2008). Pet hayvanlar özellikle sürüngenler salmonella rezervuarı olarak davranırlar ve direk veya indirek temasla infeksiyonu bulaştırırlar (Bertrand ve ark., 2008).

Salmonella'nın hastalık oluşturabilmesi için suşun infeksiyon dozu ve özellikleri, konağın bağışıklık durumu, yaşının uygun olması gerekmektedir. Çalışmalarda hastalık oluşumu için gerekli en düşük dozun 1×10^5 cfu kadar olduğu belirlenmiştir (Hornick ve ark., 1970).

S. enterica subsp. *enterica* insan ve hayvanlardaki *Salmonella* infeksiyonlarının yaklaşık 99%'undan sorumludur Avrupa'da, 2010 yılında 99,020 Salmonellozis vakası rapor edilmiştir. European Food Safety Authority (EFSA) ve European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2012 rakamlarının 2006-2010 yılları arasındaki vaka sayıları istatistiksel olarak kıyaslandığında hastalığın sıklığının düşüş gösterdiğini bildirmiştir. Avrupa ülkelerinde özellikle Almanya'da 1990'ların ortasında, 2006-2007 yılları dışında bu serotipin sebep olduğu vaka sayılarının düştüğü bildirilmiştir. 2010 yılında 25,307 insan *Salmonella* vakası bildirilmesine rağmen 2009 verileriyle kıyaslandığında %19'luk bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Almanya'daki 100,000'lık popülasyonda prevalansı % 30.9 olarak tespit edilmiş ve son beş yıl ortalamasının altında bulunmuştur. Buna rağmen 2010 yılında tüm *Salmonella* infeksiyonlarının %47'nin sebebi hala *S. enterica* serovar Enteritidis'tir. Bu vakalarda yumurta ve yumurtadan üretilen gıdalar sorumlu olmuştur. Yeterli ısı işlem görmemiş çiğ yumurta içeriği olan gıdalar da ikinci en yüksek (% 14.4) *Salmonella* infeksiyon kaynağı olmuştur (EFSA ve ECDC, 2012). İkinci en sık görülen serovar %41 oranla *S. enterica* serovar Typhimurium (monofazik Typhimurium da

dahil (2009: 33%). Relatif olarak *S. enterica* serovar Enteritidis vakalarının düşmesi monofazik *S. enterica* serovar Typhimurium (4,[5],12:i:-) vakalarının artmasını desteklemiştir. İnsanlarda monofazik varyant *S. enterica* serovar Typhimurium (0.1% 1999'da %0.1'den 2011 yılında %24.9) arttığını rapor etmişlerdir (Toboldt ve ark., 2013). Avrupa'daki *Salmonella* infeksiyonlarının %25.3'ünü diğer non-tifoidal serovarlar başta *S. enterica* serovar Infantis (1.8%), Newport (%0.9), Kentucky (%0.8), Virchow ve Derby (herbiri %0.7), Mbandaka ve Agona (herbiri 0.5%) oluşturmaktadır (EFSA ve ECDC, 2012; Hendriksen ve ark., 2011). Buna rağmen bölgesel serovarların görülme sıklığıyla ilgili de farklılıklar olmaktadır. Örneğin *S. enterica* serovar Heidelberg Kuzey Amerika'da ilk dörtte, Avrupa'da ilk dokuzda, Latin Amerika'da ilk ondokuzda, Afrika ve Asya bölgelerinde en sık görülen yirmi serovar içerisinde bulunmaktadır.

1.4.1. *Salmonella*'nın Evcil Hayvanlardaki Durumu

Hayvanlar *Salmonella*'nın asemptomatik taşıyıcısı olabilirler ve bakteriyi bağırsaklarında taşırlar. Uzun süreler dışkılarıyla çok miktarda etkeni saçabilirler. *Salmonella*'yı kontrol ederken insan gıda zincirine *Salmonella* bulaşmasını engellemek gerekmektedir. Genellikle, gelişmiş ülkelerde patojenin ve serovarların prevalansı düzenli olarak kontrol edilir ve bunu üzerine kontrol önlemleri alınır. Evcil hayvalarda *Salmonella* infekte bireylerden vertikal yolla bulaşabileceği gibi horizontal olarak dışkı, gıda, kemirici ve kuşlar aracılığıyla da bulaşma olabilmektedir (Davies ve ark, 2004; Vandeplas ve ark., 2010). Evcil hayvanlarda hastalığın görülme sıklığı bakım-besleme, hijyen kuralları ve havalandırmayla yakından ilişkilidir. *Salmonella* insidensi kuzey ülkelerde daha soğuk iklim şartlarından dolayı daha az görülmektedir. *Salmonella* vakaları mevsimsel değişimlerde özellikle yaz ve ilkbaharda artış göstermesine rağmen kış aylarında azalmaktadır (EFSA 2011). Kontamine hayvan yemi ve vahşi hayvanlar çiftlik hayvanlarına hastalığın girişi için önemli bir kaynaktır (Skov ve ark., 2008). Bunun dışında bir diğer kontaminasyon sebebi ise hayvanların kesim süreçleridir (Bolton ve ark., 2003).

Kanatlı hayvanlar bir çok serovarla infekte olabilirler. Konak spesifik *S. enterica* serovar Gallinarum ve Pullorum kanatlılarda birçok sistemik hastalığa (sırasıyla kanatlı Tifosu ve Pullorum) sebep olmaktadır (Barrow ve Freitas Neto, 2011). Yirminci yüzyılın ortalarında aşılama programlarıyla Kuzey Amerika ve Avrupa’da eradikasyonu sağlanmıştır (Barrow ve ark., 2012). 1980’lerin ortasına kadar *S. enterica* serovar Enteritidis sıklıkla tavuklarda görülen serovardır, dünyanın birçok kısmında ekolojik *S. enterica* serovar Gallinarum ve Pullorum aşılamasından kaynaklı olarak ekolojik boşluğu doldurmaktaydı (Bäumler ve ark., 2000; Ward ve ark., 2000) *S. enterica* serovar Enteritidis önemli halk sağlığı problemi haline gelmiştir (EFSA, 2012). Aşılama programlarına rağmen dünyanın birçok yerinde yayılmaya devam etmektedir (Hendriksen ve ark., 2011). Avrupa’da, *Salmonella* prevalansı üzerine yapılan sörvey çalışmalarında %30.7 ticari yumurtacı tavuklarda, % 23.7 broylerlerde etken (EFSA, 2007a; EFSA, 2007b) belirlenmiştir. Sıklıkla *S. Enteritidis* bunu takiben de *S. Infantis* dominant olarak tespit edilmiştir. Buna rağmen prevelans ve dominant serovarların varyasyonları Avrupa ülkeleri arasında farklılık göstermektedir. Örneğin, *S. Enteritidis* yumurtacılar arasında 0%-79.5%. arasında bir varlığa sahiptir. Almanya’da prevelans diğer Avrupa Birliği ülkelerinden genellikle biraz daha aşağıdadır. Almanya’daki yumurtacılar arasında dominant serovarları Avrupa ortalamasından farklıdır. Broylerlerde ve karkaslarda monofazik serogrup B serovarları (4,12:d:-) sırasıyla %30.7 ve %27.6 prevelansındadır. Bu serovarlar Danimarka ve İngiltere’de sırasıyla %,15.2, %2.8 oranında izole edilmektedir. Almanya ulusal zoonozlar izleme programlarını takiben 2003/99/EC (Anonymous, 2003) Almanya’da *Salmonella* prevalansı yumurtacılar, broylerlerde ve hindilerde sırasıyla %6.1, %6.8 ve %2.0 ve toz örneklerinde %3.6, %7.4 ve % 1.1 fekal örneklerde görülmektedir (Malorny ve ark.,2004)

1. 4. 2. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Infantis*’in Salmonellozis’teki Önemi

İnsanlarda Salmonellozis’in ana kaynaklarından biri kümes hayvanları ve ürünlerinin tüketimidir. Diğer et ürünleri ve gıdalar yanında, kanatlı üretiminde en yaygın rastlanılan serotiplerden biri *S. Infantis*’dir. İnsan ve sığır Salmonellozis’ine neden olan bu serotip, Kauffman-White şemasında O antijenleri bakımından C₁, Faz 1 H antijenleri bakımından “r” ve Faz 2 H antijenleri bakımından “1.5” olarak tanımlanmıştır (Popoff ve ark., 1998; Popoff ve ark., 2004). Halen *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* insanda

Salmonellozis'e yol açan en yaygın serotiplerdir. Ancak son yirmi yılda özellikle gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkelerde yürütülen çalışmalarda bu iki serotipin baskınlığının giderek azaldığı ve *S. Infantis* başta olmak üzere, başka serotiplerin sıklığının arttığı tespit edilmiştir (Zhao ve ark., 2003; Asai ve ark., 2007, Lublin ve ark., 2015). İlk *S. Infantis* kökenli salgın 1971 yılında Finlandiya'da meydana gelmiş ve bu salgının kaynağının broyler üretimi olduğu saptanmıştır. Büyükbaş hayvan çiftliklerinde ise 1992 yılında aynı serotipin yol açtığı salgınlar belirlenmiştir. *S. Infantis* kökenli diğer bir salgın 1993 yılı ağustos ayında Danimarka'da meydana gelmiştir ve bu salgında 500 kişi tedavi görmüştür. Salgın üzerinde yürütülen epidemiyolojik çalışmalarda, domuz etlerinden kaynaklandığı saptanmıştır (Wegener ve Baggesen 1996).

İnsanlardaki *S. Infantis* salgınlarının öncelikli rezervuarı olarak hayvanlar özellikle de kanatlı popülasyonu gelmektedir. Bunun üzerine Avrupa'da European Food Safety Authority (EFSA) tarafından yapılan tarama çalışmalarında *S. Enteritidis* ve *S. Infantis* serotiplerinin broyler çiftliklerinden kaynak aldığı ortaya konulmuştur. En yüksek oranla Macaristan (%87), bunu Polonya (%19) ve Çek Cumhuriyeti (%13) takip etmiştir (EFSA 2007a; 2007b). Almanya'da ise broyler sürülerinde *S. Infantis* oranının %8.9 olduğu ortaya konmuştur. EFSA'nın yaptığı diğer çalışmada *S. Infantis* (EFSA 2007c), broyler karkaslarında Slovenya (%55) ve Avustralya (%44)'da en önemli serovar olarak belirlenmiştir. *S. Infantis*'in broyler sürülerinde görülme sıklığı yalnızca Macaristan'da değil İngiltere, Kanada, Amerika Birleşik Devletleri ve çok sayıda Afrika ülkesinde Japonya, İzlanda, Fransa, Hollanda, USA, Türkiye, Suudi Arabistan ve Cezayir gibi ülkelerde de tanımlanmıştır (Raseta ve ark., 2015).

S. Infantis'in *Salmonella* enfeksiyonlarında etkinliğinin hızlı bir şekilde artması, tüm çiftlik hayvanlarında yaygın olarak bulunan bir serotip olması yanında, çoklu ilaç dirençlilik regülasyonunda içerdiği genetik elastisiteden kaynaklanmaktadır. Günümüzde tüm dünyada çoklu ilaç dirençlilik sistemlerinin tespit edildiği serotiplerin başında *S. Typhimurium* ve *S. Infantis* gelmektedir (Tükel ve ark., 2007; Chessa ve ark., 2008b).

1.5. *Salmonella* İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemi

Salmonella izolasyon ve identifikasyonu uluslararası kabul edilmiş prosedür ISO 6579:2002/Amd 1:2007, Ek D standarttır. ISO 6579 standartının D eki *Salmonella* spp.'lerin hayvan dışkı kökenli izolasyonunu içermektedir ve prosedürün selektif zenginleştirme aşamasında Modifiye Rappaport Vassiliadis yarı katı besiyerinde (MRSV) kullanılmaktadır. MSRV hızlı ve sensitif bir şekilde hareketli gıda örneklerinden *Salmonella* izolasyonu için geliştirilmiştir. Daha sonra, dışkı örneklerinden de hareketli *Salmonella* izolasyonu için de kullanımı uygun görülmüştür (Malorny ve ark., 2004). Standartın sensitivitesi 25 g örnekte 1 CFU *Salmonella*'nın tespitine dayanmaktadır (ISO, 2007). Bu metod dört ardışık işlemde oluşmaktadır: (i) 225 ml selektif olmayan Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS) ile 25 g örneğin 18 ± 2 saat $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de ön zenginleştirilmesi (BPW), (ii) iki farklı besiyerinde zenginleştirme aşaması , ilk olarak Modifiye Rappaport Vassiliadis yarı katı besiyerinde (MRSV) $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ at $41.5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve ikinci Mueller Kauffmann Tetrathionate-novobiocin broth (MKTTnB) $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ at $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, (iii) selektif besiyerine ekim aşamasında ise XLD ve XLT₄ agar $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ inkubasyona bırakılması, (iv) agar üzerinde üreyen kolonilerin biyokimyasal ve serolojik konfirmasyonu yapılmasıdır. Prosedürün tamamı 4-6 iş gününde tamamlanmaktadır (ISO, 2012).

1.6. *Salmonella* Tanısı için Konvansiyonel PCR

PCR 1980'lerin ortasında Karry Mullis tarafından klinik ve gıda mikrobiyolojik örneklerinin tanısı için çok önemli bir teknik icat edilmiş olan önemli bir tanı tekniğidir. PCR gıda patojenlerinin tespiti için başarılı ve üretken bir araç olmuştur (Hoorfar ve ark., 2004; Malorny ve ark., 2003). En önemlisi ise tanı testleri için internal amplifikasyon kontrollerini(IAC) içermesidir. (Hoorfar ve ark., 2004). Bununla birlikte, kontaminasyon riski, DNA polimeraz inhibitörleri varlığı ya da farklı cihazların (örneğin thermal cycler) performansındaki varyasyonların teşhis laboratuvarlar arasında tekrarlanabilir sonuçlar sağlayabilmesi zor olabilmektedir (Wilson, 1997).

Salmonella DNA 'sının spesifik ilk PCR tesbiti *oriC* genini hedefleyen çalışma olmuştur (Widjoatmodjo ve ark., 1991). Bir yıl sonra Rahn ve ark. (1992) yüksek ölçüde korunmuş *Salmonella* patojenite adası 1'de bulunan *invA* genini temel alan PCR çalışmasını yayınlamıştır. Bu test 630 *Salmonella* ve 142 *Salmonella* olmayan örneklerle test edilmiştir. Sadece *S. enterica* serovar Senftenberg ve Lichtfield örnekleri negatif bulunmuştur. Ayrıca *Salmonella* serogruplarının ayrımını ortaya koymak için biyosentezden sorumlu aynı zamanda O-antijeninin tekrarlayan ünitesini kodlayan genleri içeren *rfb* gen kümesini temel alan PCR dizayn edilmiştir (Lee ve ark., 1992; Luk ve ark., 1993). Bunun yanında birçok farklı primer setleriyle *Salmonella* çalışmaları yapılmıştır (Aabo ve ark., 1993; Kwang ve ark., 1996; Cohen ve ark., 1996; Makino ve ark., 1999; Sareyyüpoğlu ve ark., 2008; Ziemer ve Steadham, 2003). PCR metodunun yüksek sensitivite ve spesifitesi ve hızlı sonuca ulaşması avantajları yönünden gıda, su ve çevresel örneklerden konvansiyonel *Salmonella* teşhisine alternatif olmaktadır. Bu nedenle Uluslararası Standardizasyon Örgütü (International Organization for Standardization, ISO) gıda kaynaklı patojenler için PCR metodunu önermiştir (Tomás ve ark., 2009).

PCR çalışmalarının yanında günümüzde hala ISO 6579 *Salmonella* izolasyon ve identifikasyon prosedürü altın standarttır. Tüm prosedürün tamamlanması için geçen süre yaklaşık 11 gündür ve yoğun emek ve tecrübeli personel isteyen bu yöntemi kısaltmak için dünyadaki birçok laboratuvar serotiplendirmeyi moleküler metotlarla desteklemişlerdir. Yüksek sensitivite, spesifite ve PCR tabanlı metotların zamanı kısaltmasından dolayı tercih edilen metotlar konvansiyonel PCR ve real-time PCR teknikleri olmuştur (Makino ve ark., 1999; Ellingson ve ark., 2004; Hein ve ark., 2006; Josefsen ve ark., 2007; Malorny ve ark., 2004). Tanı ve mikrobiyoloji laboratuvarlarında PCR tabanlı testlerin rutin olarak kullanılması için basit, verimli, maliyeti düşük, hız ve uygunluk durumları açısından yeterli olmalıdır (Sanchez, 2006; Mertes ve ark., 2010).

Bu tez çalışmasında Salmonellozis vakalarında etkinliği hızla artan broyler kaynaklı *Salmonella* Infantis serovarlarının izolasyon ve identifikasyon prosedürü olan ISO 6579'a alternatif hızlı bir PCR tabanlı tanı tekniğinin oluşturulması ve optimizasyonu amaçlandı.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Bakteri Suşları: Çalışmada kullanılan *S. Infantis* suşları, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Kültür Koleksiyonu'ndan alındı.

2.1.2. Materyal: Teşhis amacıyla Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kanatlı Teşhis Laboratuvarı'na bir broyler entegresinden gönderilen yem örnekleri, kloakal svablar, drag svab örnekleri ve kesimhanelerde ölü hayvanlardan örneklenen sekal svablar ve bağırsak içeriklerinde *Salmonella Infantis* araştırıldı. Tez kapsamında gönderilen materyallerin alındığı kümeslerin sayılarına göre oluşturulan çizelge 2.1'deki gibidir.

Çizelge 2.1. Materyal bazında örneklenen kümes ve kesimhane sayısı

Materyal adı	Kümes ve kesimhane sayısı	Alınan materyal sayısı
Altlık	120	120
Sekal svap	28	240
Kloakal svap	40	200
Bağırsak içeriği	38	190
Yem	41	59
Toz	19	39

2.1.3. ISO 6579 2002: Appendix D İzolasyon Besiyerleri

Tamponlanmış Peptonlu Su

İçerik:

Pepton.....	10,0 g
Sodyum klorür (NaCl).....	5,0 g
Disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).....	9,0 g
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4).....	1,5 g
Distile su.....	1 000 ml

Hazırlanışı:

- Tüm içerik distile suda çözündürüldükten sonra 225 ml'lik erlenmayerlere paylaştırıldı.
- 121°C'de 15 dak. otoklavda sterilize edildi.
- pH 25 °C 'de $7,0 \pm 0,2$ 'e ayarlandı..

Modifiye Rappaport -Vassiliadis Semi Solid Medium(MRSV)

İçerik:

Triptoz	4,6 g
Sodyum klorür (NaCl).....	7,3 g
Kazein hidrolizat.....	4,6 g
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4).....	1,5 g
Magnezyum klorit.....	10,9 g
Malaşit yeşil okzalat.....	0,04 g
Agar.....	2.7 g
Novobiyosin.....	20 mg
Distile su.....	1 000 ml

Novobiyosin solüsyonu

Novobiyosin sodyum tuzu.....	10 mg
Distile su.....	2 ml

Hazırlanışı

- 31.6 g MRSV agar 1 litre distile suda çözündürüldü.
- Homojen karışım sağlanana kadar kaynatıldı.
- Otoklav yapılmaz. 50°C'ye soğutuldu ve 1 vial Novobiocin Supplement direk olarak eklendi. Karıştırıldı ve steril petrilere döküldü.
- Bu besiyeri yarıkatı olduğundan petri ters çevrilmeden kullanıldı.
- pH 25 °C 'de 5.2 'ye ayarlandı.

Mueller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth (MKTn)

İçerik:

Et ekstraktı.....	4,3 g
Pepton.....	8,6 g
Sodyum klorür (NaCl).....	2,6 g
Kalsiyum karbonat (CaCO ₃).....	38,7 g
Sodyum tiosülfat pentahidrat (Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O).....	47,8 g
Safra tuzu.....	4,78 g
Brillant green.....	9,6 mg
Distile su.....	1 000 ml

Hazırlanışı:

- Tüm içerik distile suda çözündürüldü ve 5 dak. kaynatıldı.
- pH 25 °C 'de 8,2 ± 0,2'e ayarlandı.

İyot ve Potasum İyodin solüsyonu

İyot.....	20 g
Potasyum iyodin (KI).....	25 g
Distile su.....	100 ml

Hazırlanışı:

- Novobiyosin sodyum tuzu distile suda çözündürüldü ve filtrasyon ile sterilize edildi.

Birleşim Besiyeri

Base.....	1000 ml
İyot-Potasyum iodine solüsyonu.....	100 ml
Novobiyosin solüsyonu.....	5 ml

Hazırlanışı:

- Novobiyosin solüsyonu ve diğerleriyle karıştırıldıktan sonra iyot solüsyonu eklendi.
- Tüm içerik karıştırıldıktan sonra vida kapaklı tüplere 10 ml olacak şekilde paylaştırıldı.

Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD Agar)

İçerik:

Base

Maya ekstraktı.....	3,0 g
Sodyum klorür (NaCl).....	5,0 g
Ksiloz.....	3,75 g
Laktoz.....	7,5 g
Sukroz.....	7,5 g
L-lizin hidroklorid.....	5,0 g
Sodyum tiyosülfat.....	6,8 g
Demir (III) amonyum asetat.....	0,8 g
Fenol kırmızısı.....	0,08 g
Sodyum deoksikolat.....	1,0 g
Agar.....	9,18 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

- Agar eriyinceye kadar kaynar su banyosunda tutuldu.
- Bu besiyeri otoklavlanmadan sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eriterek yapıldı. Aşırı ısıtmadan kaçınıldı.
- pH'sı 25 °C'de 7,4±0,2'e ayarlandı.

Xylose Lactose Tergitol 4 Agar (XLT-4 Agar)

İçerik:

Base

Proteoz pepton.....	1,6 g
Maya ekstraktı.....	3,0 g
Lizin.....	5,0 g
Ksiloz.....	3,75 g
Laktoz.....	7,5 g
Sukroz	7,5 g
Demir amonyum sitrat.....	0,8 g
Sodyum tiyosülfat.....	6,8 g
Sodyum klorid.....	5,0 g
Fenol red.....	0,08 g
Distile su.....	1000 ml

Tergitol Supplement

Tergitol supplement.....	4,6 ml
--------------------------	--------

Hazırlanışı:

- Tergitol supplement XLT4 besiyerine eklendi.
- Agar eriyinceye kadar kaynar su banyosunda tutuldu.
- Besiyeri otoklavlanmadı. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapıldı. Aşırı ısıtmadan kaçınıldı.
- pH'sı 25 °C'de 7,4±0,2'e ayarlandı.

2. 1. 4. Biyokimyasal Test Besiyerleri

Triple Sugar/ Iron Agar (TSI agar)

İçerik:

Et ekstraktı.....	3,0 g
Maya ekstraktı.....	3,0 g
Pepton.....	20,0 g
Sodyum klorür (NaCl).....	5,0 g
Laktoz.....	10,0 g
Sukroz.....	10,0 g
Glukoz.....	1,0 g
Demir (III) sitrat.....	0,3 g
Sodyum tiyosülfat.....	0,3 g
Fenol kırmızısı.....	0,024 g
Agar.....	9,18 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

- Agar vida kapaklı tüplere 10 ml olacak şekilde paylaştırılıp 121°C’de 15 dak. otoklavda sterilize edildi.
- Tüpün dibindeki agar 2,5-5 cm olacak şekilde yatık vaziyette donduruldu.

Üre Agar (Christensen)

İçerik:

Base

Pepton.....	1,0 g
Glukoz.....	1,0 g
Sodyum klorür (NaCl).....	5,0 g
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄).....	2,0 g
Fenol kırmızısı.....	0,012 g
Agar.....	9-18 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

- Tüm bileşenler distile suda çözündürüldü ve 121°C’de 15 dak. otoklavda sterilize edildi.
- pH 25 °C’de 6,8 ± 0,2’e ayarlandı.

Üre solüsyonu

Üre.....	400 g
Distile su.....	1000ml

Hazırlanışı:

- Üre distile suda çözündürüldü ve filtrasyon ile sterilize edildi.

Birleşim Besiyeri

Base.....	950 ml
Üre solüsyonu.....	50 ml

Hazırlanışı:

- Base sterilize edildikten sonra 44 °C - 47 °C’ye soğutuldu ve üre solüsyonu eklendi.
- Tüplere 10 ml olacak şekilde paylaştırıldı; yatık vaziyette donduruldu.

L-Lizin Dekarboksilaz Besiyeri

İçerik:

L-Lizin monohidroklorid.....	5,0 g
Maya ekstraktı.....	3,0 g
Glukoz.....	1,0 g
Bromkrezol purpur.....	0,015 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

- Besiyeri vida kapaklı tüplere 2-5 ml olacak şekilde paylaştırılıp 121°C’de 15 dak. otoklavda sterilize edildi.
- pH 25 °C’de 6,8 ± 0,2’e ayarlandı.

β-Galaktosidaz Test Besiyeri

İçerik:

Tampon solüsyon

Sodyum dihidrojen fosfat(NaH ₂ PO ₄).....	6,9 g
Sodyum hidroksit(10 mol/l).....	3 ml
Distile su.....	50 ml

ONPG solüsyonu

o-Nitrofenil β-D-galaktopiranozid (ONPG).....	0,08 g
Distile su.....	15 ml

Birleşim Besiyeri

Tampon solüsyonu.....	5 ml
ONPG solüsyonu.....	15 ml

Hazırlanışı:

- Tampon solüsyonu ONPG solüsyonuyla karıştırıldı.

Voges Proskauer Besiyeri

İçerik:

Pepton.....	7,0 g
Glukoz.....	5,0 g
Dipotasyum hidrojen fosfat(K ₂ HPO ₄).....	5,0 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

- Vida kapaklı tüplere 3 ml olacak şekilde paylaştırılıp 121°C’de 15 dak. otoklavda sterilize edildi.
- pH 25°C’de 6,9 ± 0,2’e ayarlandı.

Voges Proskauer Ayıraçları

Kreatin solüsyonu (*N*-amidinosarcosine)

Kreatin monohidrat.....	0,5 g
Distile su.....	100 ml

Naftol etanol solüsyonu

1-Naftol.....	6 g
Etanol(96 %).....	100 ml

Trypton/Triptofan Besiyeri

İçerik:

Trypton.....	10 g
Sodyum klorür (NaCl).....	5 g
DL-Triptofan.....	1 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

- Vida kapaklı tüplere 5 ml olacak şekilde paylaştırılıp 121°C’de 15 dak. otoklavda sterilize edildi.
- pH 25 °C’de $7,5 \pm 0,2$ ’e ayarlandı.

İndol Test Ayıracı

Kovaks

4-Dimetilaminobenzadehid.....	5 g
Hidroklorik asit	25 ml
2-Metilbütan-2-ol.....	75 ml

2. 1. 5. Serotiplendirmede Kullanılan Besiyerleri ve Antiserumlar

Fizyolojik Tuzlu su

İçerik:

Sodyum klorür (NaCl).....	8,5 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

- Distile suyun içerisinde sodyum klorür çözdürüldü.
- 121°C’de 15 dak. otoklavda sterilize edildi.
- pH 25 °C ‘de $7,0 \pm 0,2$ ’e ayarlandı.

Nutrient Agar

İçerik:

Et ekstraktı.....	3,0 g
Pepton.....	5,0 g
Agar.....	9-18 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

- Agar 121°C’de 15 dak. otoklavda sterilize edildi.
- pH 25 °C’de $7,0 \pm 0,2$ ’e ayarlandı.

Craigie Tüpleri

İçerik:

Nutrient broth.....	25 g
Agar.....	2,75 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanışı:

- Distile su içerisine bileşenler eklendi ve tamamen erimesi için kaynatıldı.
- Craigie tüpleri içeren test tüplerine 4,5 ml besiyeri dağıtıldı. Besiyerinin miktarı craigie tüpünü aşmamasına dikkat edildi.
- 115°C’de 10 dak. otoklavda sterilize edildi. pH 7,3 ± 0,1’e ayarlandı.
- Maksimum oda ısısında 8 hafta muhafaza edildi.

Swarm Agar

İçerik:

Tripto-kazein Soya Buyyon(TSB).....	1000 ml
Sodyum desoksikolat.....	0,3 g
Agar.....	5-9 g

Hazırlanışı:

- Tüm malzemeler TSB içerisinde karıştırıldıktan sonra 110°C’de 15 dak. sterilize edildi. pH 25 °C’de 7,4 ± 0,2 ‘ e ayarlandı.
- Besiyeri otoklavdan çıktıktan sonra 47-50 °C’ye soğutuldu ve 90 mm çapındaki petrilere dağıtıldı. Yarıkatı olması sebebiyle ters çevrilmedi.

2.1.5. Antiserumlar: Çalışmada Salmonella O, H ve Faz inversiyon için iki antiserum markası; Statens Serum Institute (Danimarka) ve Denka Seiken (Japonya) kullanıldı.

2.1.6. Moleküler Tanıda Kullanılan Cihaz, Kimyasal ve Tampon Solüsyonlar

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

Pipetler: 0.5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl (Finnpipette F1, Thermo Scientific, USA)'lik pipetler kullanıldı.

Vortex: Fine Vortex (FinePCR, Kore) kullanıldı.

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

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

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

Jel Elektroforez Ünitesinin Tarakları: A2-24D (Thermo Scientific, USA) tarak ile jel üzerinde 1.5mm kalınlıkta, 6.5 mm genişlikte ve 7µl hacim alabilen 24 adet kuyucuk, A2-36D (Thermo Scientific, USA) tarak ile 1,5 mm kalınlığında, 3.5 mm genişlikte 4 µl hacim alabilen 36 adet kuyucuk açıldı.

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

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

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

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

Agaroz: Jel hazırlarken Prona Agarose, Biomax kullanıldı.

Ethidium Bromide Boya Solüsyonu: 100 ml ddH₂O içerisine 1 gr ethidium bromide (Sigma, E-8751, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) (2, 7- Diamino-10 ethyl-9phenyl-phenanthridinium bromide) ilave edilerek 10 mg/ml'lik stok solusyon hazırlandı. Stok karanlıkta +4 °C'de saklandı.

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

Fotoğraf Makinası: UV'de gözlenen ürünler fotoğraf makinası (Digital Graphic Printer, UP-D895, Sony, USA) ile görüntülendi.

Fotoğraf Filmi: High Glossy Printing Paper, UP-110HG, Sony, USA

2.2. Yöntem

2.2.1. *Salmonella* İzolasyon ve İdentifikasyon Prosedürü

Bu çalışmada, *Salmonella* Infantis ISO 6579:2002/Amd 1:2007, Ek D *Salmonella* İzolasyon ve İdentifikasyon standardı uygulanarak izole ve identifiye edildi.

2.2.1.1. Ön Zenginleştirme

Kümeslerden ve kesimhanelerden gönderilmiş drag svab (altlık ve toz), bağırsak içeriği, sekal tonsil, yem ve kloakal svaplar 225 ml TPS içerisine transfer edildi. Tüm örnekler 37°C ± 1°C'de 6., 12., 18., 24. saatlerde PCR için örnekleme yapılacak şekilde inkübasyona bırakıldı.

2.2.1.2. Selektif Zenginleştirme

Ön zenginleştirme sıvısı karıştırıldı ve 0.1 ml MRSV besiyerine 3 nokta şeklinde damlatıldı. Diğer ortam için, 1 ml ön zenginleştirme sıvısı 10 ml MKTTn buyyona (Muller-Kauffmann Tetrathionate novobiocin broth)' a transfer edildi.

İnokülasyonu tamamlanan buyyon 37°C±1°C'de ve yarıkatı besiyeri 41.5°C ±1°C 6., 12, 18, 24. saatlerde PCR için örnekleme yapılacak şekilde inkübasyona bırakıldı.

2.2.1.3. Selektif Besiyerlerine Ekim

İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra MRSV besiyerinde üremenin en son noktasından öze dolusu, paralel olarak MKTTn buyyondan bir öze dolusu XLD (Xylose lysine deoxycholate agar) ve XLT₄ (Xylose lysine tergitol agar) besiyerine ekimleri yapıldı. Pleytler ters çevrilmiş pozisyonda 37 °C ±1 'de 24 ± 3 h inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında pleytlerde tipik *Salmonella* kolonisinin üreyip üremediği kontrol edildi.

Şüpheli *Salmonella* kolonilerinin XLD ve XLT₄ üzerinde ortası siyah etrafında parlak şeffaf kırmızımsı renkte zon oluşturduğu tespit edildi.

2.2.1.4. Biyokimyasal Konfirmasyon

TSI (Triple Sugar Iron) Agar

XLD ve XLT₄ agar üzerinde beş adet tipik koloni seçildi ve TSI agar yüzeyine öze yardımıyla çizelerek ekim yapıldı ve küt bir şekilde ekim tamamlandıktan sonra 37°C ± 1°C'de 24 ± 3 saat inkübasyona bırakıldı.

Üre Agar

Öze yardımıyla agarın yüzeyine çizerek ekim yapıldı. 37°C±1°C'de 24 ± 3 saat inkübasyona bırakıldı. *Salmonella* üre negative olduğu için agarda renk değişimi olmadı.

L-Lizin Dekarboksilaz Testi

Sıvı besiyerinin alt kısmına inokülasyon yapıldı. $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ± 3 saat inkübasyona bırakıldı. Turbidite ve mor renk inkübasyondan sonra pozitif olduğunu gösterdi.

β -Galaktosidaz (ONPG) Testi

Laktozlu bir besiyerinde geliştirilmiş olan kültürden bir öze dolusu alınarak 0,25 ml fizyolojik tuzlu su ile süspanse edildi. Bu süspansiyonun üzerine 0,25 ml Ortho Nitrofenol β -D- Galaktopronosid (ONPG) Peptonlu Su besiyeri ilave edilerek optimum sıcaklıkta 3-4 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda tüplerde renk değişikliği olmadı.

Voges Proskauer Testi

3 ml VP besiyeri bulunan steril tüpe şüpheli koloniden öze dolusu süspense edildi. . $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ± 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra ayıraçlar sırasıyla damlatıldı. Ayıraçlar damlatıldıktan sonra renk değişimi olmadı.

İndol Testi

Trypton/triptofan içeren besiyerinin içerisine şüpheli koloni inokule edildi. . $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ± 3 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 1 ml Kovaks ayıracı damlatıldı ve sarı halka oluşumu gözlemlendi.

Çizelge 2.2. *Salmonella spp*'nin biyokimyasal testleri

Biyokimyasal Test	Reaksiyon
TSI asidik glukoz fermentasyonu (+gaz oluşumu)	Pozitif
TSI asidik laktoz fermentasyonu	Negatif
TSI asidik sukroz fermentasyonu	Pozitif
TSI hidrojen sülfür oluşumu	Pozitif
Üre hidrolizi	Negatif
Lizin dekarboksilaz	Pozitif
β -galaktosidaz reaksiyonu	Negatif
İndol oluşumu	Negatif
Voges –Proskauer reaksiyonu	Negatif

Testlerde görülen değişiklikler çizelge 2.2.'de gösterilmiştir.

2.2.1.5. Serotiplendirme

Şüpheli *Salmonella* kolonisinin biyokimyasal konfirmasyonundan sonra *Salmonella spp.* olduğu doğrulandı. Nutrient agar gibi selektif olmayan bir besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C)'de 18 ± 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında *Salmonella* suşları, yüzey (LPS, O-antijenleri) ve flagella antijenlerinin (protein, H-antijenleri) tespiti için serotiplendirme işlemine tabii tutuldu. Serotipin antijenik kombinasyonu Kauffmann-White Şeması doğrultusunda yapıldı.

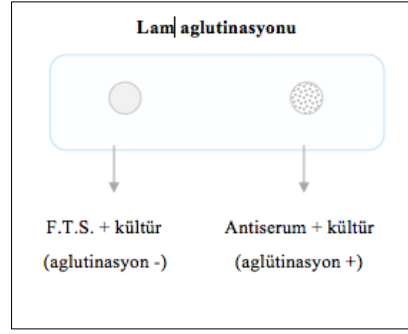
Oto-aglütinasyon tespiti

- Lam üzerine bir damla 0,85 % NaCl'den 3,5 % NaCl (yüksek konsantrasyon daha sensitif) damlatıldı,
- Bakteri kültüründen 1 µl disposable öze dolusu alındı ve lamın üzerinde konulur ve fizyolojik tuzlu su ile karıştırıldı,
- 5-60 saniye arasında beklenip sonuç gözlemlendi,
- Süspansiyon içerisindeki granüller oto-aglütinasyon varlığını gösterdi. Bu şekilde reaksiyon veren örnek serotiplendirmeye alınmadı.

O- antiserumları ile aglutinasyon

Lam üzerindeki iki noktaya öze dolusu fizyolojik tuzlu su konuldu. *Salmonella* şüpheli kolonilerde öze dolusu alınıp iki tuzlu su damlasıyla homojen şekilde karıştırıldı. Oto-aglütinasyon test edildikten sonra Poly O antiserumuyla ikinci süspansiyon karıştırıldı. Aglutinasyonun olması *Salmonella* olduğunu doğruladı.

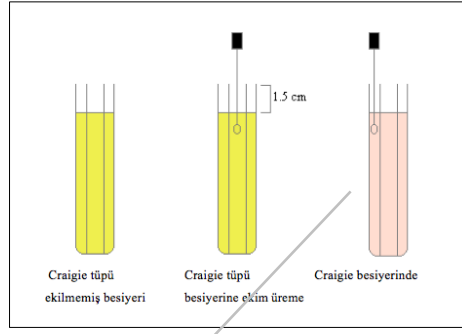
İkinci defa lam alındı ve öze dolusu tuzlu su lama konulup *Salmonella* olduğu doğrulanan koloniyle karıştırıldı. Bu karışıma sırasıyla O-pool antiserumları uygulandı. Aglutinasyon görülen O-pool antiserum OMB olarak tespit edildi. OMB içindeki monovalan antiserumlarla tek tek koloni denendi ve 6,7 ile ifade edilen 'O' antijenik yapıları pozitif bulundu. Kauffman-White şeması kontrol edildi ve suşun serogrubu O:7 ile ifade edilen Grup C1 olarak bulundu. Tüm pozitif ve negatif denemeler kayıt altına alındı. Bahsedilen durum şekil 2.3.'de gösterilmiştir.



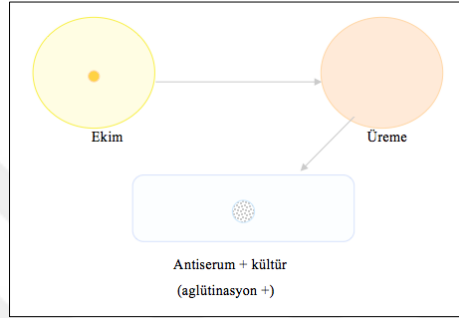
Şekil. 2.1. O-antijen tespiti için lam aglutinasyon

H – antiserumları ile aglutinasyon

Serolojik grubu tayin edilen suşun tipini tayin etmek için flagellar antijenin kuvvetlendirilmesi gereklidir. Bu amaçla suş önce Craigie tüpündeki % 0.2'lik besiyerine ekilerek 37°C'de 18-24 saat inkubasyona bırakıldı. Yapılan işlemler şekil 2.4 ve 2.5'de gösterilmiştir.



Şekil. 2.2. Craigie besiyerine ekim



Şekil. 2.3. H-faz tespiti için lam aglütinasyon

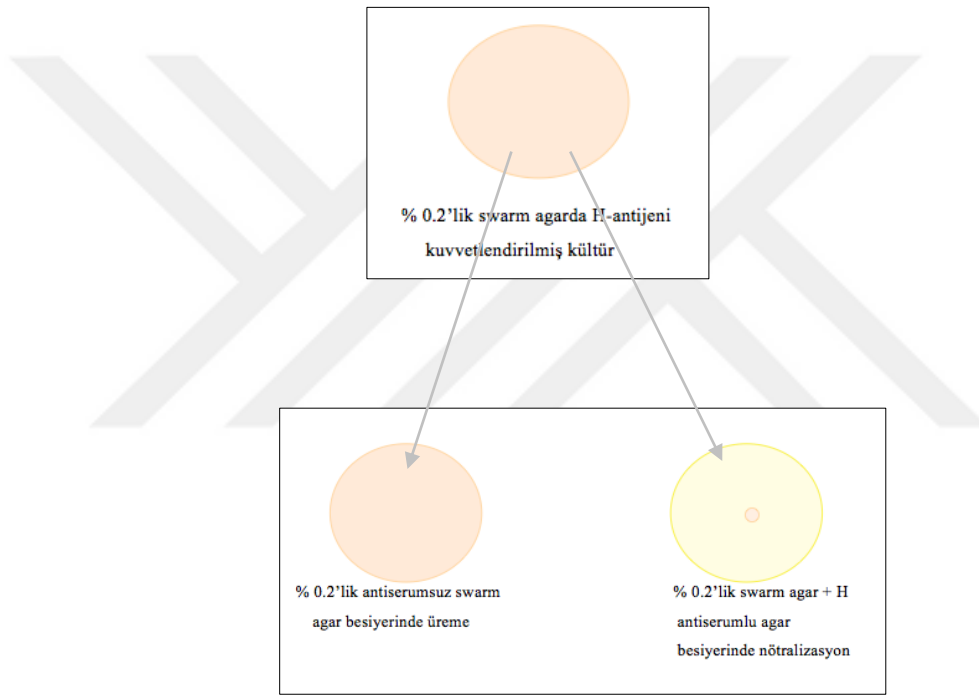
İnkübasyondan sonra Craigie tüpündeki kültürün dış yüzeyinden bir damla kültür alındı ve %0,2' lik petrideki besiyerinin tam ortasına kenarlarına bulaştırmadan ekildi. Kültür plak yüzeyine yayılmadan 37°C'de 18-24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresi sonunda üreyip petriyi kaplayan kültürün petrinin kenar kısmından bir damla alınıp 1/100 oranında antiserum fizyolojik ile sulandırılmış H-pool antiserumları ile lamda aglütinasyona tabi tutuldu. HMC polivalan antiserumuyla pozitif aglütinasyon verdiği tesbit edildikten sonra sırasıyla içeriğindeki monovalan antiserumlar denendi ve H:r antiserumuyla aglütinasyon verdi. Böylelikle suşun tip tayini yapıldı.

Faz inversiyon antiserumları ile aglütinasyon

Tip tayininin doğrulaması nötralizasyon testi ile yapıldı. Suş H:r antiserum ile aglütinasyon verdiği için H:r 'yi inaktive eden H:r inversiyon antiserumu 8.3 µl miktarında % 0.2 'lik 5 ml agar besiyerine katılıp, çapı 60mm'lik petrilere 5 ml olarak döküldü. Kontrol için aynı besiyeri aynı miktarda antiserumsuz olarak da ikinci petride hazırlandı.

%0.2 'lik agardaki 18 saatlik flagelleri kuvvetlendirilmiş kültürün kenar kısmından alınarak bu petrilerdeki besi yerlerinin tam merkezine bir damla ekildi. 37°C'de 18-24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda swarm agardaki üremenin en uç kısmından bir damla kültür alındı ve Faz 1 antijenik yapısı belirlenirken yapılan işlemler tekrarlandı. Bunun sonucunda denenen Faz 2 antiserumları olan H:1 ve H:5 ile kültür aglütine edildi.

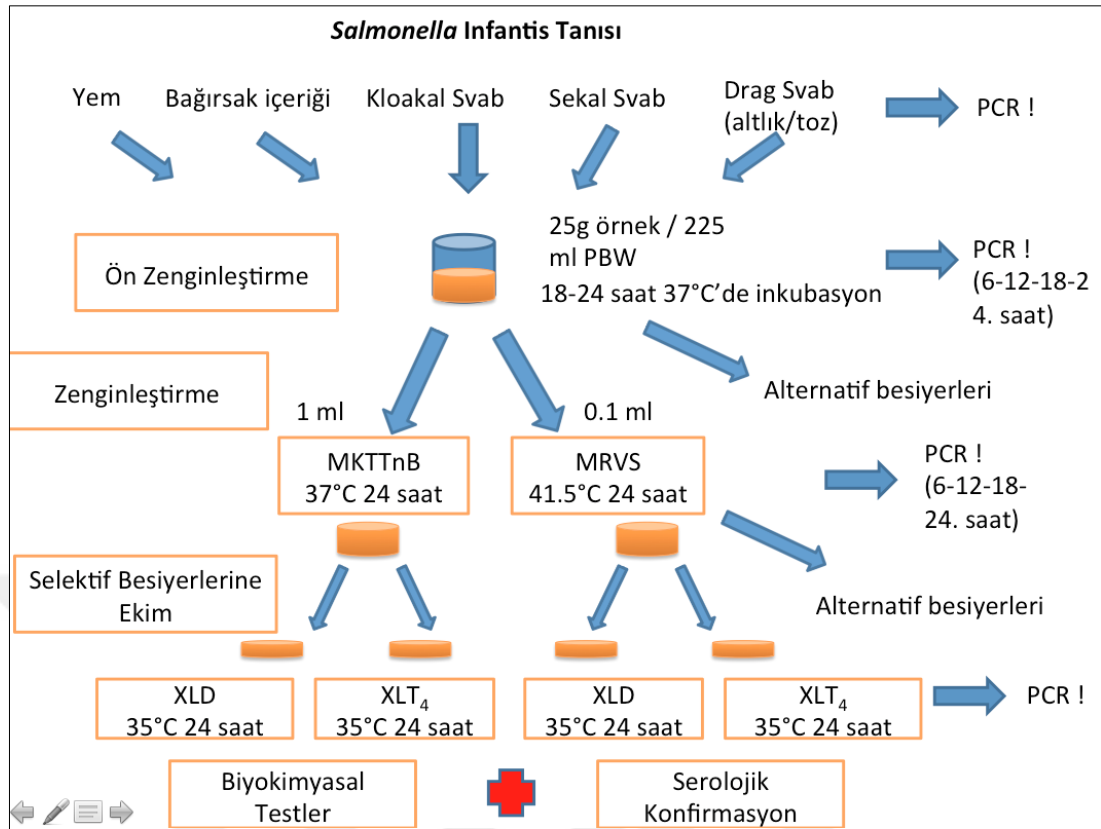
Tüm aglütinasyon işlemleri tamamlandıktan sonra O antijenik yapısı; 6,7,14; H Faz 1 antijenik yapısı r; Faz 2 antijenik yapısı 1,5; olan serotip S. Infantis olarak identifiye edildi.



Şekil. 2.4. Faz inversiyon serumlarıyla lam aglütinasyon

2.2.2. *Salmonella Infantis*'in Moleküler Tanısı

Tez kapsamında yapılacak çalışmalarda ISO 6579 metodunun farklı aşamalarında (başlangıç, ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme) inkubasyonun farklı periyotlarında (6, 12, 18, 24. saatlerde) örnekleme yapıldı. DNA izolasyonunun ardından çalışmada yeralan primerlerle konvansiyonel PCR uygulandı. Tanı ile ilgili akış şeması şekil 2.7.'de gösterilmiştir.



2. 2.2.1. Örnek DNA Ekstraksiyonu

GeneJET Genomic DNA Purification Kit Ekstraksiyonu

- Pelet, 180 µl digestion solüsyonu ile süspanse edildi. Daha sonra 20 µl Proteinaz K solüsyonu eklendi ve vortekslendi. Lizis için 56°C'de 30 dk inkube edildi.
- 20 µl RNase A solüsyonu eklendi ve vorteks yapılarak 10 dk oda ısısında inkubasyona bırakıldı.
- 200 µl lizis solüsyonu eklendi. Homojen bir karışım elde etmek için 15 saniye vorteks yapıldı.
- 400 µl %50'lik etanol eklendi ve vorteks yapıldı.
- Hazırlanan lizat, spin column tüpüne aktarıldı.
- 6000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak yeni 2 ml'lik koleksiyon tüpü takıldı.
- 500 µl etanol eklemesi tamamlanan wash buffer I solüsyonundan eklendi 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak yeni koleksiyon tüpü takıldı.
- 500 µl etanol eklemesi tamamlanan wash buffer II solüsyonundan eklendi 12000 g'de 3 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak, spin column 1,5 ml'lik ependorfa takıldı.
- 200 µl elution buffer eklendi ve 2 dk oda ısısında inkubasyonu takiben 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Spin column atılarak 1,5 ml'lik ependorfa içerisinde saf DNA elde edildi.

QIAamp DNA Stool Kit Ekstraksiyonu

- 180-200 mg dışkı tartıldı ve 2 ml'lik ependorfa kondu.
- Herbir dışkı örneği için 1.4 ml ASL buffer eklendi. Örnek 1 dak veya dışkı homojenize olana kadar vortekslendi.
- 70 °C'de 5 dk. ısı ile muamele edildi.
- 15 sn vortekslendi ve 1 dk. son hızda santrifüj yapıldı.
- Ependorf tüpüne 1.2 ml 'lik supernatant aktarıldı ve pellet atıldı.
- Herbir örneğe 1 adet InhibitEX tablet eklendi ve 1 dk. boyunca tablet süspense olana kadar vortekslendi. Süspansiyon 1 dk. oda ısısında inkübe edilerek InhibitEX matriks tarafından inhibitörlerin emilmesi sağlandı.

- InhibitEX matriks ile bağlanan pellet inhibitörler 3 dk. son hızda santrifüj edildi.
- Süpernatant yeni bir 1.5 ml'lik ependorf tüpüne toplandı ve pellet atıldı. Örnek 3 dk. son hızda santrifüj edildi.
- 15 µl proteinaz K, 1.5 ml'lik ependorf tüpüne eklendi.
- 200 µl AL buffer eklendi ve 15 sn vortekslendi.
- 70°C'de 10 dak inkübe edildi.
- Lizata 200 µl etanol (96–100%) eklendi ve vortekslendi.
- QIAamp spin column 2 ml'lik koleksiyon tüpüne takıldı. Elde edilen lizat QIAamp spin columnna aktarıldı ve son hızda 1 dak. santrifüj edildi. Santrifüjden sonra QIAamp spin columnna yeni bir koleksiyon tüpüne takıldı ve filtrat atıldı.
- QIAamp spin columnna 500 µl AW1 buffer eklendi. Son hızda 1 dak. santrifüj edildi. QIAamp spin columnna yeni bir koleksiyon tüpü takıldı ve filtrat içeren koleksiyon tüpü atıldı.
- QIAamp spin columnna 500 µl AW2 buffer eklendi. Son hızda 3 dk. santrifüj edildi ve filtrat içeren koleksiyon tüpü atıldı.
- QIAamp spin column yeni 1.5 ml ependorf tüpüne transfer edildi. QIAamp spin columnna 200 µl AE buffer eklendi ve 1 dk. oda ısısında inkübe edildikten sonra son hızda 1 dk. santrifüj edildi. Bu şekilde ependorf tüpünde DNA toplanmış oldu.

2.2.2.3. Primerler

Yapılan literatür araştırmalarında *S. Infantis* için konvansiyonel PCR ile belirlenmesinde kullanılan primerlere ait sekanslar yanında NCBI-BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] (Primer3, <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) (Rozen ve Skaletsky, 2000) web tabanlı programlar kullanılarak yeni primer dizaynı yapıldı. Dizayn primerin 18-26 bp (baz çifti) uzunlukta olmasına, primer çiftlerinin erime sıcaklıklarının (T_m , melting temperature) 50-65°C arasında değişmekle birlikte birbirlerine yakın olmasına, primer guanin-sitosin yüzdelerinin (%GC oranı) %40-60 arasında olmasına, primer çiftleri arasında ve primerler içerisinde komplementer baz dizilerinin bulunmamasına, primerlerde tekrarlayan baz dizilerinin olmamasına, primerlerin 3' uçlarında sıralı olmamasına özellikle dikkat edildi. Çalışmada kullanılan primerler çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 3. PCR tanısı için kullanılan primerler

Primer adı	Hedef gen	5' - 3'Primer dizini	PCR ürün boyutu(bp)
<i>invA</i>	STM2896	F-AAACCTAAAACCAGCAAAGG R-TGTACCGTGGCATGTCTGAG	605
<i>IMP1</i>	3113085/3114152	F-GGTCATTGTCTGGAAACCTGC R-ACATTCCCCCTTCCACTGCC	95
<i>IMP2</i>	3711271/3711921	F-CGCGAAGAAGTGCATAAACCC R-CGCCACTTTCGTTATCTGAG	198
<i>IMP3</i>	4621947/4622627	F-ACCTACTACTATCCCTGATG R-GCGAATTTTGCTACTTGAAG	304
<i>fliB</i>	faz 2 flagellar antijen	F-AACAACGACAGCTTATGCCG R-CCACCTGCGCCAACGCT F-TTGCTTCAGCAG ATGCTAAG R-CCACCTGCGCCAACG CT	727 413
<i>fliC</i>	faz 1 flagellar antijen	F- GCAGATCAACTCTCAGA CCCTGGG R- ACTTCGGTTTTGCCGTCTGC GCC	275
<i>Cyr</i>	Çalışmada kullanılan primerler <i>S. Infantis</i> 'in <i>sinI</i> geninden (Kabul No. J03391.1) dizayn edilmiştir.		

2.2.2.4. PCR Optimizasyonu

PCR karışımı her bir örnek için 25 µl'lik final hacim olacak şekilde, optimizasyon için primer, MgCl₂, dNTP, hedef DNA miktarları ve Ta ısı derecesi ve buna göre değişen PCR ddH₂O miktarları ile aşağıdaki gibi hazırlandı.

2.2.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Amplifikasyonları

PCR amplifikasyonları için Carattoli ve ark. (2005) tarafından önerilen yöntem ile optimize edildi. Amplifikasyonlar için kullanılan reaksiyon karışımı ve amplifikasyon koşulları aşağıda verilmiştir.

Reaksiyon karışımı:

Steril ddH ₂ O	14,8 µl
10xPCR tampon çözeltisi	2,5 µl
dNTP(10mM)	0,5 µl
Forward primer,10 pmol	1 µl
Reverse primer,10 pmol	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
Taq DNA polimeraz	0,2 µl

olacak şekilde 23 µl'lik hacime tamamlanarak hazırlandı.

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

Amplifikasyon Koşulları

94 °C, 3 dakika	}	30 siklus
94 °C, 1 dakika		
54 °C, 1 dakika		
72 °C, 1 dakika		
72 °C, 7 dakika		
+ 4 °C, ∞		

T_a (bağlanma sıcaklığı) her bir primer için ayrı ayrı $T_a (^{\circ}\text{C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ formülünden hesaplanırken, T_m (uzama süresi) beklenen PCR ürününün baz çifti (bç) cinsinden uzunluğuna göre tayin edildi.

2.2.2.6. Agaroz Jel Elektrophorez 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, 8 µl ethidium bromid ilave edilerek, 20 cm'lik yatay jel elektrophorez tablasına döküldü. 5 mm kalınlığında dökülen agaroz üzerine elektrophorez tırağı takılarak jelin katılaşması için 20 dakika beklenildi. Bu süre sonunda taraklar jele zarar vermeden çıkartıldı (Sambrook ve ark., 1989).

Jel elektrophorez tablası elektrophorez tankına yerleştirildikten sonra, elektrophorez tankın içerisine TBE tampon solüsyonu jelin 1 mm üstüne gelecek kadar ilave edildi. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinden 10µl alınarak, 2µl 6X loading dye ile karıştırıldı. Bu karışımın hepsi jele yüklendi. DNA örnekleri 180 voltta 60 dakika elektrophorez işlemine tabi tutuldu (Sambrook ve ark., 1989).

2.2.2.7. Görüntüleme işlemi

Jeldeki örnekler bilgisayarlı UV transillüminatör kutusu içine yerleştirilerek görüntülendi ve fotoğraflar çekilerek termal printerden kopyalar alındı.

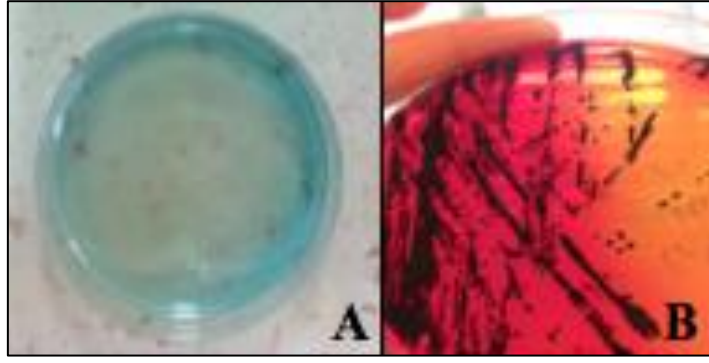
2.2.3. Ribotiplendirme

Ribotiplendirme yöntemi otomatize Riboprinter® (Dupont, USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. *S. Infantis* suşları PvuII restiriksiyon endonükleaz enzimiyle daha küçük fragmentlere parçalandı ve bu parçalar jel elektroforeziyle birbirinden ayrıldı. Ayrılan fragmentler jelden membrana transfer edilerek, 16S ve 23S rRNA operonuna spesifik kemilüminesans substratla işaretli prob yardımıyla hibridizasyona tabi tutuldu. Hibridizasyondan sonra bant profilleri elde edildi. Ribopattern adı verilen bu bantlar, referans bir veri bankasıyla karşılaştırıldı.

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Çalışmada incelenen 878 materyale (120 adet altlık, 240 adet sekal swap, 200 adet kloakal swap, 190 adet bağırsak içeriği, 59 adet yem ve 39 adet toz) ISO 6579 *Salmonella* izolasyon ve identifikasyon prosedürü uygulandı. Şekil 3.1’de izolasyon sırasında kullanılan MRSV ve XLD besiyeri örnekleri gösterildi. İzolasyon sonunda *Salmonella* şüpheli olarak bulunan suşlara biyokimyasal testler yapıldı. Test sonuçlarına göre glikoz ve sukroz pozitif, gaz oluşturan, laktoz negatif, H₂S üreten, LCD pozitif, ONPG negatif, VP negatif, üre negatif olan toplam 130 (% 14.8) *Salmonella spp.* suşu identifiye edildi. İdentifikasyonu tamamlanan 130 suşa Kauffmann-White şemasına göre serotiplendirme yapılmıştır. Serotiplendirme sonucunda *Salmonella* suşunun 118 (% 90.76)’i *S. Infantis*, 3 (% 2.3)’ü *S. Agona*, 2 (% 1.53)’si *S. Kentucky*, *S. Hadar* ve *S. Tennessee*, 1 (% 0.76)’i *S. Mbandaka*, *S. Montevideo*, *S. Enteritidis*, *S. Adelaide*, *S. Liverpool* ve *S. Derby* olarak bulundu (Serotiplerin antijenik formülleri çizelge 3.1’de; izolasyon ve identifikasyon sonuçları çizelge 3.2’de gösterildi).



Şekil 3.1. MRSV besiyerinde inkübasyon sonrası üreme görüntüsü (A); XLD üzerindeki şüpheli *Salmonella* kolonisi (B)

Çizelge 3.1. İzole ve identifiye edilen salmonella serotiplerinin antijenik formülleri

Serotip adı	Somatik O antijeni	Flagellar H antijeni	
		Faz 1	Faz 2
<i>S. Infantis</i>	6, 7, <u>14</u>	r	1,5
<i>S. Agona</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	f, g, s	[1,2]
<i>S. Kentucky</i>	8, <u>20</u>	i	Z ₆
<i>S. Hadar</i>	6, 8	Z ₁₀	e, n, x
<i>S. Tennessee</i>	6, 7, <u>14</u>	Z ₂₉	[1,2,7]
<i>S. Mbandaka</i>	6, 7, <u>14</u>	Z ₁₀	e, n, z ₁₅
<i>S. Montavideo</i>	6, 7, <u>14</u>	g, m, [p], s	[1,2,7]
<i>S. Enteritidis</i>	<u>1</u> , 9, 12	g, m	-
<i>S. Adelaide</i>	35	f, g	-
<i>S. Liverpool</i>	1, 3, 19	d	e, n, z ₁₅
<i>S. Derby</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	f, g	[1,2]

Çizelge 3.1. Tüm materyallerin izolasyon ve identifikasyon sonuçları

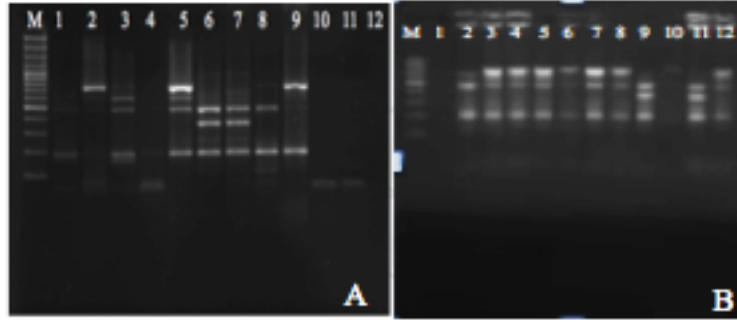
	Altlık n.120	Toz n.39	Sekal swap n.240	Kloakal swap n.40	Bağırsak içeriği n.190	Yem n.59
S. Infantis	47/120 (%39.16)	4/39 (% 10.25)	12/240 (% 5)	21/200 (% 10.5)	13/190 (% 6.84)	21/59 (% 35.59)
S. Kentucky	2/120 (% 1.66)	-	-	-	-	-
S. Agona	2/120 (% 1.66)	-	-	-	1/190 (% 0.52)	-
S. Montevideo	1/120 (% 0.83)	-	-	-	-	-
S. Mbandaka	1/120 (% 0.83)	-	-	-	-	-
S. Hadar	-	-	2/240 (% 0.83)	-	-	-
S. Tennessee	2/120 (% 1.66)	-	-	-	-	-
S. Enteritidis	1/120 (% 0.83)	-	-	-	-	-
S. Adelaide	-	-	1/240 (% 0.41)	-	-	-
S. Derby	-	-	-	-	-	1/59 (% 1.69)
S. Liverpool	-	-	-	-	-	1/59 (% 1.69)

3.2. Moleküler Tanı Bulguları

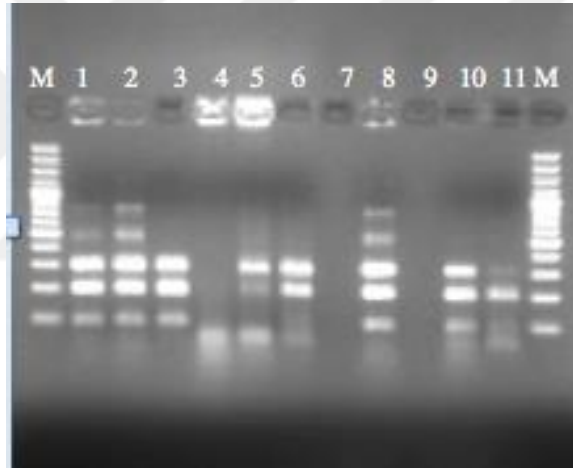
3.2.1. PCR Bulguları

S. Infantis'in moleküler tanısında *fljB* ve *fliC* PCR (Kardos ve ark., 2007) ile *IMP1*, *IMP2*, *IMP3* genlerine spesifik primerlerin kullanıldığı multiplex-PCR teknikleri (Akiba ve ark., 2010) kullanıldı. Bu tekniklerin spesifitesinin ortaya konması için pozitif ve negative kontrol suşları ile gerçekleştirilen çalışmada *fljB* primerleri ile *S. Infantis* suşlarının hiçbirinde spesifik bant tespit edilemediği gibi, *S. Liverpool*, *S. Enteritidis*, *S. Mbandaka*, *S. Typhimurium* ve *S. Gallinarum* DNA'ları ile de nonspesifik bant profilleri gözlemlendi. Akiba ve ark. (2010)'nın önerdiği primerlerle yapılan multipleks PCR sonucunda beş *S. Infantis* ve *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *S. Mbandaka* ve *S. Liverpool* nonspesifik bant profilleri tespit edildi (Şekil 3.1, Şekil 3.2). Bu yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar etkili ve yeterli olmadığı için yeni bir primer dizaynı yoluna gidildi. Dizayn primerle, altısı *S. Infantis* olmak üzere toplam 21 *Salmonella* serotipi ile konvansiyonel PCR yapıldı. PCR sonucunda tüm *S. Infantis*'lerde spesifik bant tespit edilmesinin yanısıra farklı olan serotipler negatif bulundu (Şekil 3.3'de gösterilmiştir).

Çalışma kapsamında daha önce Ribotiplendirme yapılmış ve ribopatternleri belirlenmiş *S. Infantis* suşlarına dizayn primeri kullanılarak PCR yapıldı. Ribotiplendirme sonucunda farklı serotip olarak isimlendirilen bu suşlar PCR sonucunda *S. Infantis* spesifik bantlar verdi. Bu suşların Kauffmann-White şemasına göre serotiplendirmesi yapıldı ve *S. Infantis* olduğu doğrulandı.



Şekil 3.2. *fljB*(A) ve *fliC* (B) primerleri kullanılarak farklı serotiplerle PCR (M;100bp, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 numaralı örnekler *S. Infantis*; 8 numaralı örnek *S. Liverpool*; 9 numaralı örnek *S. Enteritidis*; 10 numaralı örnek *S. Mbandaka*; 11 numaralı örnek *S. Typhimurium*; 12 numaralı örnek *S. Gallinarum*)



Şekil 3.3. Multipleks PCR primerleriyle farklı serotiplere uygulanan PCR (M: 100 bp marker, 1, 6, 7, 9 ve 10 numaralı örnekler, *S. Infantis*; 2 numaralı örnek *S. Enteritidis*; 3 numaralı örnek *S. Typhimurium*; 4 numaralı örnek *S. Gallinarum*; 5 numaralı örnek *S. Mbandaka*; 8 ve 11 numaralı örnek *S. Liverpool*)

Deteksiyon limitini belirlemek için *S. Infantis*'in 10 katlı dilüsyonu yapılarak, bakterilerin sayım sonuçları değerlendirildi. Sayım sonuçları çizelge 3.2'de verilmiştir. Tüm dilüsyonlar spektrofotometrede ölçüldü. Ölçüm sonuçlarına göre sırasıyla 10^{-1} 'lik dilüsyona göre DNA miktarı 388,3 ng/µl, 10^{-2} dilüsyonun DNA miktarı 38,7 ng/µl; 10^{-3} 'lük dilüsyonun DNA miktarı 3,3 ng/µl olarak bulundu. Tüm dilüsyonlara dizayn primerleriyle PCR yapıldı ve deteksiyon limiti 3,3 ng/µl olarak belirlendi.

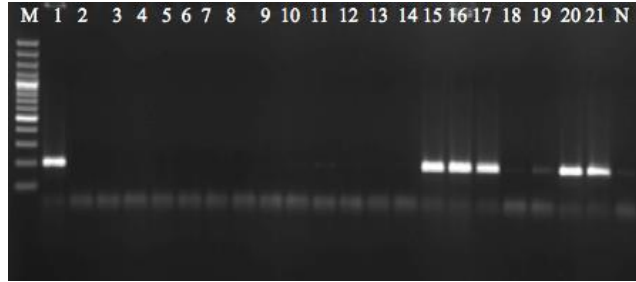
Çizelge 3. 3. S. Infantis’in 10 katlı dilüsyonu ve sayım sonuçları

Sıra	Serotip	Bakteri Sayımı
1	S.Infantis 10 ⁻¹	>10 ⁴ cfu/ml
2	S.Infantis 10 ⁻²	1040 cfu/ml
3	S.Infantis 10 ⁻³	111 cfu/ml
4	S.Infantis 10 ⁻⁴	12 cfu/ml
5	S.Infantis 10 ⁻⁵	1 cfu/ml
6	S.Infantis 10 ⁻⁶	(-)
7	S.Infantis 10 ⁻⁷	(-)
8	S.Infantis 10 ⁻⁸	(-)
9	S.Infantis 10 ⁻⁹	(-)
10	S.Infantis 10 ⁻¹⁰	(-)

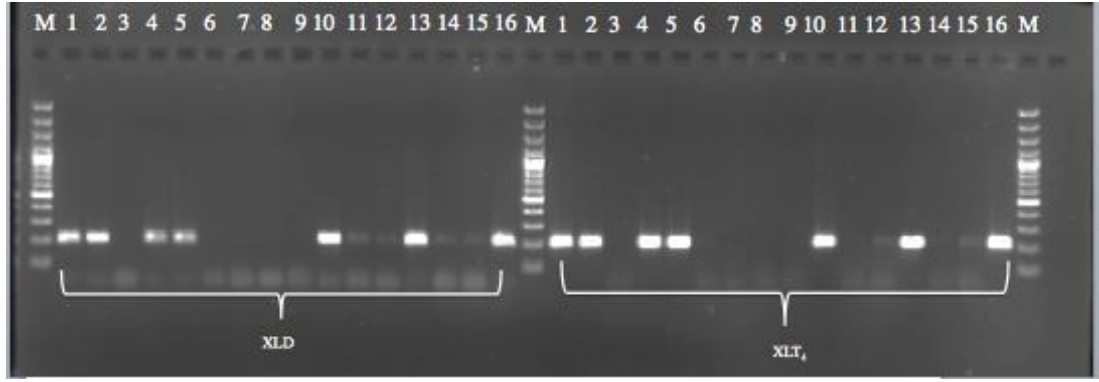
Çizelge 3. 4. ISO 6579 metodu aşamalarında yapılan PCR’in sonuçları

Gün	Zaman	ISO 6579 aşamaları	PCR sonucu
0. Gün	-	Direk	-
	6. saat	TPS	-
	12. saat		1 (% 14.28)
	18. saat		2 (% 28.57)
1. Gün	24. saat		2 (% 28.57)
	6. saat	MRSV	1 (% 14.28)
		MKTTn	-
	12. saat	MRSV	1 (% 14.28)
		MKTTn	-
2. Gün	18. saat	MRSV	3 (% 42.85)
		MKTTn	2 (% 28.57)
	24. saat	MRSV	4 (% 57.14)
		MKTTn	2 (% 28.57)
3. Gün	-	XLD agar	7 (% 100)
	-	XLT4 agar	7 (% 100)
4. Gün	-	Nutrient agar	7 (% 100)
11. Gün		Serotip İdentifikasyonu	7 (% 100)

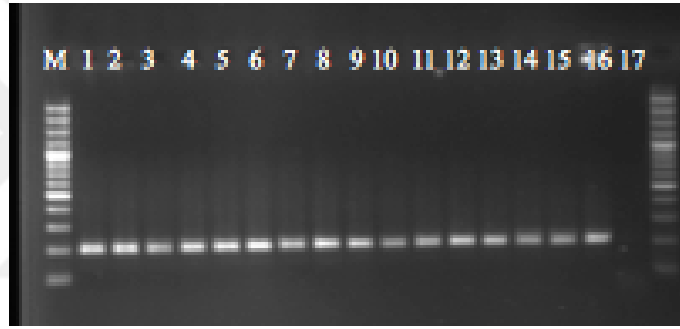
Çalışmada broyler kümeslerden alınan altlık, toz, kloakal svap, sekal svap, yem, bağırsak içeriğinden ISO 6579 metodu uygulandı. Prosedür sonunda, iki altlık, üç sekal svap, bir kloakal svap ve bir adet yem olmak üzere yedi adet *S. Infantis* izole ve identifiye edildi. Toplam 11 gün süren ISO 6579 metodu 1. gün; ön zenginleştirme (TPS), 2. gün; selektif zenginleştirme (MRSV ve MKTTn) aşamasının 6., 12., 18. ve 24. saatlerinde ve 3. gün; selektif besiyerlerine (XLD ve XLT4) ekim aşamasında örnekleme yapılarak dizayn primeriyle PCR gerçekleştirildi (çizelge 3.3’de gösterildi). Ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirme aşamalarında yapılan PCR sonucunda dizayn primerinin 6. 12 ve 18. saatlerde tespit ettiği *S. Infantis* oranları % 0- % 42. 85, 24. saatte yapılan örneklemede ise % 28.57- % 57.14 arasında değişkenlik gösterdiği belirlendi. İzolasyonun 3. gününde XLD ve XLT4’de; 4. günde ise Nutrient agarda üreyen *Salmonella* şüpheli kolonilerin dizayn primeriyle yapılan PCR sonucunda %100 oranında *S. Infantis* olduğu tespit edildi. Böylelikle 3. ve 4. günde yapılan PCR sonuçları izolasyon ve identifikasyon sonucuyla da doğrulandı (Şekil 3.3’de gösterildi). Bu durum ISO 6579 standardının en erken 3. gününde dizayn primeriyle yapılan PCR’ın kayıp yaşanmaksızın *S. Infantis*’i tespit edebildiğini ortaya koydu. Çalışmada ayrıca izole ve identifiye edilen tüm *S. Infantis*’lere *invA* primeri ile de bakıldığında %100 oranında invazyon geni taşıdıkları belirlenmiş oldu.



Şekil 3.4. Cyr F/R dizayn primerleriyle farklı *Salmonella* serotiplerinin ayrımı (M:100bp marker; 1,15,16,17,20 ve 21 numaralı örnekler *S. Infantis*; 2 numaralı örnek *S. Heidelberg*; 3 numaralı örnek *S. Agona*; 4 numaralı örnek *S. Newport*; 5 numaralı örnek *S. Stanleyville*; 6 numaralı örnek *S. Hadar*; 7 numaralı örnek *S. Mbandaka*; 8 ve 18 numaralı örnekler *S. Typhimurium*; 9 numaralı örnek *S. Colombo*; 10 numaralı örnek *S. Muenchen*; 11 numaralı örnek *S. Kentucky*; 12 numaralı örnek *S. Enteritidis*; 13 numaralı örnek *S. Virchow*; 14 numaralı örnek *S. Anatum*; 19 numaralı örnek *S. Mbandaka*; N: Negatif kontrol)



Şekil 3.4. XLD ve XLT₄'deki kolonilerin dizayn primeri ile tespiti (M: 100 bp marker; 1, 2, 4, 5, 10, 13, 16 numaralı örnekler *S. Infantis*; 3, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15 numaralı örnekler negatiftir)



Şekil 3.5. Nutrient agarda üremiş kolonilerin dizayn primeri ile tespiti (M: 100 bp marker; 1-16 numaralı örnekler *S. Infantis*; 17 numaralı örnek negatif kontrol)

4. TARTIŞMA

Salmonella Infantis, son yıllarda Avrupa Birliği'ndeki ve diğer ülkelerdeki kanatlı işletmeleri ve çevresel örneklerden izolasyon oranlarının artması nedeniyle giderek önem kazanmaktadır. Etkenin Avrupa Birliği 517/2011 yönetmeliği doğrultusunda zoonotik bir etken olarak değerlendirilmesi ve Avrupa Birliği'nde yakın gelecekte özellikle de damızlık sürülerindeki prevalanslarının azaltılması yönünde stratejilerin geliştiriliyor olması dikkate değer bir veri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında, salmonellozis vakalarında etkinliği hızla artan broyler kaynaklı *Salmonella* Infantis serovarlarının izolasyon ve identifikasyon prosedürü olan ISO 6579'a alternatif hızlı bir PCR tabanlı tanı tekniğinin oluşturulması ve optimizasyonu amaçlanmıştır.

Salmonella izolasyon ve identifikasyonu

Çalışmada incelenen 878 materyalde (altlık, toz, sekal swap, kloakal swap, bağırsak içeriği ve yem) %14.80 oranında *Salmonella* spp. izole ve identifiye edildi. *Salmonella* suşlarının % 90.76'si *S. Infantis*, %2.3'ü *S. Agona*, %1.53'ü *S. Kentucky*, *S. Hadar* ve *S. Tennessee*, %0.76'sı *S. Mbandaka*, *S. Montevideo*, *S. Enteritidis*, *S. Adelaide*, *S. Liverpool* ve *S. Derby* bulundu. Dünyadaki birçok ülkede de örneğin Belçika (Heyndrickx ve ark., 2007), Litvanya (Pieskus ve ark., 2006), Kore (Kim ve ark., 2007; Lee ve ark., 2007) ve Suudi Arabistan'da broyler kümeslerde *Salmonella* varlığı bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmalarla dünyada ve ülkemizde broyler üretiminde *Salmonella* kontaminasyonuna sebep olan kritik noktaların benzer olduğu ortaya konuldu. Bu bildirimler arasında; Marin ve ark., (2011) yaptıkları çalışmada dışkı örneklerinden %31.2, toz örneklerinden % 25 ve yem örneklerinden % 16 oranında *Salmonella* izole ve identifiye etmişlerdir. Padungtod ve Kaneene (2006), Tayland'da 425 adet tavuk kloakal swap 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 swap aldıkları 8911 broyler sürüsünün 490 (%5,5)' ndan *Salmonella* izole etmeleri çalışmada elde edilen *Salmonella* izolasyon oranından daha düşük kalmıştır.

S. Infantis, kanatlı işletmelerinden örneklenen farklı materyallerden farklı oranlarda izole edilebilmektedir. Bu çalışmada materyal bazında *S. Infantis* izolasyon sayısı ve oranları şu şekilde sıralandı: 47 (% 39.16) altlık örneği; 21 (% 10.5) kloakal swap ve yem örneği; 21

(% 35.59), bağırsak içeriği; 13 (% 6.84), 12 (% 5) sekal svap ve 4 (% 10.25) toz örneği. *S. Infantis*'in broyler kümeslerde varlığıyla ilgili olarak yapılan çalışmalarda; Raseta ve ark.(2015); Marin ve ark., (2011); Nogrady ve ark.,(2007) Macaristan'da *S. Infantis*'in broylerlerde %64 'lük yüksek prevelansını vurgulayarak, diğer Avrupa ülkelerinden Polonya 'da %8 ve Çek Cumhuriyeti'nde %2.5 oranında olduğunu bildirmişlerdir. EFSA (2007) raporuna göre EU'da % 22, Almanya'da %8.9 oranında *S. Infantis* bulunmaktadır.

Primer özgünlük ve duyarlılığı moleküler tanı testlerinin etkinliğinde en önde gelen faktörlerdendir. Bu çalışmada ilk olarak literatürde *S. Infantis*'i spesifik olarak saptadığı iddia edilen primerler (Kardos ve ark., 2007; Akiba ve ark., 2011) sentezlettiler primer spesifiklerinin test edilmesi amacıyla *S. Infantis*'i de içeren farklı *Salmonella* serotipleri ile PCR gerçekleştirildi. Kardos ve ark. (2007)'nin tasarladığı primerler *fliC* ve *fljB* *S. Infantis*'i ile non-spesifik bantlar verirken, Akiba ve ark. (2011)'nin geliştirdiği ve *S. Infantis*'e spesifik 3 farklı genomik bölgesinin eş zamanlı amplifikasyonuna dayalı multipleks-PCR tekniği ise *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Mbandaka* ve *S. Liverpool* ile de ortak bantlar verdiği görüldü. Bunun dışında, her iki yöntemin *S. Infantis* içerdiği bilinen farklı saha materyalleri ile yapılan testlerde etkeni doğru ve duyarlı bir şekilde saptamada başarılı olamadığı görüldü. Bu sonuç, tezin altın standart yöntem olan ISO 6579 yöntemine alternatif moleküler tanı geliştirme hipotezi dikkate alındığında *S. Infantis*'e spesifik yeni primer tasarımı gereksinimini ortaya koydu. Kardos ve ark. (2007) ve Akiba ve ark. (2011)'nin *S. Infantis* spesifik primer tasarımıdaki başarısızlığının nedeni sadece *in-silico* analiz sonuçlarına dayalı ve yeterli sayıda ve farklı *Salmonella* serotiplerinin kullanıldığı özgünlük testlerinin yapılmamasından kaynaklanmış olabileceği düşünüldü.

PCR ve PCR'a dayalı teknikler spesifik, duyarlı, güvenilir, hızlı ve kolay olmaları nedeniyle son yıllarda tanı ve tiplendirme amacıyla farklı bilimsel alanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada geliştirilen PCR tekniğinin DNA bazında deteksiyon limiti 3,3 ng/μl iken, bakteri sayısı olarak deteksiyon limiti 111 cfu/ml⁻¹ olarak belirlendi. Kardos ve ark. (2007)'nin geliştirdiği teknik *S. Infantis*'i 10⁵ cfu/ml⁻¹ düzeyinde saptarken, Akiba ve ark. (2011)'nin geliştirdiği teknikte ise sensitivite çalışması yapılmamıştır. PCR sensitivitesi primer sensitivitesi ile direkt ilişkili olup primerlerin çok kopya sayılı hedef genlere yönelik tasarlanması, kullanılan DNA ekstraksiyon yöntemi,

reaksiyona giren DNA yoğunluğu ve saflığı, tekniğin iyi optimize edilmiş olması PCR sensitivitesini arttırabilen etmenlerdir.

Çalışmada izole edilen tüm *Salmonella* suşlarında *invA* geni tespit edildi. İnvazyon geni olan *invA*, *Salmonella* virulensi için gereklidir ve birçok araştırmacı tarafından da çalışılmıştır (Mezal ve ark., 2013). Nashwa ve ark., (2009) tüm izole ettikleri *Salmonella*'larda genin amplifiye olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda potansiyel patojen *Salmonella* suşlarının *invA* geninin amplifikasyonu *Salmonella* cinsinin tespiti için uluslararası standart prosedür olarak kabul edilmektedir (Amini ve ark., 2010).

Bakterilerin tür düzeyinde tanısına yönelik primer tasarımının en önemli aşaması hedef genin doğru belirlenmesidir. Bu çalışmada, *S. Infantis*'e spesifik *sinI* (*S. Infantis* modification methylase) geni hedeflenerek bir çift primer tasarlandı. Primerler ile tüm *S. Infantis* izolat ve suşları ile gerçekleştirilen PCR testleriyle uygun büyüklükte ampikon (200 bp) tespit edilirken, diğer *Salmonella* serotiplerinin hiçbirinde aynı serogrupta bulunanlar da dahil olmak üzere bu büyüklükte ya da herhangi bir büyüklükte ürün oluşumu gözlenmedi. Kardos ve ark. (2007) çalışmalarında primer tasarımı için *fljB* genini seçerken, Akiba ve ark. (2011) ise *S. Infantis*'e spesifik 3 farklı genomik bölgeyi (*Infantis* spesifik region; ISR1, ISR2 ve ISR3) tercih etmişlerdir. Primerlerin hedefe spesifik olduğunu gösteren başka bir kanıt ise tezde çalışılan serotiplerin riboprinter ile tiplendirilmesi sonrasında olmuştur. Bu tiplendirme sonucunda farklı serotiplere yönelik ribopatternlerde *S. Infantis*'e spesifik bantlar vermiş, bu suşların ISO 6579 standart yöntemi ile çalışılması sonucunda ise aslında *S. Infantis* oldukları ortaya konmuştur. Sonuç olarak tez kapsamında gerçekleştirilen primer tasarımı sonucunda geliştirilen tanı tekniğinin literatürde yer alan tekniklerden daha üstün bir teknik olduğu düşünülmektedir.

Salmonella serotiplerinin ISO 6579 yöntemi ile identifikasyonu ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme, selektif besiyerlerine ekim, üreyen *Salmonella* şüpheli kolonilerin nutrient agara ekimi ve bu besiyerinde üretilmesini takiben biyokimyasal testler ve serolojik doğrulamasının ardından uygun antiserumlarla aglütinasyona dayanan ve uzun süren (7-10 gün) bir yöntemdir. Bu çalışmada, farklı yoğunluklardaki *S. Infantis* ile yapay olarak

kontamine edilen materyallerden ISO 6579 metodunun farklı aşamalarında (başlangıç, ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme) inkubasyonun farklı periyotlarında (6, 12, 18, 24. saatlerde) örnekleme yapıldı. DNA izolasyonunun ardından çalışmada yer alan primerlerle konvansiyonel PCR uygulandı. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda nutrient agarda üreyen *S. Infantis* suşlarının tamamı (%100) geliştirilen PCR ile analizin 4. gününde doğru olarak saptandı. Bir önceki aşama olan selektif besiyerlerinde (XLD, XLT₄) üreyen *S. Infantis* suşlarının ise (%100) analizin 3. gününde doğru olarak saptandı. Selektif zenginleştirme ve ön zenginleştirmede ise kayıplar olduğu gözlemlendi. Kayıpların besiyerleri bileşiminde yer alan ve PCR'ı inhibe edebilecek maddelerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada ilk aşamalarda meydana gelen tanı kayıpları internal kontrol stratejilerinin uygulanması, materyallerin ve/veya bunlara ait DNA'ların 10 katlı sulandırılarak kullanılması, ya da DNA konsantrasyonunu artırıcı DNA ekstraksiyon modifikasyonları veya DNA'yı spesifik olarak ortamdan izole edecek manyetik veya immunomanyetik separasyon tekniklerinin kullanımı ile çözülebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tamamlanan tezde Türkiye'deki farklı broyler işletmelerinden örneklenen değişik materyallerden (yem, bağırsak içeriği, kloakal, sekal ve drag svab örnekleri, vb.) %14,8 oranında *Salmonella* izole edildi. Bu izolatlar arasında %90,76 oranıyla *S. Infantis*' in en fazla izole edilen serotip olduğu belirlendi.

Tezde elde edilen bir başka önemli sonuç ise, *S. Infantis*'in teşhisi yönünden mevcut tekniklerle karşılaştığında özellikle de spesifite ve güvenilirlik açısından üstün bir tanı ve doğrulama tekniğinin geliştirilmiş olmasıdır. Bu teknik ile ISO 6579 prosedürü ile 11 gün süren identifikasyon süresi %100 doğrulukla 3 güne inmektedir. Teknikte kullanılan primerlerin ve tanı tekniğinin patentlenme potansiyeli yüksektir.

Tez kapsamında *S. Infantis*'in farklı yoğunluktaki bakteri dilüsyonları hazırlanarak farklı saha materyallerine uygulanmasına dayalı yapay olarak kontamine edilen materyallerden ISO 6579 metodunun farklı aşamalarında (başlangıç, ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme) inkubasyonun farklı periyotlarında (6, 12, 18, 24. saatlerde) örnekleme yapılmıştır. DNA izolasyonunun ardından çalışmada yer alan primerlerle konvansiyonel PCR uygulanarak materyal bazında sensitiviteyi belirlenmiştir. Yapılan literatür taraması sonrasında gerek incelenen materyal sayısı gerek materyal çeşitliliği gerek analiz stratejisi açısından bu kapsamda başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sonuç da gerçekleştirilen çalışmanın orijinalliğini ve etki değeri yüksek uluslararası dergilerdeki yayın potansiyelini ortaya koymaktadır.

Çalışmada kullanılan tanı tekniklerinin özellikle sensitivite yönünden geliştirilmeye açık olduğu düşünülmektedir. Bu geliştirme, DNA ekstraksiyon yöntemleri modifiye edilerek, DNA'nın PCR öncesinde saf bir şekilde ve kayıpsız elde edilmesine olanak sağlayan manyetik veya immunomanyetik separasyonu gibi tekniklerle desteklenmesi yanında ekstraksiyon sonrasında ise prob hibridizasyonuna dayalı real-time PCR ve diğer yeni PCR tabanlı tekniklerle mümkün olabilecektir.

ÖZET

Tavuklarda *Salmonella* Infantis İzolasyonu ve PCR Tabanlı Yöntemlerle Tanısı

Bu araştırmada, broyler kümeslere ait 120 adet altlık, 240 adet sekal svap, 200 adet kloakal svap, 190 adet bağırsak içeriği, 59 adet yem ve 39 adet toz örneği olmak üzere toplam 878 adet örnek *Salmonella* Infantis varlığı yönünden incelendi.

Salmonella izolasyon ve identifikasyon çalışmaları ISO 6579:2002/Amd 1:2007, Ek D standardı uygulanarak gerçekleştirildi. Prosedür dahilinde ön zenginleştirme için Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS), selektif zenginleştirme için Modified Rappaport Vasiliadis Semi Solid (MRSV) ve Muller Kauffmann Tetrathionat novobiocin Broth (MKTTn) ve izolasyon için selektif besiyeri olan , Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) ve Xylose Lysine Tergitol 4 (XLT₄) agar kullanıldı. *Salmonella* şüpheli bulunan kolonilerinin identifikasyonu, biyokimyasal ve serolojik yöntemlerle gerçekleştirildi.

Çalışmada incelenen 878 materyalde (altlık, toz, sekal svap, kloakal svap, bağırsak içeriği ve yem) %14,8 *Salmonella* spp. izole ve identifiye edildi. *Salmonella* suşlarının 90,76'i *S. Infantis*, %2,3'u *S. Agona*, %1,53'ü *S. Kentucky*, *S. Hadar* ve *S. Tenessee*, %0,76'ı *S. Mbandaka*, *S. Montevideo*, *S. Enteritidis*, *S. Adelaide*, *S. Liverpool* ve *S. Derby* bulundu. Çalışmadaki tüm materyallere direkt, TPS, MRSV, MKTTn, XLD ve XLT₄ aşamalarında inkübasyonun 6., 12., 18. ve 24. saatlerinde örnekleme yapılarak *invA*, *fljB* , *fliC* konvansiyonel *IMP1-IMP2-IMP3* primerleriyle multipleks PCR yapıldı. *invA* geninin varlığı %100 olarak tespit edilirken; tekli PCR ve m-PCR primerlerinin sonuçlarında *S. Infantis*'e ait spesifik bant elde edilemedi. ISO prosedürünün izolasyon aşamasını takiben oluşan şüpheli kolonilere yeni dizayn primeri CyrF/R ile PCR yapıldı. *S. Infantis* suşlarının tamamı (%100) geliştirilen PCR ile doğru olarak saptandı

S. Infantis'in moleküler tanısı için geliştirilen PCR tekniğinin altın standart yöntem olan ISO 6579 prosedürü ile karşılaştırılmalı değerlendirmesi sonucunda hızlı, tekrarlanabilir, ekonomik bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Broyler, ISO 6579, PCR, *Salmonella* Infantis

SUMMARY

Isolation of *Salmonella* Infantis in Chickens and its Detection by PCR Based Methods

In this research, *Salmonella* Infantis was examined from 120 litter, 240 ceecal swabs, 200 cloacal swabs, 190 intestinal contents, 59 feed and 39 dust samples. Total of 878 samples were collected from poultry house.

Salmonella isolation and identification procedure ISO 6579: 2002 / Amd 1: 2007, Annex D was performed. Pre-enrichment procedure within Buffered Peptone Water, selective enrichment with Modified Rappaport Vasilliadis Semi Solid (MRSV) and Mueller Kauffmann Tetrathionat novobiocin Broth and selective medium for the isolation of , Xylose Lysine Deoxycholate(XLD) and Xylose Lysine Tergitol 4 (XLT₄) agar was used. The identification of suspect *Salmonella* colonies which were performed by biochemical and serological methods.

The study examined that total of 878 material's (litter, ceecal swabs, cloacal swabs, intestinal contents and feed) *Salmonella* isolate rate is 14.8%. It was identified that % 90,76 *S. Infantis*, %2,3 *S. Agona*, %1,53 *S. Kentucky*, *S. Hadar* ve *S. Tenessee*, %0,76 *S. Mbandaka*, *S. Montevideo*, *S. Enteritidis*, *S. Adelaide*, *S. Liverpool* and *S. Derby* of the isolated *Salmonella* strains. Materials was collected stage of the BPW, MRSV, MKTTn, XLD and XLT₄ agar incubation period of 6., 12., 18., 24 hours. Then conventional and multiplex PCR was performed with primer of *invA*, *fljB* , *fliC* and IMP1-IMP2-IMP3. Primer of *invA* was detected %100 *Salmonella* strains but the other primers couldn't detect the *S. Infantis* strains. Hence, a new primer was designed. All strains of *S. Infantis* was detected with developed PCR analysis.

PCR technique for *S. Infantis* molecular diagnosis was developed that compared with the gold standard method ISO 6579 assessment procedure is thought to be an rapid, repeatable and economical alternative.

Key Words: Broiler, ISO 6579, PCR, *Salmonella* Infantis

KAYNAKLAR

- AABO S, RASMUSSEN OF, ROSSEN L, SORENSEN PD, OLSEN JE (1993). *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Mol Cell Prob.* **7**: 171-178.
- AKAN M (2008). Kanatlılarda *Salmonella* infeksiyonları ve kontrolünde temel prensipler. Veteriner Tavukçuluk Derneği, Mektup Ank.
- AKIBA M, KUSUMOTO M, IWATA T (2010). Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR. *J Microbiol Methods.* **85**: 9-15.
- ANONYMOUS (2003). Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC. Official *J Euro Union L.* **325**: 31-39.
- AMINI K, ZAHRACI TS, GHOLAMREZA N, REZA R, JAVID A, SHAHMAZ BA (2010). Molecular detection of invA and spv virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from human and animals in Iran *Afr J Microbiol. Res.* **4**: 2202–2210.
- ASAI T, ISHIHARA K, HARADA K, KOJIMA A, TAMURA Y, SATO S, TAKAHASHI T (2007). Long-term prevalence of antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Infantis in the broiler chicken industry in Japan. *Microbiology and Immunology.* **51**:111-115.
- AYDIN N, ATA Z (2008). Ankara bölgesindeki tavukçuluk işletmelerinden *Salmonella* spp. izolasyonu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* **55**:161-166.
- BAIRD P (1990). Foodborne salmonellosis. *Lancet.* **336**: 1231-1235
- BARROW PA, FREITAS NETO OC (2011). Pullorum disease and fowl typhoid - new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathol.* **40**: 1-13.
- BARROW PA, JONES MA, SMITH AL, WIGLEY P (2012). The long view: *Salmonella* - the last forty years. *Avian Pathol.* **41**: 413-420.
- BAUMLER AJ, HARGIS BM, TSOLIS RM (2000). Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. *Science.* **287**: 50-52.
- BERTRAND S, RIMHANEN-FINNE R, WEIL FX, RABSCH W, THORNTON L, PEREVOSCIKOV J, VAN PELT W, HECK M (2008). *Salmonella* infections associated with reptils: the current situation in Europe. *Euro Surveill.* **13**: 1-6.
- BOLTON DJ, PEARCE R, SHERIDAN JJ, MCDOWELL D.A. and Blair, I.S. 2003. Decontamination of pork carcasses during scalding and the prevention of *Salmonella* cross-contamination. *J Appl Microbiol.* **94**: 1036-1042.

- CARRAMINANA JJ, 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.
- CARATTOLI A, BERTINI A, FALBO V, HOPKINS KL, THRELFALL EJ (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* **63**: 219-228.
- CHESSA D, DORSEY CW, Winter M, BAUMLER AJ (2008b). Binding specificity of *Salmonella* plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics. *J Biol Chem.* **283**: 8118-8124.
- COHEN HJ, MECHANDA SM, LIN W (1996). PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella* typhimurium, a specific method for detection of *Salmonella* spp. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 4303- 4308.
- DAVIES PR, SCOTT HH, FUNK JA, FEDORKA-CRAY PJ, JONES FT (2004). The role of contaminated feed in the epidemiology and control of *Salmonella enterica* in pork production. *Foodborne Pathog Dis.* **1**: 202-215.
- DOUGAN G, JOHN V, PALMER S, MASTROENI P (2011). Immunity to Salmonellosis. *Immunol Rev.* **240**: 196-210.
- EFSA (2007a). Report of the Task Force on Zoonoses. Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flock. *The EFSA J.* **97**:1-85.
- EFSA (2007b). Report of the Task Force on Zoonoses. Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks Part A. *The EFSA J.* **98**:1-85.
- EFSA (2007c). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA J.* **130**:1-353.
- EFSA (2009). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *The EFSA J.* **223**:1-313.
- EFSA (2011). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in broilers. *EFSA J.* **9**: 2106 [94 pp.].
- EFSA (2012). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on special measures to reduce the risk for consumers through *Salmonella* in table eggs-e.g. cooling of table eggs. *The EFSA J.* **957**: 1-19.
- ELLINGSON JL, ANDERSON JL, CARLSON SA, SHARMA VK (2004). Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. *Mol Cell Prob.* **18**: 51-57.
- EWING H (1986). *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. 4 ed, NewYork, NY: Elsevier

- FORSHELL LP, WIERUP M (2006). *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal foods products. *Revue Scientifique Technique Office International des Epizooties*, Paris, **25**:541-554.
- GANTOIS I, DUCATELLE R, PASMANS F, HAESEBROUK F, GAST R, HUMPHREY T J, VAN I F (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev.* 718-738.
- GRIMONT PAD, GRIMONT F, BOUVET P (2000). Taxonomy of the Genus *Salmonella*, In: *Salmonella* in domestic animals, Wray, C., Wray, A., p.1-17, cap.1, CABI Publishing, New York.
- GRIMONT PAD, WEILL F (2007). Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. 9th ed. Paris: WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella Institute Pasteur.
- HEIN I, FLEKNA G, KRASSNIG M, WAGNER M (2006). Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: an alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *J Microbiol Methods.* **66**: 538–547.
- HENDRIKSEN RS, VIEIRA AR, KARLMOSE S, LO FO WONG DM, JENSEN AB, WEGENER HC, AARESTRUP FM (2011). Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: Results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis.* **8**: 887-900.
- HEYNDRIKX M, HERMAN L, VLAES L, BUTZLER JP, WILDEMAUWE C, GODARD C, DE ZUTTER L (2007). Multiple typing for the epidemiological study of the contamination of broilers with *Salmonella* from the hatchery to the slaughterhouse. *J Food Prot.* **70**: 323–334.
- HOLT PS, CHAUBAL LH (1997). Detection of motility and putative synthesis of flagellar proteins in *Salmonella* pullorum cultures. *J Clin Microbiol.* **35**: 1016- 1020.
- HOORFAR J, MALORNY B, ABDULMAWJOOD A, COOK N, WAGNER M, FACH P (2004). Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J Clin Microbiol.* **42**: 1863-1868.
- HORNICK RB, GREISMAN SE, WOODWARD TE, DUPONT HL, DAWKINS AT, SYNDER MJ (1970). Typhoid fever: pathogenesis and immunologic control. *N Engl J Med.* **283**: 686-691
- ISO 6579 (2002). Microbiology of food and animal feeding stuff- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization. Ceneva-Switzerland.
- ISO (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Amendment 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage (ISO 6579:2002/A1:2007). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland

- ISO (2012). Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique (EN ISO/TS 6579-2). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- İZGÜR M (2002). *Salmonella* infeksiyonları In: *Kanatlı Hayvan Hastalıkları*, Ed.: M. İzgür, M. Akan, Ankara: Medisan Yayınevi, s.: 41-53.
- İZGÜR M (2006). *Salmonella* İnfeksiyonları In: *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*, Ed.: N. Aydın, J. Paracıkoğlu, Ankara: İlke-Emek Matbaacılık ve Yayıncılık, s.: 116-121.
- JONES TF, INGRAM LA, CIESLAK PR, VUGIA DJ, TOBIN-D'ANGELO M, HURD, S, MEDUS C, CRONQUIST A, ANGULO FJ (2008). Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *J Infect Dis* **198**: 109-114.
- JOSEFSEN MH, KRAUSE M, HANSEN F, HOORFAR J (2007). Optimization of a 12-hour TaqMan PCR-based method for detection of *Salmonella* bacteria in meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3040–3048.
- KARDOS G, FARKAS T, ANTAL M, NOGRADY N, KISS I (2007). Novel PCR assay for identification of *Salmonella enterica* serovar Infantis. *J Appl Microbiol.* **45**:421-425.
- KIM A, JU LEE Y, KANG MS, KWAG SI, CHO JK (2007). Dissemination and tracking of *Salmonella spp.* in integrated broiler operation. *J Vet Sci.* **8**: 155–161.
- KINGSLEY RA, BAUMLER AJ (2000). Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. *Mol Microbiol.* **36**: 1006-1014.
- KWANG J, LITTLEDIKE ET, KEEN JE (1996). Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Lett Appl Microbiol.* **22**: 46-51.
- LE MINOR L (1992). The Genus *Salmonella*. In: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application, Ed.: Balows A, Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. 2nd Ed., Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 2760-2774.
- LEE SJ, ROMANA LK, REEVES PR (1992). Sequence and structural analysis of the *rfb* (O antigen) gene cluster from a group C1 *Salmonella enterica* strain. *J Gen Microbiol* **138**: 1843 – 1855.
- LEE YJ, KIM HJ, PARK CK, KIM KS, BAE DH, KANG MS, CHO JK, KIM JW, KIM BH (2007). Characterization of *Salmonella spp.* isolated from an integrated broiler chicken operation in Korea. *J Vet Med Sci.* **69**: 399–404.
- LUBLIN A, MALER I, MECHANI S, PINTO R, SALDINGER SS (2015). Survival of *Salmonella enterica* serovar Infantis on and within stored table eggs. *J. Food Prot.* **78**: 287-292.
- LUK JMC, KONGMUANG R, REEVES PR, LiINFBERG AA (1993). Selective amplification of abequose and paratose synthase genes (*rfb*) by polymerase chain reaction for identification of *Salmonella* major serogroups (A, B, C2, and D). *J Clin Microbiol.* **31**: 2118–2123.

- MALORNY B, HOORFAR J, HUGAS M, HEUVELINK A, FACH P, EILLERBROEK L, BUNGE C, DORN C, HELMUNTH R (2003). Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. *International J Food Microbiol.* **89**: 241-249.
- MALORNY B, PACCASONI E, FACH P, BUNGE C, MARTIN A, HELMUTH R (2004). Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl Environ Microbiol.* **70**: 7046–7052.
- MAKINO S, KURAZONO H, CHONGSANGUAM M, HAYASHI H, CHEUM 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.
- MARIN C, BALASCH S, VEGA S, LAINEZ M (2011). Sources of *Salmonella* contamination during broiler production in Eastern Spain. *Prev Vet Med.* **98**: 39-45.
- MERTES F, BIENS K, HANS L, WAGNER M, DAHL A (2010). High-throughput universal probe *Salmonella* serotyping (UPSS) by nanoPCR. *J Microbiol Met.* **83**: 217-223.
- MEZAL E, STEFANOVA R, KHAN AA (2013). Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar javiana from food, environmental and clinical samples. *Int. J. Food Microbiol.* **164**: 113-118.
- MURRAY PR, ROSENTHAL KS, KOBAYASHI GS, PFALLER MA (2002). Medical microbiology. 4th ed. United States of America, Harcourt health sciences, pp: 266-280
- NASHWA HM, MAHMOUD AH, ADAWY S (2009). Application of multiplex polymerase chain reaction (M-PCR) for identification and characterization of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium. *J Faculty Vet Med.* **5**: 2343–2348.
- NOGRADY N, TOTH A, KOSTYAK A, PASZTI J, NAGY B (2007). Emergence of multidrug-resistant clones of *Salmonella* Infantis in broiler chickens and humans in Hungary. *J Antimicrob Chemother.* **60**: 645–648.
- NOGRADY N, KIRALY MI, DAVIES R, NAGY B (2012). Multidrug resistant clones of *Salmonella* Infantis of broiler origin in Europe. *Int J Food Microbiol.* **157**:108-12.
- OIE (2012). Fowl typhoid and pullorum disease. OIE terrestrial Manual. Chap. 2.3.11.
- PADUNGTOOD P, KANEENE JB (2006). *Salmonella* in food animals and human in northern Thailand. *Int. J Food Microbiol,* **108**: 346-354.
- POPOFF MY, BOCKEMUHL J, BRENNER FW (1998). Supplement 1997 (no.41) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol.* **149**: 601-604.
- POPOFF MY, BOCKEMUHL J, GHEESLING LL (2004). Supplement 2002 (no.46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol.* **155**: 568-570.

- PIESKUS J, MILIUS J, MICHALSKIENE I, ZAGREBNEVIENE G (2006). The distribution of *Salmonella* serovars in chicken and humans in Lithuania. *J Vet Med.* **53**: 12-16.
- RASETA M, DJORDJEVIC V, VIDERNOVIC D (2015). Contamination routes of *S. Infantis* in food chain of broiler meat production and it's significance for public health. *Proce Food Sci.* **5**: 254-257.
- ROZEN S, SKALETISKY HJ (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers", pp: 365-386. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Editors: Krawetz, S., Misener, S. New Jersey: Humana Press, Totowa
- SHANMUGASAMY M, VELAYUTHAM T, RAJESWAR J (2012). *InvA* gene specific PCR for detection of *Salmonella* from broilers. *Vet. World* **4**: 562-564.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- SANCHEZ S (2006). Making PCR a normal routine of the food microbiology lab. *PCR Met Foods.* Syf: 51–68.
- SAREYYÜPOĞLU B, ÇELİK OA, CANTEKIN Z, YARDIMCI H, AKAN M, AKÇAY A (2008). Polymerase chain reaction detection of *Salmonella* spp. in fecal samples of pet birds. *Avian Dis.* **52**: 163-167.
- SKOV MN, MADSEN JJ, RAHBK C, LODAL J, JESPERSEN JB, JORGENSEN JC, DIETZ HH, CHRIEL M, BAGGESEN DL (2008). Transmission of *Salmonella* between wildlife and meat-production animals in Denmark. *J Appl Microbiol.* **105**: 1558-1568.
- THORNS CJ (2000). Bacterial food-borne zoonoses. *Rev Sci Tech.* **19**: 226-239.
- TOBOLDT A, TIETZE E, HELMUTH R, JUNKER E, FRUTH A, MALORNY B (2013). Population structure of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:b: strains and likely sources of human infection. *Appl Environ Microbiol.* **79**: 5121-5129.
- TOMAS D, RODRIGO A, HERNANDEZ M, FERRUS MA (2009). Validation of real-time PCR and enzyme-linked fluorescent assay-based methods for detection of *Salmonella* spp. in chicken feces samples. *Food Anal Method.* **2**: 180–189.
- TÜKEL Ç, AÇELİK M, DE JONG MF, ŞİMŞEK Ö, TSOLIS RM, BAUMLER AJ (2007). MarT activates expression of the MisL autotransporter protein of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J Bacteriol.* **189**: 3922–3926.
- VANDEPLAS S, DUBOIS DR, BECKERS Y, THONART P, THEWIS A (2010). *Salmonella* in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level. *J Food Prot.* **73**: 774-785.
- WARD LR, THRELFALL J, SMITH HR, O'BRIEN SJ (2000). *Salmonella enteritidis* epidemic. *Science.* **287**:1753-1754.

- WEDDERKOPP A, GRADEL KO, JORGENSEN JC, 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.
- WEGENER HC, BAGESSEN DL (1996). Investigation of an outbreak of human Salmonellosis caused by *Salmonella enterica ssp. enterica* serovar Infantis by use of pulsed field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol*, **32**: 125-131.
- WIDJOJOATMODJO MN, FLUIT AC, TORENSMA R, KELLER BH, VERHOEF J (1991). Evaluation of the magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **10**: 935-938.
- WILSON IG (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 3741–3751.
- WOLLIN R (2007). A study of invasiveness of different *Salmonella* serovars based on analysis of the Enter-net database. *Euro Surveill.* **12**: 5-8.
- YAN SS, PENDRAK ML, ABELA-RIDDER B, PUNDERSON JW, PEDORKO DP, FOLEY SL (2003). An overview of *Salmonella* typing public health prespectives. *Clin Applied Immunol Rev.* **4**: 189-204.
- ZHAO S, QAIYUMI S, FRIEDMAN S, SINGH R, FOLEY SL, WHITE DG, MCDERMOTT PF, DONKAR T, BOLIN C, MUNRO S, BARON EJ, WALKER RD (2003). Characterisation of *Salmonella enterica* serotype Newport isolated from humans and food animals. *J Clin Microbiol.* **41**: 5366-5371.
- ZIEMER CJ, STEADHAM SR (2003). Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. *Lett Appl Microbiol.* **37**: 463-469.

EKLER

Ek-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :01/ 08/ 2012
TOPLANTI NO :2012-16
DOSYA NO :2012-71
KARAR NO :2012-16-101

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerinden Vet.Hek.Özlem Şahan'ın araştırma yürütücüsü olduğu, Vet.Hek.Özlem Şahan ve Doç.Dr.Bariş Sareyyüpoğlu'nun ortak çalışmaları olan "Tavuklarda Salmonella Infantis'in ISO 6579 Metodu ve PCR Tabanlı Yöntemlerle Tanısı" başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışmanın Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre;

- ☒ Uygun bulunarak onaylanmasına,
☐ Düzeltilmesine,
oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı	Özlem
Soyadı	ŞAHAN YAPICIER
Doğum yeri ve tarihi	İstanbul, 1982
Uyruğu	TC
Medeni durumu	Evli
Askerlik durumu	-
İletişim adresi ve telefonu	ozlem-sahan@hotmail.com 05325849864

II- Eğitimi

2001-2006 Akdeniz Üniversitesi Veteriner Fakültesi	
1994- 2000 Ankara/Polatlı Anadolu Lisesi-Erzincan Anadolu Lisesi	
Yabancı dili	İngilizce

III- Ünvanları

Araştırma Görevlisi
Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

12/2006-08/2008	Tesco Kipa Mağazası, Aydın Et-Balık Departman Şefi
07/08-2005	Ümitköy Hayvan Hastanesi, Ankara Stajyer
07/08-2004	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara Stajyer

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti

Ankara Mikrobiyoloji Derneği

Veteriner Hekimler Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Sözlü Sunum

1. **Şahan Ö.**, Müştak H.K., Torun E., Akan, M., Diker K.S. (2012): *Salmonella* Infantis tanısında serotiplendirme ve ribotiplendirme yöntemlerinin karşılaştırılması. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası
2. **Şahan Ö.**, Diker K S , Akan M. (2015): Broyler Üretiminde *Salmonella* Infantis'in Epidemiyolojik Tiplendirmesi için Ribotiplendirme Yönteminin Kullanılması. 3. Uluslararası Beyaz Et Kongresi, Antalya
3. **Sareyyupoglu B.**, Akan M, Şahan O, Aral EM. (2015): *Mycoplasma iowae* isolation from broiler breeder chickens in Turkey. Progress in Human and Animal Mycoplasmaology Congress, İstanbul
4. Sareyyupoglu B, Akan M, **Şahan Ö.**, Aral EM.(2015): Nested-PCR Assays for the detection of avian pathogenic mycoplasmas in poultry. Progress in Human and Animal Mycoplasmaology Congress, İstanbul

Poster Sunum

1. Karacan N, Şahan Ö, Akan M.(2014): Tavuklardan İzole Edilen E.coli Suşlarının Antibiyotik Direnci ve Serotip Dağılımı. XXXVI.Türk Mikrobiyoloji Kongresi,Antalya
2. Şahan Ö, Aral EM, Aden M M A , Aksoy A, Akan M.(2014): Tavuklardan izole edilen *Salmonella* serovarlarının dağılımı ve antibiyotik direnci. XI.Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi,Antalya
3. Kaya İ B, Şahan Ö, Akan M, Diker K S. (2014): Farklı sıcaklıkların *Salmonella* Enteritidis'in üreme eğrisi üzerine etkisi. XI.Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya
4. Şahan Ö, Torun E, Mete Ş, Müştak H K, Akan M, Diker K S. (2014): Saha örneklerinden direkt *Salmonella* tanısında gerçek zamanlı PCR

- sisteminin (BAX) özgülük ve duyarlılığının değerlendirilmesi, 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Ankara
5. Müştak H K, Divanoğlu Y, Torun E, Şahan Ö, Yardımcı H, Akan M, Diker K S (2014): Sığırlarda enfeksiyona neden olan yedi patojen bakterinin çoklu ve gerçek zamanlı PCR ile tanısı. 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara
 6. Divanoğlu Y, Şahan Ö, Müştak H K, Karacan N, Diker K S (2014): *Salmonella* Infantis tanısında serotiplendirme ve 16S rRNA dizi analizi . 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeler

1. Büyük ve Küçük Ruminantlarda Abortif Bakteriyel Patojenlerin Tanısı için Real-Time Multiplex PCR Tekniklerinin Gelistirilmesi. BAP 01.05.2013-01.10.2015, Araştırmacı
2. Tavuk ve Hindilerde Bakteriyel Solunum Sistemi İnfeksiyonlarının Tanısı İçin PCR-Tabanlı Testlerin Geliştirilmesi . TÜBİTAK 01.10.2012-01.10.2015, Bursiyer
3. Keçi sütlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin ve vankomisin dirençliliğinin araştırılması Araştırmacı

Yayınlar

1. Saçaklı P., Çalık A., Bayraktaoğlu A.G., Ergün, A., Şahan Ö., Özyayın S., Effect of Clinoptilolite and/or Phytase on Broiler Growth Performance, Carcass Characteristics, Intestinal Histomorphology and Tibia Calcium and Phosphorus Levels, 2015, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi
2. Öztürk, D.; Türütoğlu, H; Şahan, Ö., Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonization at clinics of a Faculty of Veterinary Medicine, 2015, Eurasian Journal of Veterinary Sciences

3. Babacan, O., Bař, B., Müştak H.K., şahan, Ö., Tekin, O., Torun, E., Kedi ve köpeklerden izole edilen dermatofit etkenlerinin retrospektif değeriendirilmesi., 2011, Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi

VIII- Diğer Bilgiler

Veteriner Tavukçuluk Derneği Yönetim Kurulu üyelięi

