



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TAVUK ORİJİNLİ SALMONELLA SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER ANALİZİ

Merve ÖZDAL SALAR

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI**

**ANKARA
2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TAVUK ORİJİNLİ SALMONELLA SUŞLARINDA
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN KONVANSİYONEL VE
MOLEKÜLER ANALİZİ**

Merve ÖZDAL SALAR

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI**

**ANKARA
2022**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Tavuk Orijinli Salmonella Suşlarında Antibiyotik Dirençliliğinin Konvansiyonel ve Moleküler Analizi” 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: Merve ÖZDAL SALAR

Tarih:

İmza:

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1.GİRİŞ	1
1.1. Salmonella Tarihçesi	1
1.2. Salmonella'ların Genel Özellikleri	2
1.2.1. Etiyoloji	2
1.2.2. Antijenik yapı	3
1.2.3. Morfolojik, Kültürel ve Biyokimyasal Özellikler	4
1.2.4. Patogenez	5
1.2.5. Antibiyotik Direnci	9
2. GEREÇ VE YÖNTEM	12
2.1. Gereç	12
2.1.1. İncelenen Suşlar	12
2.1.2. Besiyerleri	12
2.1.3. Antibiyotik Diskleri	13
2.1.4. Standart Suşlar	13
2.1.5. PZR'de Kullanılan Cihaz, Kimyasal ve Tampon Solüsyonlar	13
2.2. Yöntem	14
2.2.1. Salmonella İzolasyon ve İdentifikasyonu	14
2.2.2. Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesi	15
2.2.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi	15
2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonları	17
2.2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu	17
2.2.3.2. Primerler	17
2.2.3.3. PZR Optimizasyonu	18
2.2.3.4. PZR Amplifikasyonları	18
2.2.3.5. Agaroz Jelin Hazırlanması, Yürütülmesi ve Görüntülemesi	20
3. BULGULAR	21
3.1. Antibiyotik duyarlılık testlerine ait bulgular	21
3.1.1. Disk diffüzyon bulguları	21
3.1.2. PCR bulguları	25
4. TARTIŞMA	28
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
ÖZET	40
SUMMARY	42
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	54

ÖNSÖZ

Salmonellozis, tüm dünyada hem insanlarda hem de hayvanlarda başta akut gastrointestinal sistem infeksiyonu olmak üzere entero-invaziv yayılma ile de diğer pek çok diğer organlarda lokalize formda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Veteriner hekimlik yönünden bakıldığında Salmonella infeksiyonları tüm çiftlik hayvanlarında gözlenmesine karşın, kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde en önemli zoonotik patojenlerin başında gelmektedir. Kanatlı hayvanlarda meydana getirdiği kayıplar nedeniyle işletmelerde ciddi ekonomik zararlara sebebiyet vermesinin yanında global düzeyde de kanatlı hayvanlardan elde edilen gıda ürünlerine bağlı gıda zehirlenmeleri nedeniyle halk ve insan sağlığı tehdidi yönünden ciddi problem teşkil etmektedir.

Hastalıkların tedavisi amacıyla hem insanlarda hem de hayvanlarda antimikrobiyallerin yoğun bir şekilde kullanımı tüm dünyada pek çok bakteri suşunda çoklu antibiyotik direnci gelişiminde ciddi bir artışa neden olarak global bir sorun olarak dikkatleri üzerine çekmeye devam etmekte ve her geçen gün insan ve halk sağlığı yönündeki kaygılarda artışa neden olmaktadır. Tüm dünyada insanlar için önemli gıda kaynaklarını oluşturan kanatlılar, balıklar ve deniz ürünlerinden izole edilen Salmonella suşlarında bildirilen çoklu antibiyotik direnci, ilgili patojenin tüm dünyada halk sağlığına ilişkin kaygılar içerisinde ilk sıralarda yer almasına neden olmaktadır. Her geçen gün artan antibiyotik dirençliliği ve buna paralel olarak şekillenen çoklu antibiyotik direncine sahip serovarların artışı, Salmonellozisin hayvanlarda kontrolünde karşılaşılan en ciddi sorunlar arasında olmaya devam etmektedir.

Doktora öğrenimim süresince yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Hakan Yardımcı'ya, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve yardımcılara, tez çalışmam için gerekli materyali ile güzel bir çalışma

ortamı sağlayan başta Prof. Dr. Mehmet Akan olmak üzere, laboratuvar sürecindeki yardımlarından dolayı başta Vet. Hek. Tajelser İdris Badri Adam ve Avitek Arge laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma, beni yetiştiren ve bugünlere getiren canım aileme ve son olarak da sabır ve destekleri için hayat arkadaşım Doç. Dr. Seçkin Salar'a gönülden teşekkür ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
+	Artı
-	Eksi
±	Artı-eksi
°C	Santigrad Derece
α	Alfa
CL	Korpus luteum
cm	Santimetre
g	Gram
μ g	Mikrogram
μ m	Mikrometre
mL	Mililitre
rpm	Devir/dakika
AMP	Ampisilin
BGA	Brillant Green Agar
C	Kloramfenikol
CAZ	Seftazidim
cfu	Koloni oluşturan birim
CIP	Siprofloksasin
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute
CN	Gentamisin
CTX	Sefotaksim
E	Eritromisin
ECDPC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
H ₂ S	Hidrojen sülfür
K	Kanamisin
LDC	Lizin dekarboksilaz
MDR	Çoklu ilaç direnci

NA	Nutrient Agar
NA	Nalidiksik asit
ODC	Ornitin dekarboksilaz
S3	Sulfonamid
S	Streptomisin
SCV	<i>Salmonella</i> içeren kesecik
<i>Spis</i>	<i>Salmonella</i> Patojenite Ada-1
SS	Shigella Agar
SXT	trimetoprim/ sülfametaksazol
TE	Tetrasiklin
TPS	Tamponlanmış Peptonlu Su
TSB	Tryptic Soy Broth
TSI	Triple Sugar Iron
T3SS	Tip 3 sekresyon sistemi
XLD	Ksiloz Lisin Deoksikolat Agar

ŞEKİLLER

- Şekil 3.1.** Disk diffüzyon yöntemi ile *Salmonella* suşlarında yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinin Mueller hinton agardaki örnek görüntüleri 22
- Şekil 3.2.** *Salmonella* Infantis suşlarının çalışmaya dahil edilen antibiyotiklere karşı dirençlilik yüzdeleri 23
- Şekil 3.3.** *Salmonella* Enteritidis suşlarının çalışmaya dahil edilen antibiyotiklere karşı dirençlilik yüzdeleri 24
- Şekil 3.4.** *Salmonella* Thyphimurium suşlarının çalışmaya dahil edilen antibiyotiklere karşı dirençlilik yüzdeleri 25
- Şekil 3.5.** Jeldeki DNA örneklerinin elektroforez işlemi ile görüntülenmesi 26
- Şekil 3.6.** Çalışmaya dahil edilen *Salmonella* serovarları ve ilgili direnç genlerinin yüzdeleri 27

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Salmonellaların SPA-1 dışında sahip olduğu diğer patojenite adaları ve fonksiyonları	8
Çizelge 2.1. CLSI'ya göre <i>Salmonella</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık zon çapları	16
Çizelge 2.2. Genlerin baz dizileri, sıcaklıkları, PZR ürünlerinin uzunlukları ve referansları	18
Çizelge 2.3. aphA1, tetA ve aphA geni için mastermiks hazırlanma oranları	19
Çizelge 2.4. tetA ve aphA geni için PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı	19
Çizelge 2.5. gyrA geni için PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı	20

1.GİRİŞ

1.1. *Salmonella* Tarihçesi

Salmonella cinsinden ilk mikroorganizma on dokuzuncu yüzyılda raporlanmıştır. Carl Joseph Eberth isimli araştırmacı ilk kez tifoid basili 1880 yılında tifodan ölen bir insanın mezenterik lenf bezlerinden izole etmiştir. Gaffky ise 1884'te ilk olarak hem bakterinin izolasyonunu hem de morfolojik olarak ilk tanımlamasını yapmıştır. Daha sonra aynı özelliklere sahip etkenler 1886 yılında Salmon ve Smith tarafından domuz vebası olan domuzların bağırsağından izole edilmiştir. *Bacterium suispestifer* olarak isimlendirilen etken daha sonra *Salmonella choleraesuis* olarak değiştirilmiştir (Le Minor ve ark., 1982).

Pfeiffer ve Kolle (1896) ile Gruber ve Durham (1896) ise tifoid basili ile bağışık olan hayvanların serumlarını ortaya çıkarmış ve böylece serolojik analizlerin temelini atmışlardır. Widal (1896) ve Grunbaum (1896) tifo hastalarının tifoid basili ile aglütine serumlarını ortaya koymuşlardır. Gatner 1888 yılında *S. Enteritidis*, Loeferise 1892 yılında da *S. Typhimurium*'u rapor etmişlerdir. Jones ise 1913 yılında aglütinasyon yöntemi ile *S. Pullorum* 'u identifiye ettiğini bildirmiştir (Le Minor ve ark., 1982).

Salmonella'ların sınıflandırılması için antijenik yapılarının kullanılması günümüzde de etkinliğini sürdürmektedir. Lipopolisakkarit yapıdaki O (somatik) ve protein yapıdaki H (flagella) antijenlerinin analizi White tarafından 1926 yılında başlatılmış, Kaufmann tarafından 1941 yılında genişletilmiş ve bugüne kadar çok sayıda serovar bildirilmiştir. Serovarlar genellikle türün ilk izole edildiği şehir isimlerine göre isimlendirilmiştir (Brenner ve ark., 2000). Kauffmann-White şemasına göre düzenlenen ilk tablo 20 serotip içermektedir (Erdem, 2002). Günümüzde de antijenik klasifikasyonu yapılan *Salmonella*'lar Dünya Sağlık Örgütü tarafından bu

şemaya eklenmekte, güncelleştirilmekte ve aynı zamanda da Pasteur Enstitüsü'nün bir yayını olan "Research in Microbiology" isimli dergide düzenli olarak yayınlanmaktadır (Grimont ve Weill, 2007).

1.2. *Salmonella*'ların Genel Özellikleri

1.2.1. Etiyoloji

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Salmonella* cinsine ait bakteriler kendi içlerinde iki türe ayrılmaktadır. Bunlar *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olarak tanımlanmaktadır. *S. enterica* içinde 6 adet alt grup tanımlanmıştır. Bu gruplar *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *Houtenae* (IV), *S. enterica* subsp. *indica* (VI)'dır. Bazı kaynaklarda geçen roma rakamları (I-IV) Kauffman'ın (1970) biyokimyasal reaksiyonlarına göre bakterileri ayıran bir sınıflandırmayı ifade etmektedir (Grimont ve ark., 2000 ve İzgür, 2002).

Kanatlılarda *Salmonella* infeksiyonlarına neden olan serotipler, konak spesifik olanlar (*S. Pullorum*, *S. Gallinarum*) ve konak spesifik olmayanlar (Paratifo etkenleri: *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Virchow*, *S. Hadar*, gibi) olmak üzere iki temel grupta incelenmektedir. Konak spesifik olarak tanımlanan serotipler sadece kanatlı hayvanlarda infeksiyona neden olurken, konak spesifik olmayan serotipler ise, insanların da dahil olduğu geniş bir konak dağılımına sahiptirler. Bu serotipler arasında yer alanlara örnek olarak *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Newport*, *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Heidelberg*, *S. Stanley*, *S. Thomson*, *S. Virchow*, *S. Derby* sayılabilir (Anonim, 2016 ve Gast ve Porter Jr, 2020).

1.2.2. Antijenik Yapı

Salmonella’lar çok fazla sayıda serotipe sahiptir. Bunun temel sebebi sahip oldukları somatik O antijenleri, flagellar H antijenleri, yüzey antijenlerinden ve pilus antijenlerinden oluşan dört grup antijenik yapıdır. *Salmonella* türleri taşıdıkları O antijenleri ile gruplara, taşıdıkları H antijenleri ile de serovarlara ayrılırlar (Bell ve Kyriakides, 2002). O antijenleri polisakkarit yapısında ve ısıya dayanıklıdırlar. “H” antijenleri ise protein yapısındadırlar.

Her *Salmonella* grubunda bulunan somatik “O” antijenleri polisakkarit yapıdadır ve antijenler hücre duvarındaki proteinlere ve lipitlere bağlı olarak bulunmaktadır. Isıya dayanıklı olan bu antijenik yapı *Salmonella*’ları 60’tan fazla serogruba sınıflandıran 8 farklı faktör içermektedir. Bunlar 1, 2, 3, 4... gibi sayılar ile gösterilmekte ve aynı antijenlere sahip olan *Salmonella*’ların aynı grupta sınıflandırılıp grup isimleri harfler ile (A, B, C, D, ...Z gibi) tanımlanmaktadır (İzgür, 2002).

Flagellar “H” antijenleri sadece hareketli *Salmonella*’larda bulunan protein formunda, formole dirençli ancak ısıya duyarlılık gösteren antijenik yapılardır. Flagellar “H” antijeninin yapısında bulunan faktörler, iki alt grup içinde incelenmektedir. Faz 1 antijenik faktörler bazı türlerde bulunmaktadır ve küçük harfler ile tanımlanmaktadır (Bilgehan, 2004 ve İzgür, 2002). *Salmonella*’ların flagellar “H” antijen grubundan içerdiği antijenik faktör sayısına göre tez faktör içerenler monofazik; Faz 1 ve Faz 2 antijenlerinden her ikisini de taşıyanlar ise difazik bakteriler olarak isimlendirilmektedir. İki farklı flagellar antijene sahip olmaları, *Salmonella*’ları diğer enterik bakterilerden ayıran önemli bir özelliktir (İzgür, 2002 ve Nataro ve ark., 2011).

Yüzeyel antijenler ise, bakterilerin dış antijenik yapıları arasında bulunan glikolipid yapıdaki antijenlerdir. *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi C* ve *S. Typhi*’nin bazı suşlarında “Vi” antijenleri bulunmaktadır. Bu antijeni taşıyan *Salmonella* suşları “O” somatik antijenini maskeleydikleri için anti-O serumu ile aglutine olmamaktadırlar

(Bilgehan, 2004 ve İzgür, 2002).

Salmonella türlerinin bazılarında bulunan ve pilus antijenleri olarak tanımlanan antijenler *Salmonella* serotiplendirilmesi yapılırken somatik antijenleri ve flagellar antijeni ile aglütine olarak analizleri daha fazla teste tabii tutulmasına neden olabilmektedir (Bilgehan, 2004).

1.2.3. Morfolojik, Kültürel ve Biyokimyasal Özellikler

Enterobacteriaceae familyasının genel özelliklerine sahip olan *Salmonella*'lar Gram negatif, kısa çomak şekilli olup, boyut ölçüleri 0.7-1.5x2.0-5.0 µm'dır. Genellikle boya uygulanan preperatlarda gruplanmadan birer birer görülebilen *Salmonella*'lar, spor ve kapsül bulundurmazlar. *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* hariç diğerleri hareketlidirler (İzgür, 2006).

Kolaylıkla üreyebilme özelliğine sahip *Salmonella* etkenleri laboratuvar ortamında fakültatif anaerob koşullarında, 37 °C'de 24 ile 48 saatte, katı kültür ortamında ise küçük ve yuvarlak S tipli koloniler, sıvı kültürlerde de homojen bir görüntü meydana getirmektedirler (Akan, 2008 ve İzgür, 2002). Bazı serotiplerinin 2-4°C veya 54 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda gelişim gösterebildiği, 70 °C ve üzeri sıcaklıkta ısıya duyarlı oldukları rapor edilmiştir (Pui ve ark., 2011). *Salmonella*'nın teşhisinde XLD (Ksiloz Lisin Deoksikolat Agar), SS (Shigella Agar), BGA (Brillant Green Agar), TSI (Triple Sugar Iron) gibi selektif diferansiyel besiyerleri sıklıkla kullanılan izolasyon ortamlarıdır. Ksiloz Lisin Deoksikolat Agar'da siyah merkezli, çevresi şeffaf hareli kırmızı, BGA agarda ise pembe koloniler oluşturmaktadır (Akan, 2008 ve Jajere, 2019). Sahadan toplanan dışkı ve çevresel örneklerden *Salmonella* izolasyonu yapılması için yapılan ön zenginleştirme aşamasında da Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS), selektif zenginleştirme aşaması için de Rappaport-Vassiliadis Broth veya Muller-Kauffmann kullanılmaktadır (ISO6579-1, 2017).

Ancak teşhiste kullanılan örnek yem, altlık gibi bir materyal ise izolasyon için yeterli *Salmonella* etkeni içermemesi nedeniyle ön zenginleştirmeye tabi tutulur. Zenginleştirme basamağının da ardından selektif zenginleştirme için XLD ya da BGA agara ekim yapılır. Şüpheli kolonilerden NA (Nutrient Agar)’a tek koloni olacak şekilde yayma ekim yapılır ve bakteriyoskopik muayenede Gram negatif çomaklar görülür. Nutrient Agar’daki üremenin ardından ayırıcı biyokimyasal testler ile *Salmonella* olduğu kesinleşir ve izolasyon gerçekleşir (Akan, 2008 ve İzgür, 2002).

Biyokimyasal aktiviteleri çok yüksek olan *Salmonella*’lar serotipleri arasında da farklı enzimatik sonuçlar verebilmektedir. Hidrojen sülfür (H₂S) oluşturmaları en önemli özelliklerin olsa da son zamanlarda H₂S negatif suşların varlığı da farklı araştırmacılar tarafından raporlanmıştır (Mourão ve ark., 2020 ve Xie ve ark., 2018). Laktozu fermente edemedikleri ancak Triple Sugar Iron (TSI) testinde glikozu fermente ettikleri gözlenmektedir. *Salmonella* Paratyphi A ve *Salmonella* Choleraesuis serovarları gaz oluşturmazken, *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Gallinarum ise gaz oluşturmaz sadece asit oluşturmaktadır. Üreaz enzimine sahip olmadıkları için üre testinde de negatif sonuç vermektedirler (Grimont ve ark., 2000 ve Quinn ve ark., 2011). İndol üretmezler ve VP (Voges Proskauer) reaksiyonları negatiftir. Sitratı kullanmakta ve jelatini eritmektedirler. Ornitin dekarboksilaz (ODC), Lizin dekarboksilaz (LDC) ve Metil red testi pozitifdir. Ancak *Salmonella* Paratyphi A’ nın LDC, *Salmonella* Gallinarum’un ise ODC reaksiyonu negatiftir (Jajere, 2019; Murray ve ark., 2003 ve Wray ve Wray, 2000).

1.2.4. Patogenez

Salmonella’ların serotip çeşitliliği hastalık yapma mekanizmalarında da etkisini göstermektedir. İnsanlarda infeksiyona sebep olan *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport* gibi serotipler çok sayıda konakçıya ve bu çok sayıda farklı konakçıda infeksiyon oluşturabilmektedirler (Foley ve ark., 2008). Ancak *S. Paratyphi*, *S. Typhi*,

S. Gallinarum, *S. Abortus ovis*, *S. Choleraesuis* ve *S. Dublin* gibi diğer serotipler ise daha sınırlı sayıdaki konakçıda infeksiyon oluşturabilmektedir (Uzzau ve ark., 2000).

Hareketsiz *Salmonella* etkenleri olan *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum*, karaciğer ve dalak gibi viseral organlarda canlı kalmak ve çoğalabilmek için mononükleer fagositik sistemi de konak olarak kullanma özelliğine sahiptir (Barrow ve ark., 1994). *Salmonella* türlerinin makrofaj hücre içerisinde dahi çoğalabilmelerine rağmen dendritik hücreler içinde canlılıklarını sürdürebilme ve üreme yeteneğine sahip olmadıkları bilinmektedir (Tierrez ve García-del Portillo, 2005). Normal şartlarda bakteride yabancı cisim varlığından dolayı hücrenin immun yanıtı uyarılıp, lizozomların füzyonu ve hücre içi bakterileri parçalaması için sindirim enzimlerinin salgılanması ile sonuçlanmaktadır. Ancak *Salmonella*, bakterinin bu bölümünün yapısının değişimine sebep olacak diğer efektör proteinleri vakuole yerleştirmek için tip III sekresyon sistemini kullanmaktadır. Yeniden modellenen vakuol, lizozomların füzyonunu bloke ederek; hücre içindeki bakterilerin hayatta kalmasına ve çoğalmasına izin vermektedir. Bu şekilde bakterinin makrofajlar içerisinde hayatta kalmasına ve retiküloendotelial sisteme taşınmasına izin vermektedir (Eng ve ark., 2015). Ancak T hücrelerinin spesifik olan ve spesifik olmayan antijenik yapılara yanıt verme kapasitesini etkilediğinden immun sistemin baskılandığı ve dolayısıyla seksüel hormonlardaki artış ile bu bakteriler reproduktif sistemde yayılım göstermektedirler (Wigley ve ark., 2005).

Paratifo etkenlerinde ise farklı bir adhezyon ve invazyon mekanizması bulunmaktadır. Adhezyon için fimbrial (chaperone-ushe, uzun polar fimbria, tip IV pili) ve nonfimbrial (autotransported) adhezinleri kullanan bakteriler *pefA* genleri tarafından kontrol edilmektedir (Wagner ve Hensel, 2011). *Salmonella*'ların midedeki asit salgısından etkilenmemeleri ve özellikle de sekuma kolonize olabilmeleri son derece önemlidir (Kwon ve Ricke, 1998). Bu bakteriler tutunmak için ince bağırsak, kolon ve özellikle tavuklarda sekum gibi intestinal sistemde ilerleyerek yüksek pH ortamına doğru ilerlerken sindirim kanalında bulunan epitelial ve bağışıklık hücreleri ile yarışmaktadırlar. Flagellar ve fimbrial virulens özellikleri sayesinde enterosit ve M

hücreleri ile temasa geçtikten sonra epitele tutunma sağlamaktadır (Kutu, 2017).

Bakterinin epitele tutunmasıyla fagositik olmayan konak hücrelerine erişebilmek için kendi fagositozunu tetikleyen bir sistem olan T3SS (Tip 3 sekresyon sistemi) çalışmaya başlamaktadır. Kompleks multiprotein yapıda olan bu sistem, bakteri sitoplazması ve konakçı hücre zarı arasında kanal görevi taşımaktadır (Schlumberger ve Hardt, 2006). *Salmonellalarda* bu sistemi kodlayan yani bakteri proteinlerini bağırsak lümenine enjekte eden sistemi kodlayan *Salmonella* Patojenite Ada-1 (*Spis*) geni ve düzenleyicisi *HilA* genidir (Bohez ve ark., 2006).

Tip 3 sekresyon sistemi içinde bulunan *SopB* salgı yolunun aktivasyonu ile yangıyı oluşturmaktadır. Oluşan yangı insanda (Hopkins ve Threlfall, 2004) ve sığırdaki (Mirol ve ark., 1999) diyare oluşmasına, hücrelerde iyon dengelerindeki farklılaşma ile sindirim kanalına sıvı akışının artmasına neden olmaktadır. *SopA*, *SopD*, *SopE2* ve *SipA* *Salmonella* 'nın neden olduğu gastroenteritte rol oynamaktadır (Wallis ve Galyov, 2000). Konakçı hücre çeperinde içten dışa yönelik bir uzamaya, yani çeperin deforme olmasına neden olanlar ise *SipA*, *SipC* ve *SopB* proteinleridir (Lostroh ve Lee, 2001).

Bu deformasyon *Salmonella* etkeninin konakçı hücre zarı tarafından alınıp, konakçı hücresi içinde zar ile bağlantılı olan 'Salmonella içeren kesecik' denen (SCV) yapının oluşmasına sebep olmaktadır (Knodler ve ark., 2010). *Salmonella* içeren kesecik gelişince luminal sınırdan bazal membran yönüne göç etmekte, böylece fagolizozomal oluşumların hücrelerine zarar vermesini önlemektedir (Holden, 2002).

Salmonella içeren kesecikler *Salmonella* 'nın barsak hücreleri ve makrofajlar içinde canlılıklarını sürdürebilmeleri ve sayılarını artırabilmeleri için önemli yapılardır (Tierrez ve García-del Portillo, 2005). Konakçıya ait hücrelere temas ettiğinde, *Salmonella* hücresi oluşan kesecikte sistemik infeksiyonu tetikleyen SPI-2 de kodlanmış (SPI-2 T3SS) ikincil bir T3SS oluşturmaktadır (Hensel, 2000). SPI-2 T3SS

kesecik içinde efektör proteinlerin salgılanmasına izin vermektedir ve bu proteinler, sitoskeleton ve motor proteinlerle etkileşime girerek bu kesecikten dışarı yayılan *Salmonella* indükleyici filamentleri (SIFs) oluşturmaktadır (Foley ve ark., 2008). Hatta SPI-2 T3SS kesenin etkileşimini değiştirerek lizozomlar tarafından parçalanmasını engellemektedir (Stevens ve ark., 2009).

Salmonella'ların SPA-1 dışında sahip olduğu diğer patojenite adaları ve fonksiyonları Çizelge 1.1'de belirtilmiştir (Sırıken, 2013).

Çizelge 1.1. *Salmonellaların* SPA-1 dışında sahip olduğu diğer patojenite adaları ve fonksiyonları.

Patojenite Adaları	<i>Salmonella</i> serotipi	Fonksiyonları
HPI-1	S.enterica alt tür IIIa, IIIb, IV	Demir temini için kullanılan siderofor biyosentezi için gerekli genleri bulundurur.
SGI-1	Typhimurium (DT104), Paratyphi ve Agona serovarları	Çoklu antibiyotik direnç genlerini taşıyan gen kümelerini bulundurur.
SPA-2	S.enterica, S.bongori	Bakteriyi içeren fagozomların lizozomla birleşmesini engelleyerek makrofaj içinde çoğalmayı önler ve sistemik enfeksiyon oluşmasını bloke eder.
SPA-3	S.enterica	Magnezyum transport sistemi (MgtS) sayesinde hücre içinde canlı kalabilir.
SPA-4	S.enterica, S.bongori	Sitotoksin sekresyonunda görevlidir ve hücrenin apoptoz olmasını sağlar. Makrofaj içinde canlılığa da korur.
SPA-5	S.enterica, S.bongori	Enterik enfeksiyonların patogeneizinden sorumludur.
SPA-6	S.enterica subsp. enterica serotipler	Fibriayı kodlayan <i>saf</i> geni ve invazini kodlayan <i>pagN</i> genleri içerir.
SPA-7	Typhi, Dublin, Paratyphi serovarları	Vi antijeni virulens faktörünü kodlar. Tifo sırasında ateşin yükselmesine neden olur.
SPA-8	Typhi serotipi	Bakteriyosinlerin sentezlenmesinde rol oynar.

SPA-9	S.enterica, S.bongori	Toksin kodlayan genleri içerir.
SPA-10	Typhi ve Enteritis serotipleri	Konak hücre yüzeyine entegre olmayı sağlayan <i>sef</i> fimbriya proteinlerini kodlar.

1.2.5. Antibiyotik Direnci

Antibiyotik direnci bakterilerin önceden duyarlı oldukları antimikrobiyallerin etkilerinin yok olması ya da azalması sonucunda oluşmaya başlamaktadır. Klinik olarak sahada rutin kullanım dozlarında etkili olduğu bilinen bir antibiyotik ile o enfeksiyonun tedavi edilememesi dikkat çekmektedir. Bu direnç oluşumu bakterilerde genetik olarak var olabileceği gibi çoğu direnç oluşumu doğru antibiyotiğin doğru süre ve etkin dozda uygulanmamasından kaynaklanmaktadır (Yavari, 2012). Aslında iyileştirmek için kullanılan ancak uygun olmayan antibiyotik tedavisi enfeksiyon süresini uzatmakla beraber, canlılarda sadece patojen olan türlerin değil, normal flora türlerinin de adaptasyona bağlı oluşan mutasyonlar aracılığı ile direnç kazanmasına sebep olmaktadır (Abbasoğlu, 2009).

Bakterilerin genetik olarak direnç kazanmasında ise özellikle plazmid, transpozon ve integronlar vasıtası ile oluşan yatay gen transferi, oluşan bu dirençliliğinin çok daha hızlı yayılmasına sebep olmaktadır (Yener ve ark., 2012 ve White ve ark., 2003). *Salmonella* tedavisinde ve çoklu ilaç direncinde de başarı sağlayan florokinolonlar bu mekanizmalarla etkisini yitirmeye başlamıştır (Cuypers ve ark., 2018).

Salmonellalarda antibiyotik direnci 1960'lı yıllarda başlamış ve 1990'lı yıllarda ciprofloxcacin ve ceftriaxone dirençliliğinin arttığı rapor edilmiştir (Tsai ve ark., 2012). Tifoidal olmayan *Salmonella* vakalarında görülen siprofloksasinin dirençliliği

rapor edilmiştir (O'Regan ve ark., 2010). Sonradan florokinolonlara vesefalosporinlere karşı giderek artan direnç sebebiyle *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavisinde azitromisin kullanımı artmıştır. Ancak CLSI, tifoidal olmayan *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavisi için azitromisinin kullanıma dikkat çekilmiştir (Angelo ve ark., 2016).

Tifoidal olmayan *Salmonella* serotiplerinin dünya çapında birinci ve ikinci basamak antibiyotiklere karşı çoklu ilaç direnci (MDR) vardır. Çoklu ilaç direncine sahip *Salmonella* serovarlarına 2000'li yıllar itibarıyla rastlanmaya başlamıştır. Çoklu ilaç direnci *Salmonella* suşlarının hayvan dışkılarıyla kontamine yiyecek veya su alımı, direkt temas ve enfekte hayvanların tüketilmesi ile hayvanlardan insanlara geçerek yüksek bir zoonotik hastalık riski oluşturmaktadır. İnsanlara transferi bu şekilde kolay olması nedeniyle de oranı küresel olarak artış göstermektedir (Eng ve ark., 2015 ve Jajere, 2019). Ata ve ark. (2015), izole ettikleri *Salmonella* izolatlarında %46,4'lük MDR oranı ile bu artışı ispatlamaktadır.

Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Antimikrobiyal İzleme Sistemi MDR'yi birkaç adet (3 veya daha fazla) antibakteriyal ilaç grubuna karşı oluşan direnç olarak tanımlamaktadır (NARMS, 2015). Dünyada çoklu antibiyotik dirençliliğinin tespit edildiği serotiplerin başında *S. Infantis* ve *S. Typhimurium* gelmektedir (Chessa ve ark., 2008a ve Şahan ve ark., 2016).

EFSA ve ECDPC, Avrupa ülkelerinde bazı *Salmonella* serovarlarında artan çoklu ilaç direncine dikkat çekmiştir. Yayınlanan özet raporunda, 2014 yılında insanlardan izole edilen *Salmonella* izolatlarında (n=10352), tetrasiklin (%30,3), sülfanomidler (%28,6) ve ampisilin (%28,2)'e karşı yüksek düzeyde direnç olduğu rapor edilmiştir. Bazı ülkelerde oldukça yüksek düzeyde olmakla beraber Avrupa genelinde çoklu ilaç direnci (%26) yüksek düzeylerde bildirilmiştir. İncelenen serovarlarından *S. Kentucky* (%74,6), monofazik *S. Typhimurium* 1,4,12: i- (%69,4) ve *S. Infantis* (%61,9) yüksek düzeyde çoklu ilaç direncine sahip oldukları saptanmıştır.

(EFSA ve ECDPC, 2016).

ABD’de en sık rapor edilen dirençli serotipler arasında *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* yer alırken, Japonya’da *S. Infantis* antibiyotiklere daha fazla direnç geliştiren serotip olarak tespit edilmiştir (Erol, 2010 ve Gyles, 2008).

Günümüze kadar yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre -her ne kadar alınan numune kaynaklarına göre değişken oranlarda sahip olsa da- broyler kümeslerinde en yaygın izole edilen *Salmonella* suşlarının başında *S. Infantis* (Abbasoğlu, 2009; Asai ve ark., 2006; Rahmani ve ark., 2013 ve Şahan ve ark., 2016), *S. Typhimurium* (Sisak ve ark., 2006 ve Macedo-Viñas ve ark., 2009) ve *S. Enteritidis*’in (Gast, 2008; İzgür, 2010; Küçük, 2020 ve Sareyyüpoğlu, 2010) geldiği bilinmektedir. Bu etkenler içerisinde *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* zoonotik özelliği sahip olması nedeniyle ayrı bir öneme sahiptir (İzgür, 2010). Bu nedenle bu tez çalışmasında, insan ve hayvan sağlığı için hala ciddiyetini koruyan ve önemini her geçen gün arttıran antibiyotik dirençlilik düzeylerinin belirtilen üç *Salmonella* suşu çalışmaya dahil edildi.

Sunulan bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında Türkiye’de farklı illerde hem broyler hem de yumurtacı alanda faaliyet gösteren işletmelerdeki kanatlılardan izole edilen üç farklı *Salmonella* serotiplerinde 14 adet farklı antibiyotiğe karşı direnç profillerinin hem konvansiyel hem de seçilen direnç genlerinin moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlandı.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1.Gereç

2.1.1. İncelenen Suşlar

Bu çalışmada, Türkiye'deki farklı bölgelerde bulunan tavuk kümeslerinden alınan çorap svab numunelerinden izole edilen 30 adet *S. Infantis* suşu, 30 adet *S. Enteritidis* ve 35 adet *S. Typhimurium* olmak üzere toplam 95 adet suş kullanıldı. Çalışmaya dahil olacak suşlar kullanılana kadar -80 °C'de saklandı. Standart suş olarak antibiyotik duyarlılık testlerinde *Salmonella enterica* ATCC 13076 suşu kullanıldı.

2.1.2.Besiyerleri

Toplanan çorap altlık svapların ön zenginleştirme aşaması için Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS) (Oxoid) kullanıldı. Selektif zenginleştirme için Rappaport-Vassiliadis yarı katı besiyeri (Oxoid) kullanıldı. Etken izolasyonu için Xylose lysine deoxycholate (XLD) Agar (Oxoid), identifikasyonu için ise Nutrient Broth (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, USA) kullanıldı. Biyokimyasal testler için içeriğinde lysine, ornitin, hidrojen sülfür, glukoz, mannitol, xylose, voges proskauer, üre, orthonitrophenyl- β -galactoside, indol, sitrat, triptofan deaminaz bulunan ticari kit kullanıldı (Microgen). İzole edilen suşların pasajlanması için Nutrient Agar (Oxoid), saklanması için %20 Gliserin ilave edilmiş Tryptic Soy Broth (TSB) kullanıldı. Antibiyotik duyarlılık testinde ise fizyolojik tuzlu su McFarland 0,5 (1×10^8 cfu/ML) opasite standardı (Remel) kullanıldı. Testler Müller-Hinton (MH) Agar'da gerçekleştirildi (ISO 6579.-1, 2017).

2.1.3. Antibiyotik Diskleri

Salmonella suşlarının antibiyotik duyarlılık testleri için Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI)'nin önerdiği konsantrasyonlarda, ampisilin (AMP; 10 µg), sefotaksim (CTX; 30µg), kloramfenikol (C; 30µg), siprofloksasin (CIP; 5µg), gentamisin (CN; 30µg), kanamisin (K; 30µg), nalidiksik asit (NA; 30µg), streptomisin (S; 10µg), tetrasiklin (TE; 30µg), trimetoprim/ sülfametaksazol (SXT; 1.25/23.75µg), sulfonamid (S3; 250 veya 300µg), seftazidim (CAZ; 30µg), Eritromisin (E; 15 µg), olmak üzere 13 adet antibiyotik diski (Oxoid; İngiltere) kullanıldı.

2.1.4. Standart Suşlar

İzolasyon ve identifikasyon aşamalarında, pozitif kontrol olarak *Salmonella enterica* ATCC 13076 suşu kullanıldı.

2.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Cihaz, Kimyasal ve Tampon Solüsyonlar

Hassas terazi (Scaltec, SBC41), santrifüj (DM0412, DLAB, USA), steril kabin (laminar flow) (ME90, Miprolab, USA), vorteks (Vortex3000, Wiggins), DNA thermal cyclers (Quantstudio5, Applied Biosystems), jel elektroforez ünitesi (cihaz ve güç kaynağı) (Blu POWER 500), UV transillüminatörlü bilgisayarlı görüntüleme sistemi (Gene Genius, Syngene, Bio Imaging System, USA) kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. *Salmonella* İzolasyon ve İdentifikasyonu

İzolasyon için ön zenginleştirme, zenginleştirme, selektif besi yeri ekimi, biyokimyasal testler ve serum aglütinasyon sırasıyla yapıldı. Ön zenginleştirmede altlık svaplar 25 g dışkı ile kontamine olduğu kabul edilerek 225 ml tamponlanmış peptonlu su (Oxoid) ilave edilildikten sonra 37 °C’de aerob koşullarda 24 saat inkübe edildi. Zenginleştirme aşamasında 0,1 ml ön zenginleştirme sıvısı yarı katı Rappaport-Vassiliadis Broth’a transfer edilerek 42 °C’de 18-24 saat inkübe edildi. Selektif besi yeri aşamasında üremenin en dış halkasından bir öze dolusu alınan örneklerden XLD agar (Xylose Lysine Deoxycholate agar, Oxoid) yüzeyine seyreltme metodu ile geçilerek 37 °C’de aerob koşullarda 24 saat inkübe edildi. Siyah merkezli, parlak koloniler *Salmonella* şüpheli olarak kabul edilip Nutrient agara (Oxoid) geçilerek 37 °C’de aerob koşullarda 24 saat inkübasyon sonrası saf kültür elde edildi.

Saf kültürler elde edildikten sonra biyokimyasal analizler için ISO 6579:2002 standardında yer alan glukoz (+), laktoz (-), sukroz (-), gaz (+), üre hidrolizi (-), indol oluşumu (-), H₂S (+), lizin dekarboksilaz (+), Voges Proskauer-VP (-), β- galaktosidaz (ONPG) (-) testleri uygulandı. Bu amaçla Microgen™ GnA+B-ID System test kitleri kullanıldı. Biyokimyasal testler için saf kültürden alınan *Salmonella* şüpheli koloniler 3ml steril %0,85 fizyolojik tuzlu su (FTS) içinde süspanse edildi. Süspansiyondan test kitinin her bir kuyucuğuna 100’er µL damlatıldı. Kullanım kılavuzuna göre 1, 2, 3 ve 9 numaralı kuyucuklara 1-2 damla steril mineral yağ koyuldu. Testin üzeri test kitinden çıkan bir jelatin ile örtüldü ve 37°C’de 24±2 saat inkübasyona tabii tutuldu. İnkübasyon sonrasında jelatin açılarak; 8. kuyucuğa kovaks ayırıcı, 10. kuyucuğa önce VP I ayırıcı sonra VP II ayırıcı damlatıldı, 12 numaralı kuyucuğa ise TDA (triptofan deaminaz) ayırıcı damlatıldı.

Kit içerisinde çıkan renk skalasına göre ayraçlar eklendikten sonra renk değişiklikleri değerlendirildi. Renk skalasında tüm pozitif ve negatif değerler GnA+B-ID formuna kaydedildi. Formdaki değerlere göre 4 haneli bir kod elde edildi. Bu kod Microgen sistem yazılımı (MID-60) ile serotip olarak eşleştirildi ve isimlendirildi. Elde edilen biyokimyasal test verileri ile *Salmonella* olduğu bulunan kolonilere polivalan *Salmonella* antiserumu ile aglütinasyon testi yapıldı. Aglütinasyon veren koloniler *Salmonella* spp. olarak değerlendirilerek serotiplendirilme aşamasına aktarıldı.

Salmonella'ların serotiplendirilme aşaması White-Kaufmann-LeMinor şeması izlenerek yapıldı. *S. Enteritidis*, *S. Infantis* ve *S. Typhimurium* olarak serotiplendirilen suşlar antibiyotik duyarlılık testleri yapılmak üzere -20°C' de muhafaza edildi.

2.2.2. Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesi

2.2.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Antibiyotik duyarlılık testi, CLSI'nın (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerdiği Kirby-Bauer disk difüzyon tekniğine göre yapıldı (CLSI documents M100-S15). İzolasyonu yapıp -20°C' de muhafaza edilen *S. Infantis*, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* suşlarının önce Xylose lysine deoxycholate (XLD) agara pasajları yapıldı. 37°C'de 18-24 saat inkubasyon sonrasında tek koloni alınarak Nutrient Agara (NA) pasajları yapıp tekrar 37°C'de 18-24 saat inkube edildi. Saf ve taze *Salmonella* kültüründen 2-3 koloni alınarak, McFarland 0,5 (1×10^8 kob/ml) opasite standardı esas alınarak serum fizyolojik içinde süspansiyon edildi. Sonra Mueller Hinton Agara 0,1 ml yayma ekimleri yapıldı. Ekim yapılan petriyeler inkubasyona kaldırılmadan önce 5-10 dk. oda sıcaklığında kabin içerisinde bekletildi. Bu aşamadan sonra, bir petriye 8 adet; ampicilin (AMP; 10 µg), sefotaksim (CTX; 30µg),

kloramfenikol (C; 30µg), siprofloksasin (CIP; 5µg), gentamisin (CN; 30µg), kanamisin (K; 30µg), nalidiksik asit (NA; 30µg), streptomisin (S; 10µg), diğ er bir petriye 5 adet; tetrasiklin (TE; 30µg), trimetoprim/ sül fametaksazol (SXT; 1.25/23.75µg), sulfonamid (S3; 250 veya 300µg), seftazidim (CAZ; 30µg), Eritromisin (E;15 µg) olacak şekilde antibiyotik diskleri 2 adet besi yeri üzerine yerleştirildi. Ekim iş lemleri tamamlandıktan sonra petriler 24 saat boyunca 37°C'lik inkubatöre bırakıldı ve zon ç apları ölçülerek antibiyotik direnç lilikleri CLSI standartlarına göre değ erlendirildi (Ç izelge 2.1; CLSI Document M100-S15).

Ç izelge 2.1. CLSI'ya göre *Salmonella* suş larının antibiyotik duyarlılık zon ç apları.

Antibiyotik	Disk µg	Zon Ç apları (mm)		
		Direnç li (R)	Orta Duyarlı (I)	Duyarlı (S)
Ampisilin (AMP)	10 µg	≤13	14-16	17≥
Sefotaksim (CTX)	30 µg	≤22	23-25	≥26
Kloramfenikol (C)	30 µg	≤12	13-17	≥18
Siprofloksasin (CIP)	5 µg	≤20	21-30	≥31
Gentamisin (CN)	30 µg	≤12	13-14	≥15
Kanamisin (K)	30 µg	≤13	14-17	≥18
Nalidiksik asit (NA)	30 µg	≤13	14-18	≥19
Streptomisin (S)	10 µg	≤11	12-14	≥15
Tetrasiklin (TE)	30 µg	≤11	12-14	≥15
Trimetoprim Sül fametaksazol (SXT)	1.25/23.75 µg	≤13	14-16	≥17
Sulfonamid (S3)	250/300 µg	≤12	13-16	≥17
Seftazidim (CAZ)	30 µg	≥21	18-20	≤17
Eritromisin	15 µg	≤13	14-22	≥23

2.2.3.Polimeraz Zincir Reaksiyonları

2.2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

DNA ekstraksiyonu, Queipo-Ortuño ve ark. (2008) yaptığı çalışmaya uygun şekilde aşağıda belirtildiği gibi yapıldı. Ekstraksiyonu yapılan DNA örnekleri sonraki işlemler yapılana kadar -20°C’de muhafaza edildi.

Kaynatma yöntemi:

- Bakteri süspansiyonları 10.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant döküldü ve 500 ml FTS eklendi.
- 12.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi ve üstteki sıvı atıldı.
- 20 µl distile su eklendi.
- 100 °C’de 10 dakika kaynatıldı.
- Kaynatma işleminden sonra 10 dakika -20 °C’de bekletildi.
- 12.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi ve elde edilen DNA bundan sonraki işlemlerde kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

2.2.3.2.Primerler

Primerler seçilirken her serotipte en çok direnç görülen antibiyotikler göz önüne alındı. Aynı zamanda farklı antibiyotik gruplarından antibiyotikler seçilmesine önem verildi. Bu amaçla kinolon grubu için *gyrA*, aminoglikozidlerden *aphA* ve tetrasiklin grubundan da *tet(A)* geni seçilmiştir. Literatür araştırmalarından sonra gen sekansları belirlenmiş ve *Salmonella*’larda seçilen antibiyotik direnç genlerinin PZR ile belirlenmesinde kullanılan primerlere ait sekanslar Çizelge 2.2’te gösterildi.

Çizelge 2.2. Genlerin baz dizileri, sıcaklıkları, PZR ürünlerinin uzunlukları ve referansları.

Gen	Primer (5'-3')	Sıcaklık	Uzunluk	Referans
aphAF	AAACGTCTTGCTCGAGGC	54	461 bp	Bolton ve ark., 2013
aphAR	CAAACCGTTATTCATTCGTGA			
Tet(A)F	GCTACATCCTGCTTGCCT	54	210 bp	Guerra ve ark., 2001
Tet(A)R	CATAGATCGCCGTGAAGA			
gyrA F	AAATCTGCCCCGTGTCGTTGGT	58	344 bp	Fabrega ve ark., 2009
gyrA R	GCCATACCTACTGCGATACC			

2.2.3.3. PZR Optimizasyonu

PZR karışımı her bir örnek için 25 µl'lik son hacim olacak şekilde, optimizasyon için primer, Mastermix, DNA, Ta ısısı aşağıdaki gibi hazırlandı.

2.2.3.4. PZR Amplifikasyonları

Gen bölgelerinin amplifikasyon protokollerinin optimizasyonu Carattoli ve ark. (2005) ve Amy D. Lunn ve ark. (2010) tarafından önerilen yöntemler ile gerçekleştirildi. Amplifikasyonlar için kullanılan reaksiyon mastermixleri ve protokolleri aşağıda verilmiştir.

Çizelge 2.3. *aphA1*, *tetA* ve *aphA* geni için mastermiks hazırlanma oranları.

Malzeme	Hacim
Mastermix	12,5 µl
Forward primer, 10 pmol	1 µl
Reverse primer, 10 pmol	1 µl
Steril ddH ₂ O	7,5 µl
Template DNA	3 µl
TOPLAM	25 µl

Mastermiks karışımlarından sonra 0,2 mL'lik tüplere içlerine 22'şer µl hazırlanılan mastermiksden ilave edildi ve ekstraksiyonu yapılan DNA'lardan 3'er µl alınıp toplam hacim 25 ml'ye tamamlandı. Tüpler 2 dk. vorteksledikten sonra termal döngüleme cihazlarına yerleştirilerek, protokoller ayarlandı. *aphA* ve *tetA* genlerine ait analizlerinde kullanılan PCR protokolü Çizelge 2.4'de, *gyrA* genine ait protokol Çizelge 2.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. *tetA* ve *aphA* geni için PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı (Carattoli ve ark., 2005).

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç	1	94°C	3 dk
Denatürasyon			
Denatürasyon		94°C	1 dk
Bağlanma	30	54°C	1 dk
Uzama		72°C	1 dk
Son uzama	1	72°C	7 dk

Çizelge 2.5. *gyrA* geni için PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı (Amy D. Lunn ve ark., 2010).

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç	1	95°C	10 dk
Denatürasyon			
Denatürasyon		95°C	20 sn
Bağlanma	30	58°C	60 sn
Uzama		72°C	90 sn
Son uzama	1	72°C	10 dk

2.2.3.5. Agaroz Jelin Hazırlanması, Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

Oluşan ürünlerin değerlendirilmesi için 50 ml Tris Borik asit EDTA içerisine 0,5 gr gel agaroz ilave edilerek mikrodalga fırında 2 dk çözdürüldü. Sonra 5ml SafeWiew eklenerek elektroforez tankına dökülen jel, donması için 25 dk bekletildi. Jel donduktan sonra taraklar dikkatle çıkartılarak 0,2 mL tüplerde oluşturulan PCR ürünlerinden 10'ar µl alınıp, 3 µl 6x loading dye ile karıştırıldı ve jeldeki kuyucuklara yüklendi. DNA örneklerine 180 voltta 60 dakika elektroforez işlemi uygulandı.

PCR analizi değerlendirmesinde, *aphA* geni için 461 bp, *tetA* geni için 210 bp ve *gyrA* geni için 344bp uzunluğunda bant oluşumları gözlemlendi.

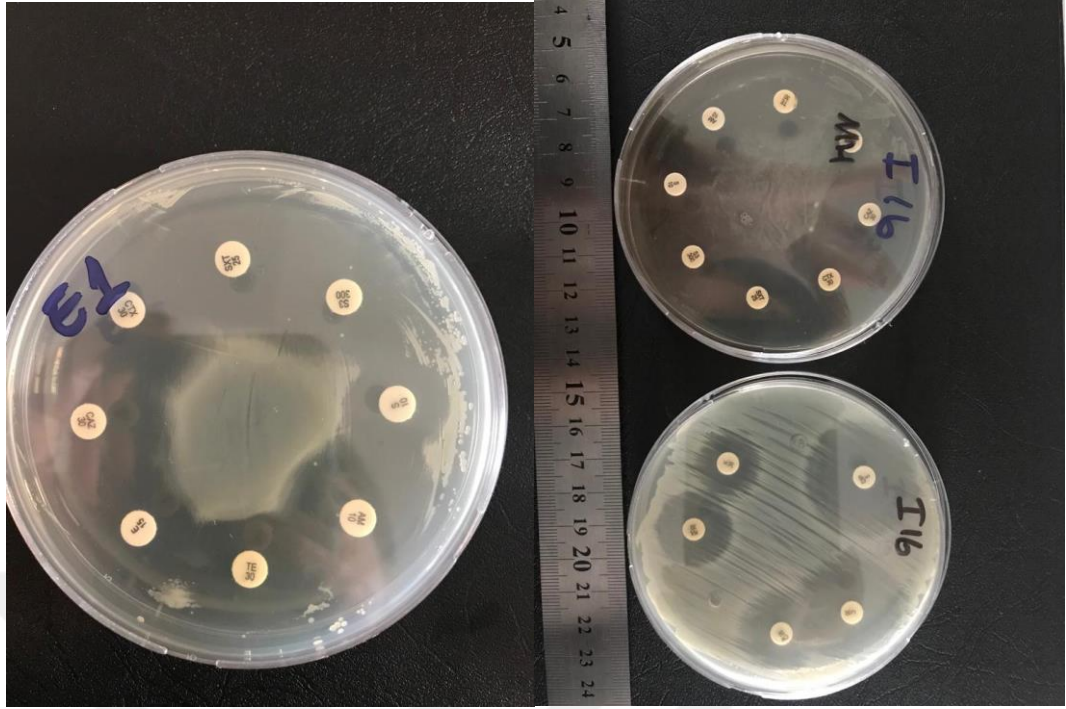
3.BULGULAR

Çalışma kapsamında farklı illerde tavuk kümeslerine ait çorap svablardan izole edilen 30 adet *S. Infantis*, 30 adet *S. Enteritidis* ve 35 adet *S. Typhimurium* olmak üzere toplam 95 adet izolatin antibiyotik direnci disk difüzyon ve PCR ile incelendi.

3.1. Antibiyotik Duyarlılık Testlerine Ait Bulgular

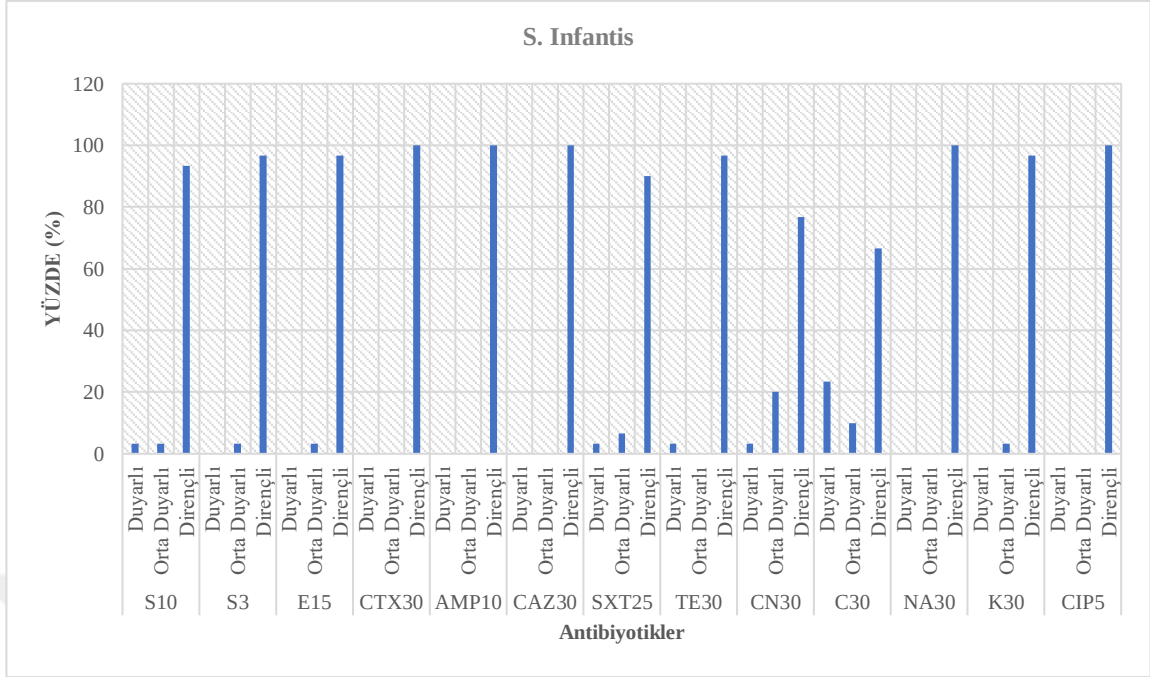
3.1.1. Disk Diffüzyon Bulguları

Bu çalışmada Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile 30 adet *S. Infantis*, 30 adet *S. Enteritidis* ve 35 adet *S. Typhimurium* olmak üzere 95 adet *Salmonella* suşunun 13 farklı antibiyotiğe göre duyarlılık testleri yapıldı. Duyarlılık testleri için *aphA* geni taşıyan aminoglikozid grubundan gentamisin, kanamisin, streptomisin ve eritromisin; *tetA* geni taşıyan tetrasiklin; *gyrA* geni taşıyan kinolon grubundan siprofloksasin ve nalidiksit asit, penisilin grubu ampicilin, sefalosporin grubu sefotaksim ve seftazidim, amfenikoller grubundan kloramfenikol, sulfonamid grubundan sulfonamid ve benzilprimidin-sulfanamid gruplarının bir kombinasyonu olan trimetoprim/sülfametaksazol antibiyotikleri seçildi. Antibiyotik duyarlılık testlerinin kontrolünde standart suş olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, CLSI'nin kriterlerine göre değerlendirildi. *Salmonella* suşlarının disk difüzyon yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinin Mueller hinton agardaki örnek görüntüsü Şekil 3.1'de verilmiştir.



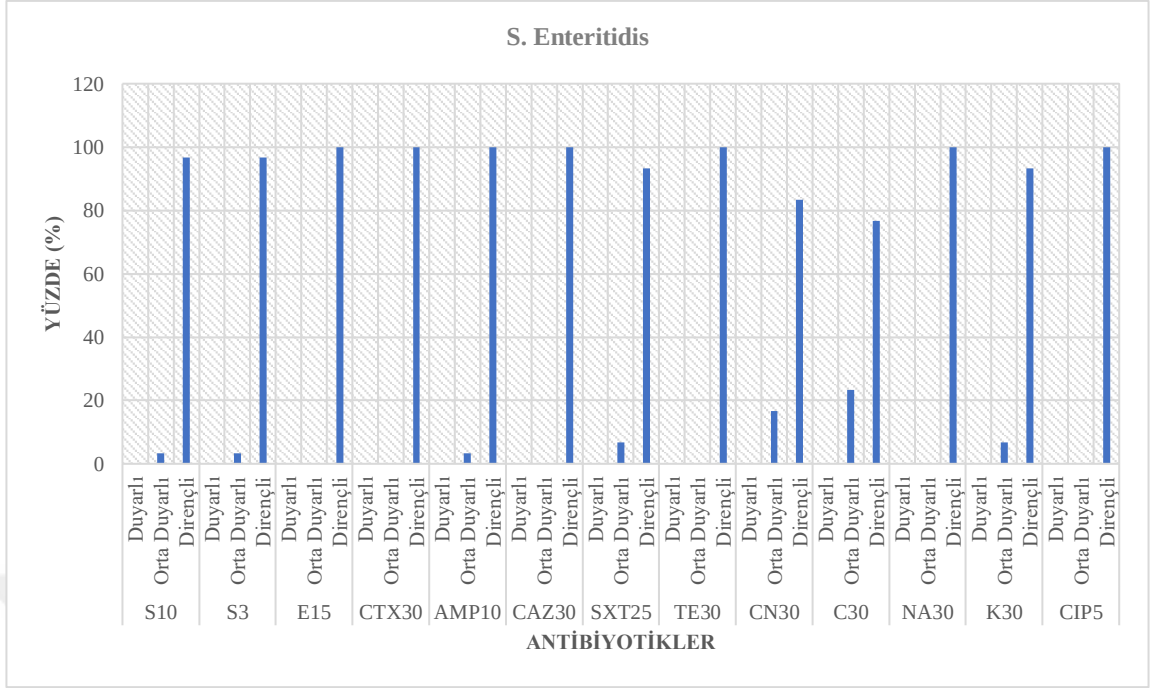
Şekil 3.1. Disk diffüzyon yöntemi ile *Salmonella* suşlarında yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinin Mueller hinton agardaki örnek görüntüleri.

Salmonella Infantis suşlarının 28 (%93)'ü streptomisin'e, 29 (%96)'u sülfanomid'e, 29 (%96)'u eritromisin'e, 30 (%100)'ü sefotaksim'e, 30 (%100)'u ampisilin'e, 30 (%100)'u ceftazidim'e, 27 (%90) 'si trimetoprim/sülfametaksazol'e, 29 (%96) 'u tetrasiklin'e, 23 (%76)'ü gentamisin'e, 20 (%66) 'si kloramfenikol'e, 30 (%100)'u nalidiksik asit'e, 29 (%96) 'u kanamisin'e, 30 (%100)'u siprofloksasin'e dirençli bulunmuştur. Orta duyarlı bulunan suşlar streptomisin için bir adet (%3), sülfanomid için bir adet (%3), eritromisin için bir adet (%3), trimetoprim/sülfametaksazol için iki adet (%7), tetrasiklin için bir adet (%3), gentamisin için 6 adet (%20), kloramfenikol için üç adet (10), kanamisin için bir adet (%3) tir. *Salmonella* Infantis suşlarının duyarlılık oranlarına baktığımızda ise; streptomisin'e bir (%3)'i, trimetoprim/sülfametaksazol'e bir (%3)'i, tetrasiklin'e bir (%3)'i, gentamisin'e bir (%3)'i ve kloramfenikol'e 7 (%23)'si duyarlı bulunmuştur. *Salmonella* Infantis suşlarının çalışmaya dahil edilen antibiyotiklere karşı dirençlilik oranı Şekil 3.2'de sunulmuştur.



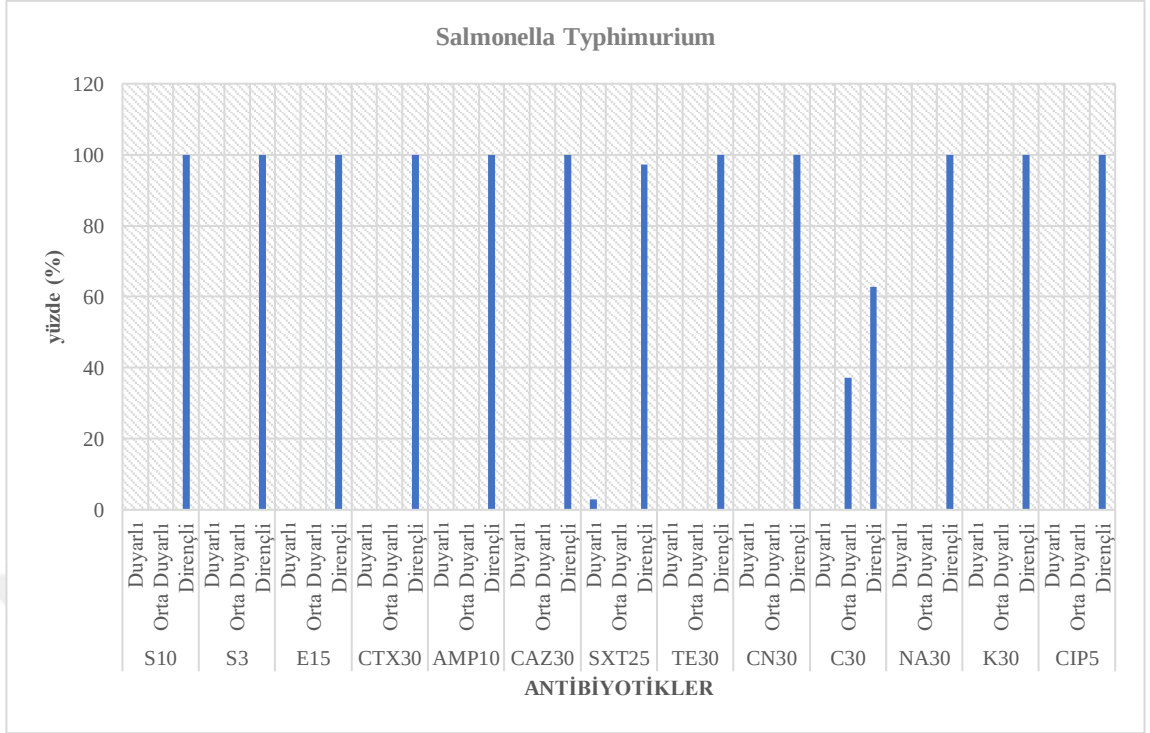
Şekil 3.2. *Salmonella Infantis* suşlarının çalışmaya dahil edilen antibiyotiklere karşı dirençlilik yüzdeleri.

Salmonella Enteritidis suşlarının 29 (%96)'u streptomisine, 29 (%96)'u sülfanomide, 30 (%100)'u eritromisine, 30 (%100)'u sefotaksime, 29 (%96)'u ampisiline, 30 (%100)'u ceftazidime, 28 (%93)'i trimetoprim/sülfametaksazol'e, 30 (%100)'u tetrasiklin'e, 25 (%83)'i gentamisin'e, 23 (%83) 'ü kloramfenikol'e, 30 (%100)'u nalidiksik asit'e, 28 (%93)'i kanamisin'e, 30 (%100)'u siprofloksasin'e dirençli bulunmuştur. *Salmonella Enteritidis* suşlarının orta duyarlılık oranlarına baktığımızda ise; streptomisin'e bir (%3)'i, sülfanomid'e bir (%3)'i, ampisilin'e bir (%3)'i, trimetoprim/sülfametaksazol'e iki (%6)'si, gentamisin'e 5 (%16)'i, kloramfenikol'e 7 (%23)'si, kanamisin'e iki (%96)'si orta duyarlı bulunmuştur. Duyarlı bir *S. Enteritidis* suşu tespit edilmemiştir. *Salmonella Enteritidis* suşlarının çalışmaya dahil edilen antibiyotiklere karşı dirençlilik oranı Şekil 3.3'te sunulmuştur.



Şekil 3.3. *Salmonella* Enteritidis suşlarının çalışmaya dahil edilen antibiyotiklere karşı dirençlilik yüzdeleri.

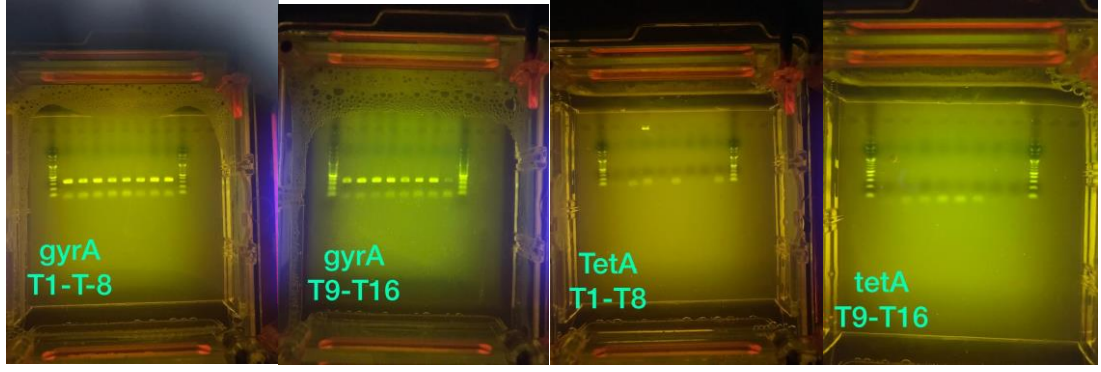
Salmonella Typhimurium suşlarının 30 (%100)'u streptomisin'e, 30 (%100)'u sülfanomid'e, 30 (%100)'u eritromisin'e, 30 (%100)'u sefotaksim'e, 30 (%100)'u ampisilin'e, 30 (%100)'u ceftazidim'e, 30 (%100)'u trimetoprim/sülfametaksazol'e, 30 (%100)'u tetrasiklin'e, 30 (%100)'u gentamisin'e, 21 (%60)'i kloramfenikol'e, 30 (%100)'u nalidiksik asit'e, 30 (%100)'u kanamisin'e, 30 (%100)'u siprofloksasin'e dirençli bulunmuştur. *Salmonella* Enteritidis suşlarının orta duyarlılık oranlarına baktığımızda ise; sadece kloramfenikol'e 14 (%40)'ü orta duyarlı bulunmuştur. Duyarlı bir *S. Typhimurium* suşu tespit edilmemiştir *Salmonella* Typhimurium suşlarının çalışmaya dahil edilen antibiyotiklere karşı dirençlilik oranı Şekil 3.4'te sunulmuştur.



Şekil 3.4. *Salmonella Typhimurium* suşlarının çalışmaya dahil edilen antibiyotiklere karşı dirençlilik yüzdeleri.

3.1.2. PCR Bulguları

Fenotipik olarak antibiyotik duyarlılıkları saptanan 30 adet *S. Infantis*, 30 adet *S. Enteritidis* ve 35 adet *S. Typhimurium* suşlarında *aphA*, *tetA*, ve *gyrA* direnç genlerinin varlığı araştırıldı. Bu genler seçilirken her bir serotip grubunda yüksek oranda direnç saptanması ve farklı antibiyotik gruplarında yer almaları göz önünde bulunduruldu. Bunun için tetrasiklin direncinde rol oynayan *tet(A)*, kinolon direncinde rol oynayan *gyrA* ve aminoglikozid grubundan kanamisin direncinde rol oynayan *aphA* genlerine spesifik primerlerin kullanıldığı konvansiyonel PCR yöntemi uygulandı. Bu yöntemin özgüllüğünü ortaya koymak için pozitif ve negatif kontrol suşları kullanıldı. Her bir serotip grubundaki direnç geni varlığı hem kendi içlerinde hem de serotip grupları arasında karşılaştırılarak disk difüzyon test sonuçları ile değerlendirildi. Görüntüleme işlemine ilişkin görüntüler Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5. Jeldeki DNA örneklerinin elektroforez işlemi ile görüntülenmesi.

Aminoglikozid grubundan kanamisin direncinde rol oynayan *aphA* geni hiçbir *S. Infantis* suşunda tespit edilmezken, *S. Enteritidis* suşundan 5 tanesinde, 35 adet *S. Typhimurium* suşundan 3 tanesinde saptandı. Konvansiyonel olarak kanamisin direnci; *S. Infantis* suşlarının 29 (%96)'unda, *S. Enteritidis* suşlarının 28 (%93) ve *S. Typhimurium* suşlarının 35 (%100)'unda saptanmıştır.

Tetrasiklin direncinde rol oynayan *tetA* geni 30 adet *S. Infantis* suşundan 17 tanesinde, 30 adet *S. Enteritidis* suşundan 12 tanesinde, 35 adet *S. Typhimurium* suşundan 1 tanesinde saptandı. Konvansiyonel olarak tetrasiklin direnci; *S. Infantis* suşlarının 29 (%96)'unda, *S. Enteritidis* suşlarının 30 (%100)'unda ve *S. Typhimurium* suşlarının 35 (%100)'unda saptanmıştır.

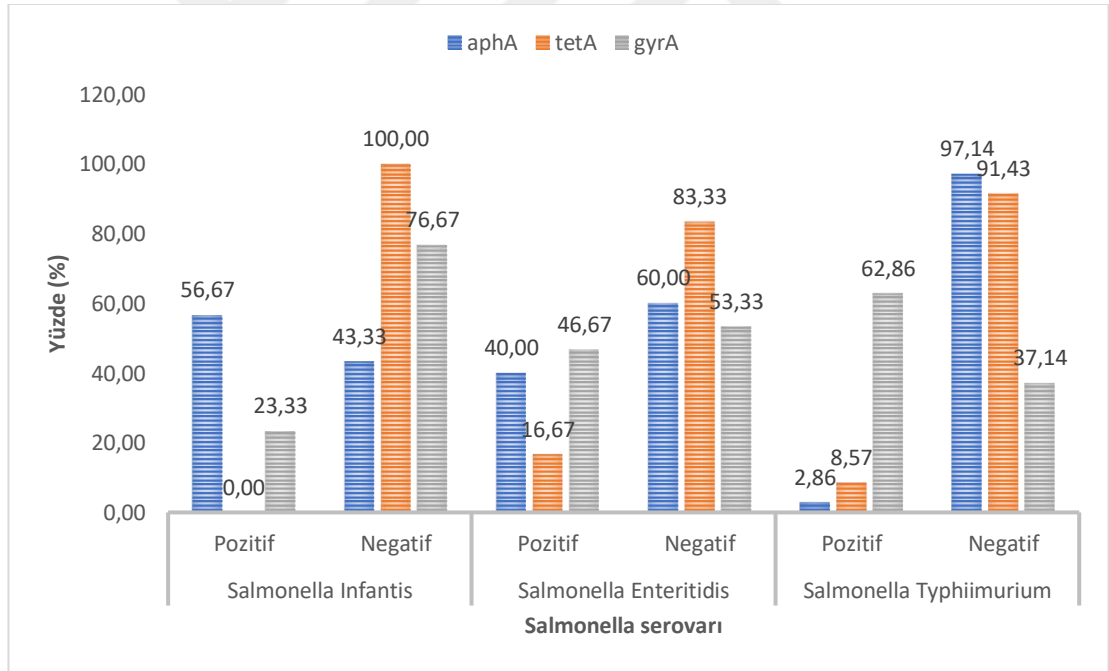
Kinolon direncinde rol oynayan *gyrA* 30 adet *S. Infantis* suşundan 7 tanesinde, 30 adet *S. Enteritidis* suşundan 14, 35 adet *S. Typhimurium* suşundan 22 (%63)'sinde saptandı. Konvansiyonel olarak kinolon grubu antibiyotiklerden; nalidiksit asit ve ciprofloksasin direnci suşların hepsinde saptanmıştır.

S. Infantis suşlarında *aphA* geni varlığı %56,67 ile en yüksek oranda iken, *tetA* ve *gyrA* genlerine sahip olmayan suşların oranının sırasıyla %100 ve %76,67 olduğu belirlendi.

S. Enteritidis suşlarında ise çalışmaya dahil edilen direnç genleri bakımından negatiflik düzeyinin daha yüksek olduğu saptandı. Yapılan analizler sonuçlar *S. Enteritidis* suşlarının *tetA*, *aphA* ve *gyrA* genlerine sahip bakımından sırasıyla %83,33; %60 ve %53,33 oranında negatif olduğu belirlendi.

S. Typhimurium suşlarında *gyrA* geni varlığı %62,86 ile en yüksek oranda iken, *aphA* ve *tetA* genlerine sahip olmayan suşların oranının sırasıyla %97,14 ve %91,43 olduğu belirlendi.

Çalışmaya dahil edilen *Salmonella* serovarları ve ilgili direnç genlerinin oranlarına ilişkin veriler Şekil 3.6.de gösterildi.



Şekil 3.6. Çalışmaya dahil edilen *Salmonella* serovarları ve ilgili direnç genlerinin yüzdeleri.

4. TARTIŞMA

Salmonellozis, tüm dünyada hem insanlarda hem de hayvanlarda başta akut gastrointestinal sistem infeksiyonu olmak üzere bağırsaklar haricinde entero-invaziv yayılma ile de diğer pek çok diğer organlarda lokalize formda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (Adesiji ve ark., 2014). Kontaminasyon, sindirim sistemi aracılığı ile olmaktadır ve hastalığın klinik şiddeti bakterinin gastrointestinal yolla alınan miktarı ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir (İzgür, 2010). Veteriner hekimlik yönünden bakıldığında *Salmonella* infeksiyonları tüm çiftlik hayvanlarında gözlenmesine karşın, kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde en önemli zoonotik patojenlerin başında gelmektedir (Abbasoğlu, 2009; EFSA ve ECDPC, 2012 ve Russell, 2012). Kanatlı hayvanlarda meydana getirdiği kayıplar nedeniyle işletmelerde ciddi ekonomik zararlara sebebiyet vermesinin yanında global düzeyde de kanatlı hayvanlardan elde edilen gıda ürünlerine bağlı gıda zehirlenmeleri nedeniyle halk ve insan sağlığı tehdidi yönünden ciddi problem teşkil etmektedir (EFSA ve ECDPC, 2012).

Hastalıkların tedavisi amacıyla hem insanlarda hem de hayvanlarda antimikrobiallerin yoğun bir şekilde kullanımı tüm dünyada pek çok bakteri suşlarında çoklu ilaç direnci gelişiminde ciddi bir artışa neden olarak global bir sorun olarak dikkatleri üzerine çekmeye devam etmekte ve her geçen gün insan ve halk sağlığı yönündeki kaygılarda artışa neden olmaktadır (Adesiji ve ark., 2014). Tüm dünyada insanlar için önemli gıda kaynaklarını oluşturan kanatlılar, balıklar ve deniz ürünlerinin *Salmonella* spp.'nin en önemli rezervuarları olması ve bu canlılardan izole edilen *Salmonella* suşlarında bildirilen çoklu ilaç direnci, ilgili patojenin tüm dünyada halk sağlığına ilişkin kaygılar içerisinde ilk sıralarda yer almasına neden olmaktadır (Bhowmick ve ark., 2011). Her geçen gün artan ilaç dirençliliği ve buna paralel olarak şekillenen çoklu antibiyotik direncine sahip serovarların artışı Salmonellozisin kontrolü ve tedavisinde de karşılaşılan en ciddi sorun olmaya devam etmektedir (Yener ve ark., 2012).

Salmonella suşlarındaki antimikrobiyallere karşı gelişen dirençlilik düzeyleri; ülke, suş, hayvan türü ve yıl gibi çeşitli faktörlere göre değişkenlik göstermektedir. Ülkelere göre bakıldığında ABD’de yüksek oranda dirençlilik düzeyine sahip suşlar arasında *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* sıklıkla bildirilmekte iken, Japonya’da bu konuda *S. Infantis* en fazla direnç geliştiren suş olarak rapor edilmektedir. Üretim amacı yönünden incelendiğinde yüksek oranda dirençliliğe sahip serotiplere damızlıklara nazaran daha çok broylerler de rastlandığı bildirilmektedir (Erol, 2010 ve Gyles, 2008). Bu nedenle *Salmonella* suşlarındaki insidens dağılımları ve antimikrobiyallere olan dirençlilik düzeylerinin düzenli olarak hem ulusal düzeyde hem de farklı üretim prosesine sahip işletmeler bazında araştırmaların sürdürülmesi önem arz etmektedir.

Günümüzde infeksiyöz hastalıkların tedavisi ve bu hastalıklardan korunma en büyük engelin, ilgili patojenlerde antimikrobiyallere karşı dirençlilik gelişimi (Schwarz ve Chaslus-Dancla, 2001) olması nedeniyle hayvan yetiştiriciliği, hayvansal gıda üretimi yapılan işletmelerde antibiyotiklerin bilinçsiz ve aşırı/kontROLSÜZ kullanımına yönelik ciddi önlemler tüm dünyada alınmaya devam etmekte ve bu önlemler sıkı bir şekilde takip edilmektedir (Chessa ve ark., 2008a ve Chessa ve ark., 2008b). *Salmonella* infeksiyonlarının tespiti ve salgınların kontrol altına alınabilmesi için tüm dünyada sürveyans çalışmaları yapılmaktadır. Bu kapsamda 2002-2005 yıllarına ait Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) ait raporda insan kökenli en yaygın serovarin *S. Enteritidis* (%61) ve insan kökenli olmayanın ise *S. Typhimurium* (%23) olduğu bildirilmiştir (Özyurt, 2011). Avrupa komisyonu tarafından yürütülen ve üç aylık periyotlar halinde raporlar sunan Enter-Net adlı projeye göre, Ocak-Mart 2007 dönemindeki izole edilen *Salmonella* serovarların yoğunluğuna göre sırasıyla *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* ve *S. Virchow* olduğu bildirilmiştir (Avşaroğlu, 2007).

Amerika Birleşik Devletleri’nde Ulusal *Salmonella* İzleme Ağı kapsamında 2005 yılında izole edilen *Salmonella* suşlarının izolasyon oranlarına göre yüksekten düşüğe doğru *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Newport* ve *S. Heidelberg* serotipleri

olduğu rapor edilmiştir (Avşaroğlu, 2007). Avrupa Birliği raporlarına göre günümüzde 2 600'den fazla *Salmonella* serotipi bilindiği, ancak sınırlı sayıda serotipin insan hastalıklarının büyük çoğunluğu ile ilişkili olmasının yanı sıra farklı serovarların prevalansının zaman içerisinde değişkenlik gösterebileceği bildirilmektedir (EFSA, 2014). Yine Avrupa Birliği raporlarında en sık tavuk eti ve canlı kuşlardan izole edilen *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* ile *S. Infantis*'in neden olduğu hastalıkların insanlardaki vakalarda tespit edildiği rapor edilmiştir (EFSA ve ECDPC, 2015). Ayrıca bu üç serovar içerisinde *S. Infantis*'in prevalansının 1970'lerin sonlarından bu yana Arjantin, Avustralya, Brezilya, Hollanda, Finlandiya, Kanada, Macaristan, Japonya, Yeni Zelanda ve Rusya gibi ülkelerde giderek arttığı belirgin bir şekilde tescil edilmiştir (Miller ve ark., 2010).

Ülkemizde 2018 yılı itibari Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından hayata geçirilen Ulusal *Salmonella* Kontrol Programı (USKP) kapsamında ulusal düzeyde *Salmonella* serotiplerinin tespit edilmesi, sıklığının belirlenmesi ve enfeksiyon oranlarının azaltılması amaçlanmaktadır. Ulusal *Salmonella* Kontrol Programı, *Salmonella* ve Belirlenmiş Diğer Gıda Kaynaklı Zoonotik Etkenlerin Kontrol Altına Alınması Yönetmeliği'ne göre; zoonotik öneme sahip halk sağlığı açısından önem arz eden *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* insidensinin %1'in altına düşürülmesi hedeflenmektedir (Anonim, 2018). Mevcut Ulusal kontrol programı *Salmonella* insidensinin azaltılmasında, enfeksiyonları önlemeye yönelik koruyucu hekimlik uygulamalarına önem verilmesi, kümeslerde hijyen ve dezenfeksiyon gibi biyogüvenlik önlemlerine özen gösterilmesi, rutin kontrollerin aksatılmadan sürdürülebilirliğinin sağlanması, nakiller esnasında olası kontaminasyon yollarının engellenmesi ve hijyenik koşulların korunması gibi tedbirlere dikkat çekilmektedir (Anonim, 2018).

Çeşitli antimikrobiyallere karşı direnç gelişimi konusunda ilk dönemlerde yapılan çalışmalarda *Salmonella*'da ilk olarak kloramfenikol, kanamisin, streptomisin, sulfonamid ve tetrasikline karşı dirençlilik bildirilmiş iken, daha sonra bu

antimikrobiyallere kinolonlar ve üçüncü nesil sefalosporinler de eklenerek dirençlilik düzeyinin hızlı bir artış gösterdiği bildirilmiştir (White ve ark., 2001 ve Yener ve ark., 2012).

İran’da Asgharpour ve ark. (2014)’nın broylerlerden izole edilen *S. Infantis* suşlarında sırasıyla azalan oranlarda tetrasikline %100, amoksisiline %70, trimetoprim-sülfametoksazole %66, kloramfenikole %64, seftazidime %28 düzeyinde dirençlilik varlığını saptamışlardır. Bir diğer çalışmada (Lai ve ark., 2014) ise, araştırmacılar tetrasiklin ve sülfonamidlere karşı var olan artan dirençlilik düzeyinin, bu grup antimikrobisallerin hayvanlardaki büyüme teşvik etmek veya hastalıkların önlenmesi amacıyla terapötik veya terapötik olmayan dozlarda hayvan beslemede kullanılmasının muhtemel bir sonucu olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Brezilya’da Mendonça ve ark. (2020), 51 adet *S. Infantis* suşunda test edilen antimikrobisaller için elde edilen dirençlilik düzeylerinin en yüksekten en düşüğe doğru %35,3 ile amoksisilin (β -laktam/penisilin sınıfı), %15,7 ile sülfonamid (sülfonamid sınıfı), %9,8 ile tetrasiklin (tetrasiklin sınıfı) ve %5,9 ile seftazidim olduğunu belirlemişlerdir.

Ülkemizde bu konuda yapılan çalışmaları değerlendirecek olursak; Şahan ve ark. (2016), broyler tavuk dışkılarından izole ettikleri çeşitli *Salmonella* serovarlarında içerisinde dominant serotip olarak bulunan *S. Infantis* suşlarının antimikrobiyal etkenlere karşı dirençlilik düzeylerinin yüksekten düşüğe doğru sırasıyla nalidiksik asit, sulfanamid, tetrasiklin, trimetoprim, streptomisin, ampisilin, kloramfenikol, gentamisin ve siprofloksasin olduğu bildirmişlerdir. Yine araştırmacılar, araştırmaya konu olan *Salmonella* suşlarının %89,51 gibi yüksek bir oranda en az 3 ve daha fazla antimikrobiyale karşı dirençli olduğunu da tespit etmişlerdir. Akgeyik (2018) ise, insan ve tavuk orjinli *S. Infantis* suşlarının dirençlilik gösterdikleri antimikrobiyallere karşı dirençlilik düzeylerinin yüksekten düşüğe doğru ampisilin, gentamisin, sefotaksim, seftazidim ve kloramfenikol olarak saptamışlardır.

Sunulan tez çalışmasında, *Salmonella* Infantis suşlarının dirençli olduğu antibiyotiklerin dirençlilik düzeyinin yüksekten düşüğe doğru; ampisilin (%100), nalidiksit asit (%100), siprofloksasin (%100), sefotaksim (%100), seftazidim (%100), tetrasiklin (%96), kanamisin (%96), eritromisin (%96), sülfonamid (%96), streptomisin (%93), trimetoprim/sülfametaksazol (%90), gentamisin (%76) ve kloramfenikol (%66) olduğu belirlenmiştir. Geçmiş dönemde yapılan çalışmalarla birlikte değerlendirdiğimizde, özellikle ampisilin başta olmak üzere aynı antimikrobiyallere karşı benzer seviyelerde dirençlilik görülmekle birlikte, gerek araştırmalara dahil edilen antimikrobiyallerin farklılığı gerekse de örneklemelerdeki farklılıklara ilişkin olarak diğer çeşitli grup antimikrobiyallere karşı değişken seviyelerde dirençlilik varlığı görülmektedir.

Dünyada Salmonellozise neden olan en yaygın serotipler içerisinde *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* ön plana çıkmasına karşın, son yıllarda çeşitli ülkelerde yürütülen kontrol programları ve yaygın aşılama çalışmaları neticesinde bu serovarlarla ilişkin dominantlık düzeyi zaman içerisinde azalmış ve diğer serovarların insidensinde belirgin artış gözlenmiştir (Rabsch ve ark., 2013). Ancak adı geçen serovarlar günümüzde bazı ülkelerde -insidens düzeyi ülkelere göre değişmekle- en yaygın serovarlar olarak rapor edilmesi nedeniyle önemini korumaya devam etmektedir. Ülkemizde tavuk üretim kümeslerinde 7 yıllık bir periyodun (2008-2014) incelendiği bir araştırmada, toplam 2021 adet *Salmonella* izolatının %21,8'inin *S. Enteritidis* serotipi olduğu bildirilmiştir (Güleşen ve ark., 2015). Yine ülkemizde 7 farklı ilde faaliyet gösteren 58 farklı yumurtacı kümeslerinden alınan örneklerden yürütülen çalışmada *S. Enteritidis* serovarının varlığı %40,9 olarak tespit edilmiştir (Kahya ve ark., 2014).

İran'da yürütülen bir çalışmada (Rahmani ve ark., 2013), *S. Enteritidis* suşlarının siprofloksasin ve nalidiksik asite (%94) yüksek oranda dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde çeşitli araştırmalarda da (Morshed and Peighambari (2010) ve Rad ve ark., (2012), *S. Enteritidis* serovarının İran'da ulusal düzeyde

enrofloksasin ve nalidiksik asite yüksek oranda dirençlilik gösterdiği diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmiş olduğu görülmektedir. Brezilya’da yapılan araştırmada (Oliveira ve ark., 2005), çalışmaya dahil edilen 91 adet *S. Enteritidis* izolatında antibiyotik dirençlilik seviyelerinin yüksekten düşüğe doğru tetrasiklin (%15,4), gentamisin (%5,5), trimetoprim (%3,3), ampisilin (%1,1) olduğunu tespit etmişlerdir. Ülkemizde yapılan çalışmalara baktığımızda, Kayseri ilimizde yürütülen bir çalışmada (Kılınç ve Aydın, 2006) ise izolatların seçilen antibiyotiklere karşı dirençlilik seviyelerinin yüksekten düşüğe doğru penisilin (%100), eritromisin (%95), neomisin (%23) ve ampisilin (%20) şeklinde olduğu bildirilmiştir. Daha sonra, Ege bölgesinde iki farklı ilde yürütülen bir çalışmada (Oral ve Türkyılmaz, 2008), *S. Enteritidis* serovarlarının seçilen antibiyotiklere karşı dirençlilik seviyelerinin yüksekten düşüğe doğru eritromisine (%100), trimetoprim-sulfametoksazole (%57,1), gentamisine (%14,2) olduğu tespit edilmiştir.

Sunulan tez çalışmasında, *S. Enteritidis* suşlarının antibiyotik dirençlilik düzeyinin yüksekten düşüğe doğru eritromisin (%100), siprofloksasin (%100), nalidiksik asit (%100), tetrasiklin (%100), sefotaksim (%100), ceftazidim (%100), streptomisin (%96), sülfanomid (%96), ampisilin (%96), trimetoprim/sülfametoksazol (%93), kanamisin (%93), gentamisin (%83), kloramfenikol (%83) olarak bulunmuştur. İki farklı ülke olarak İran ve ülkemizde elde edilen bulgular değerlendirildiğinde benzer şekilde kinolon grubu antibiyotikler içerisinde yer alan iki farklı antibiyotik enrofloksasin ve siprofloksasin ile nalidiksik asite yüksek oranda dirençlilik varlığı saptanmıştır. Bu durum, iki farklı ülkede faaliyet gösteren kümeslerde koruyucu ve sağaltım amaçlı kullanılan antibiyotiklerin seçiminde benzerlik olduğunu göstermektedir. Ancak diğer ülkeler ile kıyaslandığında sunulan tez çalışmasında çok daha fazla farklı grup antimikrobijale karşı yüksek oranda direnç varlığını saptanmasının, ülkemizde *Salmonella* serotiplerinin direnç olumu ile ilgili detaylı çalışmalar yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Malezya’da yapılan bir araştırmada (Thung ve ark., 2016), *S. Typhimurium* serovarının eritromisin, penisilin ve vankomisine %100 dirençli olduğu, diğeri bir grup antibakteriyellere dirençliliğinin yüksekten düşüğe doğru ampisilin (%72,73), amoksisilin (%27,27), sefazolin (%27,27), siprofloksasin (%27,27), nalidiksit asit (%9,09) ve streptomisin (%9,09) şeklinde olduğunu bildirmişlerdir. Ülkemizde Kayseri ilinde yürütölen araştırmada (Kılınç ve Aydın, 2006), *S. Typhimurium* seçölen antibiyotiklere karşı dirençlilik seviyelerinin yüksekten düşüğe doğru penisilin (%100), eritromisin (%100), neomisin (%26,67) ve ampisilin (%26,67) şeklinde olduğu bildirilmiştir. Ege bölgesinde faaliyet gösteren kümeslerden alınan örnekler ile yürütölen bir tez çalışmasında (Kutu, 2017), *S. Typhimurium* izolatlarının seçölen antibiyotiklere göre dirençlilik düzeyinin yüksekten düşüğe doğru penisilin (%100) ve ampisilin (%97) şeklinde olduğu, duyarlılık düzeyinin ise yine yüksekten düşüğe doğru seftriakson (%92), gentamisin (%82), kanamisin (%61) ve sefotaksim (%61) ve tetrasiklin (%51) şeklinde olduğu rapor edilmiştir.

Sunulan tez çalışmasında, *S. Typhimurium* suşlarının streptomisin, sülfanomid, eritromisin, sefotaksim, ampisilin, ceftazidim, nalidiksit asit, kanamisin, siprofloksasin, trimetoprim/sülfametaksazol, tetrasiklin ve gentamisin’e %100 dirençli bulunmuştur.

İki farklı ülkeden elde edilen bulgular değerlendirildiğinde *S. Enteritidis*’te olduğu gibi *S. Typhimurium* serovarının da genellikle penisilin grubu antibakteriyaller ve eritromisine yüksek oranda dirençlilik varlığında benzerlik görölmektedir. Öte yandan tez çalışmasında elde edilen bulgulara yukarıda da söz edildiği gibi çok sayıda farklı grup antimikrobiyale karşı *S. Typhimurium* serovarının %100 dirençlilik göstermesi, bu konuda gerek hayvan sağlığı alanında faaliyet gösteren hekimlerin gerekse de üreticilerin daha dikkatli olması gerektiğini gözler önüne sermektedir.

Sunulan tez çalışmasında araştırmaya konu olan *Salmonella* suşlarının ciddi oranda çeşitli antimikrobiyallere karşı dirençliliğe sahip olması ve 3 serovarin da çoklu ilaç dirençliliği saptanması, bu problemin ülkemizde de ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Her geçen gün artan insan nüfusu ve buna bağlı gıdaya olan talebin artması ile çiftlik ve kümeslerde entansif üretim artışının beraberinde getirdiği hastalık oranlarının artması sonucunda muhtemel olarak uygun olmayan ya da kontrolsüz/aşırı düzeyde antibiyotiklerin kullanımının bir sonucu olarak (Adesiji ve ark., 2014), özellikle gelişmiş ülkelerde hayvansal kökenli gıdalar ve kasaplık et ürünlerinden köken alan bakterilerin antibiyotiklere olan direnç insidensi artmaya devam etmektedir (Van ve ark., 2007). Ayrıca gerek insanlarda gerekse de hayvanları bilinçsiz şekilde antimikrobiyallerin çok yoğun olarak kullanıldığı bazı az gelişmiş ülkelerde, çoklu ilaç dirençliliğine sahip *Salmonella* suşlarının özellikle küçük yaştaki çocuklardaki bakteriyemi olgularına neden olan patojenlerin içerisinde en sık izole edilen patojenler olduğu bildirilmektedir (Fashae ve ark., 2010). Bu durum ilgili antimikrobiyallere olan dirençliliğin dirençli patojen veya direnç genine sahip taşıyıcı özellikteki kommensal organizmalar aracılığı ile insanlara geçişine neden olmaktadır. Bundan dolayı, çiftlik ve kümeslerdeki antimikrobiyal ajanların kullanımının yol açabileceği hem insanlarda hem de hayvanlardaki antimikrobiyal dirençli patojenlerin varlığını, bu patojenlerdeki dirençlilik düzeyinin artışının belirlenmesi ve özellikle de çoklu ilaç direncine ilişkin genlerin araştırılması günümüzde araştırmacıların yoğun ilgisini çeken araştırma konularının başında gelmektedir (Mann ve ark., 2011 ve Morley ve ark., 2011).

Hamada ve ark. (2003), 12 adet çoklu antibiyotik dirençliliğine sahip *S. Infantis* suşlarının tümünde kanamisin dirençliliği ile ilişkili olarak *aphA* geninin varlığını tespit etmişlerdir. Shahada ve ark. (2010), 2 yıl süresince (2004-2006) broylerlerden izole ettikleri 120 adet kanamisin dirençli *S. Infantis* suşlarının tamamında (%100) *aphA* geni varlığını rapor etmişlerdir. Dionisi ve ark. (2011), gıda ile hayvansal kökenli ve -çoğunlukla- insan orijinli olarak izole edilen 70 adet *S. Infantis* suşu içerisinde

kanamisin direncine sahip 26 adet suşun tamamında *aphA* geninin varlığını bildirmişlerdir. Akgeyik (2018), yapmış olduğu çalışmasında tavuk orijinli *S. Infantis* suşlarının %62'sinde kanamisin direncinde rol oynayan *aphA* geni varlığını saptamıştır.

Sunulan tez çalışmasında, *S. Infantis* suşlarının %56,67'sinde kanamisin direncinde rol oynayan *aphA* geni varlığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuç rakamsal olarak ülkemizde yapılan bir önceki çalışma Akgeyik (2018) ile benzerlik gösterse de diğer ülkelerdeki çalışmalar ile farklılık göstermektedir (Dionisi ve ark., 2011, Hamada ve ark., 2003 ve Shadada ve ark., 2010). Ayrıca çalışmamızda diğer suşları da değerlendirdiğimizde, *aphA* genine sahip suşlar yüksekten düşüğe doğru *S. Infantis* (%56,67) ve *S. Enteritidis* (%40) olduğu, ancak *S. Typhimurium* suşlarının hiçbirinde *aphA* geni tespit edilmemiştir.

Shadada ve ark. (2010), 2004-2006 yılları arası broylerlerden izole ettikleri 120 adet *S. Infantis* suşundan oksitetrasiklin direnci saptanan tüm suşlarda *tet(A)* geni saptanmasına karşın, *tet(B)* ve *tet(G)* geni tespit etmemişlerdir. Adesiji ve ark. (2014), tetrasiklin direnci saptanan 30 adet *Salmonella* suşunun 20' sinde *tetA* geni varlığını tespit etmişlerdir. Dalibor ve ark. (2015), tavuklardan izole edilen 18 adet *S. Infantis* suşunda tetrasiklin dirençli olarak saptananların hepsinde *tet(A)* genini saptarken, tetrasiklin dirençli tüm suşlarda *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)* ve *tet(G)* genlerinin tespit edilmediğini bildirmişlerdir. Waghamare ve ark. (2018), tetrasiklin direnci olan *S. Virchow*, *S. Newport* ve *S. Typhimurium* serotiplerinin hepsinde *tetA* geni saptamışlardır. Bu çalışmada serotip bazında bakıldığında farklılıklar saptanmıştır. Tetrasiklin direnci saptanan *Salmonella* suşları arasında en fazla *tetA* geni taşıyan serotip *S. Enteritidis* olarak bulunmuştur. Tawyabur ve ark. (2020), tetrasiklin direnci saptanan 27 *Salmonella* suşunun 25'inde *tetA* geni varlığını bildirmişlerdir.

Sunulan tez çalışmasında, *tetA* genine sahip suşların yüksekten düşüğe doğru *S. Enteritidis* (%16,67) ve *S. Typhimurium* (%8,57) olduğu, ancak *S. Infantis* suşlarının hiçbirinde *tetA* geni tespit edilmemiştir. Elde edilen bulgulara göre *tetA* geni varlığının çalışmaya dahil edilen serovar içerisinde yaygın olmadığı görülmekle birlikte, farklı oranlarda da olsa bazı araştırmacıların Waghamare ve ark. (2018) bulguları ile benzer şekilde en yüksek oranda *tetA* geni varlığı *S. Enteritidis* serovarında tespit edilmiştir.

Alrich ve ark. (2017), bölgelerinden izole ettikleri 29 adet *S. Enteritidis* suşunun 13'ünde *gyrA* mutasyonu saptamış ve zoonotik önem taşıyan bu serotipdeki direnç gelişiminin daha yaygın bir şekilde izlenmesinin önemini vurgulamıştır. Jovcic ve ark. (2020), kullanılan tüm serotipleri içeren çalışmalarında yaygın *gyrA* gen varlığındaki mutasyon oranlarını incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlar ile değerlendirildiğinde sunulan tez çalışmamızda da benzer şekilde *S. Typhimurium* serotiplerinde yüksek oranda (%62,86) *gyrA* geni varlığı tespit edilmiş olup ve bunu *S. Enteritidis* (%46,67) ve *S. Infantis* (%23,33) suşlarında izlediği belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Araştırmamıza konu olan 3 farklı *Salmonella* suşunun ciddi oranda farklı antimikrobiyallere karşı dirençliliğe sahip olması ve çoklu antibiyotik dirençliliği göstermesi önem taşımaktadır.

2. *Salmonella* suşlarında saptanan farklı antimikrobiyallere karşı yüksek orandaki dirençlilik gerek Veteriner hekimlerin ve gerekse de kümes sahiplerinin/yöneticilerinin hastalıkların tedavisinde antibiyotiklerin kullanımında daha dikkatli ve daha seçici olunması gerektiğini göstermektedir.

3. Elde edilen sonuçlar, *Salmonella* infeksiyonlarında suşların doğru ve hızlı bir şekilde teşhis edilmesi, patojen türünün tespiti/teplendirilmesi ve bu patojenler için antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılmasının ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Çünkü bu durum ilgili infeksiyonların tedavisi ile kümeslerdeki hayvan varlığının devamlılığının sağlanmasında önemli olduğu kadar hayvansal kaynaklı gıdaların gıda ürünlerine bağlı olarak insan sağlığının korunması ve insanlardaki infeksiyonların tedavi başarısı içinde kritik öneme sahiptir.

4. Araştırmaya dahil edilen *Salmonella* suşlarındaki belirli antimikrobiyallere karşı tespit edilen yüksek orandaki dirençlilik ve çoklu antibiyotik dirençliliği de *Salmonella* infeksiyonlarının kontrolüne yönelik programların yürütülmesinin başta insan ve halk sağlığı konusu olmak üzere önemini göstermiştir.

5. Ayrıca ciddi oranda antimikrobiyale karşı direnç ve genetik mutasyonların varlığı sadece enfeksiyon varlığında değil, ayrıca hastalığın bulaşmasını engelleme noktasında biyogüvenlik önlemleri noktasında kümeslerin periyodik olarak düzenli bakteriyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerle izlenmesi, patojen yönünde pozitiflik/negatifliğinin tespiti ve gerekli durumlarda ise tip spesifik aşılardan kullanılmasının önemli ve faydalı olacağını düşündürmektedir.

6. *Salmonella* serovarlarında insidens ve antibiyotik dirençlilik seviyelerinin farklılık göstermesi nedeniyle, tez çalışmasına dahil edilen serovarların dışında diğer *Salmonella* serovarları için de ülkemizde faaliyet gösteren işletmelerde

dağılımının ve antibiyotik dirençlilik düzeyinin tespiti amacıyla daha geniş kapsamlı epidemiyolojik çalışmaların yapılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.



ÖZET

Tavuk Orijinli *Salmonella* Suşlarında Antibiyotik Dirençliliğinin Konvansiyonel ve Moleküler Analizi

Bu araştırmada, tavuk orijinli *Salmonella* suşlarında antibiyotik dirençliliğinin konvansiyonel ve moleküler olarak analiz edilmesi amaçlandı.

Çalışmada, tavuk orijinli 30 *S. Infantis* suşu, 30 *S. Enteritidis* ve 35 *S. Typhimurium* olmak üzere toplam 95 adet suş kullanıldı. Kirby-Bauer disk difüzyon tekniğine esas alınarak gentamisin, kanamisin, streptomisin, eritromisin, tetrasiklin, siprofloksasin, nalidiksik asit, ampisilin, sefotaksim ve seftazidim, kloramfenikol, sulfonamid ve trimetoprim/sülfametaksazol antibiyotikleri çalışıldı. Antibiyotik dirençliliğin moleküler olarak analizi için tetrasiklin direncinde rol oynayan *tet(A)*, kinolon direncinde rol oynayan *gyrA* ve aminoglikozid grubundan kanamisin direncinde rol oynayan *aphA* genlerine spesifik primerlerin kullanıldığı konvansiyonel PCR yöntemi uygulandı.

S. Infantis suşlarının 28 (%93)'i streptomisin'e, 29 (%96) 'u sulfonamid'e, 29 (%96) 'u eritromisin'e, 30 (%100)'u sefotaksim'e, 30 (%100)'u ampisilin'e, 30 (%100)'u ceftazidim'e, 27 (%90) 'si trimetoprim/sülfametaksazol'e, (%96) 'u tetrasiklin'e, 23 (%76)'ü gentamisin'e, 20 (%66) 'si kloramfenikol'e, 30(%100)'u nalidiksik asit'e, 29 (%96) 'u kanamisin'e, 30 (%100)'u siprofloksasin'e dirençli bulunmuştur. *S. Enteritidis* suşlarının 29 (%96) 'u streptomisin'e, 29 (%96)'u sulfonamid'e, 30 (%100)'u eritromisin'e, 30 (%100)'u sefotaksim'e, 29 (%96)'u ampisilin'e, 30 (%100)'u ceftazidim'e, 28 (%93)'i trimetoprim/sülfametaksazol'e, 30(%100)'u tetrasiklin'e, 25(%83)'i gentamisin'e, 23 (%83)'ü kloramfenikol'e, 30 (%100)'u nalidiksik asit'e, 28 (%93) 'i kanamisin'e, 30 (%100)'u siprofloksasin'e dirençli bulunmuştur. *S. Typhimurium* suşlarının 30 (%100)'u streptomisin'e, 30 (%100)'u sulfonamid'e, 30 (%100)'u eritromisin'e, (%100)'u sefotaksim'e, 30 (%100)'u ampisilin'e, 30 (%100)'u ceftazidim'e, 30 (%100)'u trimetoprim/sülfametaksazol'e, 30 (%100) 'u tetrasiklin'e, 30 (%100)'u gentamisin'e, 21 (%60)'i kloramfenikol'e, 30 (%100)'u nalidiksik asit'e, 30 (%100)'u kanamisin'e, 30 (%100)'u siprofloksasin'e dirençli bulunmuştur.

Aminoglikozid grubundan kanamisin direncinde rol oynayan *aphA* geni hiçbir *S. Infantis* suşunda tespit edilmezken, *S. Enteritidis* suşundan 5 tanesinde, 35 adet *S. Typhimurium* suşundan 3 tanesinde saptandı. Tetrasiklin direncinde rol oynayan *tetA* geni 30 adet *S. Infantis* suşundan 17 tanesinde, 30 adet *S. Enteritidis* suşundan 12 tanesinde, 35 adet *S. Typhimurium*

suşundan 1 tanesinde saptandı. Kinolon direncinde rol oynayan *gyrA* 30 adet *S. Infantis* suşundan 7 tanesinde, 30 adet *S. Enteritidis* suşundan 14, 35 adet *S. Typhimurium* suşundan 22 (%63)'sinde saptandı.

Sonuç olarak çalışmaya dahil edilen Türkiye'nin farklı bölgelerinde faaliyet gösteren işletmelerden elde edilen *Salmonella* suşlarının seçilen antibiyotiklere karşı önemli oranda dirence sahip olduğu ve benzer şekilde çoklu antibiyotik direncine taşıdığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik, Çoklu antibiyotik direnci, *Salmonella*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*.



SUMMARY

Molecular and Conventional Analysis of Antibiotic Resistance in *Salmonella* Strains Isolated from Chicken

In this study, it was aimed to analysed antibiotic resistance via conventional and molecular methods in *Salmonella* strains originated from chickens.

In the study, bedding materials were collected for *Salmonella* isolation from 523 broiler and laying chicken coops in different region in Turkey. Totally, isolated 95 strains including strains of *S. Infantis* (n=30), *S. Enteritidis* (n=30) and *S. Typhimurium* (n=35) were used as a material. Gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, tetracycline, ciprofloxacin, nalidixic acid, ampicillin, cefotaxime and ceftazidime, chloramphenicol, sulfonamide and trimethoprim/sulfamethoxazole were investigated for antibiotic susceptibility tests of strains based on the Kirby-Bauer method. Analysing for the antibiotic resistance, conventional Polymerase Chain Reaction method was applied with using specific primers against *tet(A)* gene related with tetracycline resistance, *gyrA* gene related with quinolone resistance and *aphA* gene related with kanamycin resistance in aminoglycoside.

It was found that out of the 30 strains, 28 (93%), 29 (96%), 29 (96%), 30 (100%), 30 (100%), 30 (100%), 27 (90%), 29 (96%), 23 (76%), 20 (66%), 30 (100%), 29 (96%), and 30 (100%) of the *S. Infantis* strains were resistant to streptomycin, sulfonamide, erythromycin, cefotaxime, ampicillin, ceftazidime, trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracycline, gentamycin, chloramphenicol, nalidixic acid, kanamycin and ciprofloxacin, respectively. It was found that out of the 30 strains, 29 (96%), 29 (96%), 30 (100%), 30 (100%), 29 (96%), 30 (100%), 28 (93%), 30 (100%), 25 (83%), 23 (83%), 30 (100%), 28 (93%), and 30 (100%) of the *S. Enteritidis* strains were resistant to streptomycin, sulfonamide, erythromycin, cefotaxime, ampicillin, ceftazidime, trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracycline, gentamycin, chloramphenicol, nalidixic acid, kanamycin and ciprofloxacin, respectively. It was found that out of the 30 strains, 30 (100%), 30 (100%), 30 (100%), 30 (100%), 30 (100%), 30 (100%), 30 (100%), 30 (100%), 30 (100%), 21 (60%), 30 (100%), 30 (100%), and 30 (100%) of the *S. Typhimurium* strains were resistant to streptomycin, sulfonamide, erythromycin, cefotaxime, ampicillin, ceftazidime, trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracycline, gentamycin, chloramphenicol, nalidixic acid, kanamycin and ciprofloxacin, respectively.

aphA gene related with kanamycin resistance in aminoglycoside were detected in 5 strains out of the 30 *S. Enteritidis* strains and 3 strains out of the 35 *S. Typhimurium* strains,

however, the gene were not detected any *S. Infantis* strain. *tet(A)* gene related with tetracycline resistance were detected in 17 strains out of the 30 *Salmonella* *Infantis*, 12 strains out of the 30 *Salmonella* *Enteritidis* strains and 1 strain out of the 35 *S. Typhimurium* strains. *gyrA* gene related with quinolone resistance were detected in 7 strains out of the 30 *S. Infantis*, 14 strains out of the 30 *S. Enteritidis* strains and 22 strains out of the 35 *S. Typhimurium* strains.

As a conclusion, *Salmonella* strains isolated from chicken coops in different region in Turkey had higher resistance rate against to the selected antibiotics and multiple antibiotic resistance.

Keywords: Antibiotic, Multi-antibiotic resistance, *Salmonella*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*



KAYNAKLAR

- ABBASOĞLU D (2009). *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *infantis* suşlarında çoklu ilaç dirençliliğinin genetik doğası. Yüksek Lisans, Ankara Üniversitesi.
- ADESIJI YO, DEEKSHIT VK, KARUNASAGAR I (2014). Antimicrobial-resistant genes associated with *Salmonella* spp. isolated from human, poultry, and seafood sources. *Food Sci Nutr*, **2**: 436-442.
- AKAN M (2008). Kanatlılarda *Salmonella* infeksiyonları ve kontrolünde temel prensipler. *Mektup Ankara*, **6**: 3-5.
- AKGEYİK M (2018). Tavuk ve İnsan Orijinli *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Infantis* Suşlarında Antibiyotik Direnç Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi.
- ANGELO KM, REYNOLDS J, KARP BE, HOEKSTRA RM, SCHEEL CM, FRIEDMAN C (2016). Antimicrobial Resistance Among Nontyphoidal *Salmonella* Isolated From Blood in the United States, 2003–2013. *J. Infect. D.*, **214**: 1565-1570.
- ANONIM (2016). National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report, 2016. Erişim Adresi: <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/2016-Salmonella-report-508.pdf>. Erişim Tarihi: 17/10/2021.
- ANONIM (2018). T.C. Gıda Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal *Salmonella* Kontrol Programı. Erişim Adresi: [\[https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/Veteriner%20Hizmetleri/USKP.rar\]](https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/Veteriner%20Hizmetleri/USKP.rar). Erişim Tarihi: 15/12/2021.
- ASAI T, ITAGAKI M, SHIROKI Y, YAMADA M, TOKORO M, KOJIMA A, ISHIHARA K, ESAKI H, TAMURA Y, TAKAHASHI T (2006). Antimicrobial resistance types and genes in *Salmonella enterica* *infantis* isolates from retail raw chicken meat and broiler chickens on farms. *J Food Prot*, **69**: 214-6.
- ASGHARPOUR F, RAJABNIA R, FERDOSI SHAHANDASHTI E, MARASHI MA, KHALILIAN M, MOULANA Z (2014). Investigation of Class I Integron in *Salmonella* *infantis*

and Its Association With Drug Resistance. *Jundishapur J Microbiol*, **7**: e10019.

ATA Z, DINÇ G, YBAR A, MÜŞTAK HK, ŞAHAN Ö (2015). Extended Spectrum Beta-Lactamase Activity And Multidrug Resistance Of Salmonella Serovars Isolated From Chicken Carcasses From Different Regions Of Turkey. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, **62**: 119-123.

AVŞAROĞLU MD (2007). Isolation, Molecular characterization of Food-Borne Drug Resistant Salmonella spp. and Detection of Class 1 Integrins. Doktora Tezi, Middle East Technical University.

BARROW P, HUGGINS M, LOVELL M (1994). Host specificity of Salmonella infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. *Infect. Immun.*, **62**: 4602-4610.

BELL C, KYRIAKIDES A (2002). Taxonomy of Salmonella. *Salmonella*. Blackwell Science

BHOWMICK PP, DEVEGOWDA D, RUWANDEEPIKA HAD, KARUNASAGAR I, KARUNASAGAR I (2011). Presence of Salmonella pathogenicity island 2 genes in seafood-associated Salmonella serovars and the role of the sseC gene in survival of Salmonella enterica serovar Weltevreden in epithelial cells. *Microbiology*, **157**: 160-168.

BILGEHAN H (2004). Klinik Mikrobiyolojik Tanı, İzmir, Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları.

BOHEZ L, DUCATELLE R, PASMANS F, BOTTELDOORN N, HAESBROUCK F, VAN IMMERSEEL F (2006). Salmonella enterica serovar Enteritidis colonization of the chicken caecum requires the HilA regulatory protein. *Vet Microbiol*, **116**: 202-210.

BRENNER F, VILLAR R, ANGULO F, TAUXE R, SWAMINATHAN B (2000). Salmonella nomenclature. *J Clin Microbiol*, **38**: 2465-2467.

CHESSA D, DORSEY CW, WINTER M, BÄUMLER AJ (2008a). Binding specificity of Salmonella plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics. *J Biol Chem*, **283**: 8118-8124.

CHESSA D, WINTER MG, NUCCIO SP, TÜKEL C, BÄUMLER AJ (2008b). RosE represses Std fimbrial expression in Salmonella enterica serotype Typhimurium. *Mol Microbiol*, **68**: 573-

- CUYPERS WL, JACOBS J, WONG V, KLEMM EJ, DEBORGGRAEVE S, VAN PUYVELDE S (2018). Fluoroquinolone resistance in Salmonella: insights by whole-genome sequencing. *Microb Genom*, **4**: e000195.
- DIONISI AM, LUCARELLI C, BENEDETTI I, OWCZAREK S, LUZZI I (2011). Molecular characterisation of multidrug-resistant Salmonella enterica serotype Infantis from humans, animals and the environment in Italy. *Int J Antimicrob Agents*, **38**: 384-389.
- EFSA (2014). Data dictionaries–guidelines for reporting data on zoonoses, antimicrobial resistance and food-borne outbreaks using the EFSA data models for the Data Collection Framework (DCF) to be used in 2014, for 2013 data. Wiley Online Library.
- EFSA, ECDPC (2012). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, **10**: 2597.
- EFSA, ECDPC (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, **13**: 3991.
- EFSA, ECDPC (2016). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA journal*, **14**: 4380.
- ENG S-K, PUSPARAJAH P, AB MUTALIB N-S, SER H-L, CHAN K-G, LEE L-H (2015). Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front. Life Sci.*, **8**: 284-293.
- ERDEM B (2002). Salmonella Türleri. In: TOPÇU WILLIKE, A., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M. (eds.) *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*.
- EROL İ (2010). Salmonella enfeksiyonlarının zoonotik önemi. *Türkiye Klinikleri J VetSci*, **1**: 105-113.
- FASHAE K, OGUNSOLA F, AARESTRUP FM, HENDRIKSEN RS (2010). Antimicrobial susceptibility and serovars of Salmonella from chickens and humans in Ibadan, Nigeria. *J. Infect. Dev. Ctries*, **4**: 484–494.

- FOLEY SL, LYNNE AM, NAYAK R (2008). Salmonella challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J. Anim. Sci.*, **86**: E149-E162.
- GAST RK (2008). Paratyphoid infections. *Diseases of Poultry*. 12th ed., **P**: 693- 713.
- GAST RK, PORTER JR RE (2020). Salmonella infections. *Diseases of poultry*, **P**: 717-753.
- GRIMONT PA, GRIMONT F, BOUVET P (2000). Taxonomy of the genus Salmonella. *Salmonella in domestic animals*, **P**: 1-17.
- GRIMONT PA, WEILL F-X (2007). Antigenic formulae of the Salmonella serovars. *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*, 9th ed., **P**: 1-166.
- GYLES CL (2008). Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim Health Res Rev*, **9**:149-58.
- HENSEL M (2000). Salmonella pathogenicity island 2. *Mol Microbiol*, **36**: 1015-1023.
- HOLDEN DW (2002). Trafficking of the Salmonella vacuole in macrophages. *Traffic*, **3**: 161-169.
- HOPKINS KL, THRELFALL EJ (2004). Frequency and polymorphism of sopE in isolates of Salmonella enterica belonging to the ten most prevalent serotypes in England and Wales. *J Med Microbiol*, **53**: 539-543.
- ISO6579-1 (2017). Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella-Part 1: Detection of Salmonella spp. *Geneva*.
- İZGÜR M (2002). Salmonella, Koli infeksiyonları. In: İZGÜR, M. *Kanatlı Hayvan Hastalıkları*. Medisan Yayın Serisi.
- İZGÜR M (2006). Salmonella İnfeksiyonları. In: AYDIN, N. P., J. (ed.) *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*. Ankara: İlke-Emek Matbaacılık veYayıncılık.
- İZGÜR M (2010). Kanatlı Salmonella Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, **1**: 61-68.

- JAJERE SM (2019). A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary world*, **12**: 504.
- KILINÇ Ü, AYDIN F (2006). Kayseri yöresindeki tavukçuluk işletmelerinden toplanan tavuklardan izole edilen Salmonella türlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, **15**: 35-40.
- KNODLER LA, VALLANCE BA, CELLI J, WINFREE S, HANSEN B, MONTERO M, STEELE-MORTIMER O (2010). Dissemination of invasive Salmonella via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**: 17733-17738.
- KUTU A (2017). *Kanatlılarda salmonella türlerinin izolasyonu, serotiplendirilmesi ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi.
- KÜÇÜK B (2020). *Tavuk Orijinli Salmonella Enteritidis Suşlarında Siprofloksasin Direncinin Araştırılması* Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi.
- KWON YM, RICKE SC (1998). Induction of acid resistance of Salmonella typhimurium by exposure to short-chain fatty acids. *Appl Environ Microbiol*, **64**: 3458-3463.
- LAI J, WU C, WU C, QI J, WANG Y, WANG H, LIU Y, SHEN J (2014). Serotype distribution and antibiotic resistance of Salmonella in food-producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012. *Int J Food Microbiol*, **180**: 30-8.
- LE MINOR L, VERON M, POPOFF M (1982). A proposal for Salmonella nomenclature. *Ann. Microbiol.*, **P**: 245-254.
- LOSTROH CP, LEE CA (2001). The Salmonella pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect*, **3**: 1281-91.
- LUNN DL, FABREGA A, SANCHEZ-CESPEDES J, VILA J (2010). Prevalence of mechanisms decreasing quinolone-susceptibility among Salmonella spp. clinical isolates. *Int. Microbiol*, **13(1)**: 15-20.

- MACEDO-VIÑAS M, CORDEIRO NF, BADO I, HERRERA-LEON S, VOLA M, ROBINO L, GONZALEZ-SANZ R, MATEOS S, SCHELOTTO F, ALGORTA G, AYALA JA, ECHEITA A, VIGNOLI R (2009). Surveillance of antibiotic resistance evolution and detection of class 1 and 2 integrons in human isolates of multi-resistant Salmonella Typhimurium obtained in Uruguay between 1976 and 2000. *Int J Infect Dis*, **13**: 342-8.
- MANN S, SILER JD, JORDAN D, WARNICK LD (2011). Antimicrobial susceptibility of fecal Escherichia coli isolates in dairy cows following systemic treatment with ceftiofur or penicillin. *Foodborne Pathog. Dis.* **8**: 861–867.
- MENDONÇA EP, MELO RT, OLIVEIRA MR, MONTEIRO GP, PERES PA, FONSECA BB, GIOMBELLI A, ROSSI DA (2020). Characteristics of virulence, resistance and genetic diversity of strains of Salmonella Infantis isolated from broiler chicken in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **40**: 29-38.
- MILLER T, PRAGER R, RABSCH W, FEHLHABER K, VOSS M (2010). Epidemiological relationship between Salmonella Infantis isolates of human and broiler origin. *Lohmann Inf*, **45**: 27.
- MIROLD S, RABSCH W, ROHDE M, STENDER S, TSCHÄPE H, RÜSSMANN H, IGWE E, HARDT WD (1999). Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic Salmonella typhimurium strain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 9845-9850.
- MORLEY PS, DARGATZ DA, HYATT DR, DEWELL GA, PATTERSON JG, BURGESS BA (2011). Effects of restricted antimicrobial exposure on antimicrobial resistance in fecal Escherichia coli from feedlot cattle. *Foodborne Pathog. Dis.* **8**: 87–98.
- MORSHED R, PEIGHAMBARİ SM (2010). Drug resistance, plasmid profile and random amplified polymorphic DNA analysis of Iranian isolates of Salmonella Enteritidis. *New Microbiol*, **33**: 47–56.
- MOURÃO J, REBELO A, RIBEIRO S, PEIXE L, NOVAIS C, ANTUNES P (2020). Atypical Non-H2S-Producing Monophasic Salmonella Typhimurium ST3478 Strains from Chicken Meat at

Processing Stage Are Adapted to Diverse Stresses. *Pathogens*, **9**: 701.

MURRAY P, PFALLER M, JORGENSEN J, YOLKEN R (2003). Manual of Clinical Microbiology 8th Edition Volume I. USA.

NARMS. (2015). 2015 Human Isolates Surveillance Report. Erişim Adresi: https://www.cdc.gov/narms/pdf/2015-NARMS-Annual-Report-cleared_508.pdf . Erişim tarihi: 25/12/2021.

NATARO JP, BOPP CA, FIELDS PI, KAPER JB, STROCKBINE NA (2011). Escherichia, shigella, and salmonella. Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition. American Society of Microbiology.

O'REGAN E, QUINN T, FRYE JG, PAGÈS JM, PORWOLLIK S, FEDORKA-CRAY PJ, MCCLELLAND M, FANNING S (2010). Fitness costs and stability of a high-level ciprofloxacin resistance phenotype in *Salmonella enterica* serotype enteritidis: reduced infectivity associated with decreased expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 genes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **54**: 367-74.

OLIVEIRA SD, FLORES FS, SANTOS LR (2005). Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry related samples. *Int J Food Microbiol*, **97**: 297–305.

ÖZYURT T (2011). İzmir ve çevresinde kanatlı etlerinden izole edilen *Salmonella* türlerinin prevalansı ve antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi.

PUI C, WONG W, CHAI L, TUNUNG R, JEYALETCHUMI P, HIDAYAH N, UBONG A, FARINAZLEEN M, CHEAH Y, SON R (2011). *Salmonella*: A foodborne pathogen. *Int. Food Res. J.*, **18**: 465- 473.

RAD M, KOOSHAN M, MESGARANI H (2012). Quinolone resistance among *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* of animal origin. *Comp Clin Pathol*, **21**: 161–165.

QUINN PJ, MARKEY BK, LEONARD FC, HARTIGAN P, FANNING S, FITZPATRICK E (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease*, John Wiley & Sons.

- RAHMANI M, PEIGHAMBARI SM, SVENDSEN CA, CAVACO LM, AGERSØ Y, HENDRIKSEN RS (2013). Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. *BMC Vet. Res.*, **9**: 66.
- RUSSELL SM (2012). *Controlling Salmonella in poultry production and processing*, **p**: 16-25.
- SAREYYÜPOĞLU B (2010). Kanatlı *Salmonella* Enfeksiyonlarının Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle Teşhisi. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, **1**: 69-79.
- SCHLUMBERGER MC, HARDT WD (2006). *Salmonella* type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Curr Opin Microbiol*, **9**: 46-54.
- SCHWARZ S, CHASLUS-DANCLA E (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res*, **32**: 201-225.
- SHAHADA F, SUGIYAMA H, CHUMA T, SUEYOSHI M, OKAMOTO K (2010). Genetic analysis of multi-drug resistance and the clonal dissemination of beta-lactam resistance in *Salmonella* Infantis isolated from broilers. *Vet Microbiol*, **140**: 136-141.
- SIRIKEN BT, H. (2013). Poultry Meat and Salmonellosis. *Animal Health, Prod and Hyg*, **2**: 174-182.
- SISAK F, HAVLICKOVA H, HRADECKA H, RYCHLIK I, KOLACKOVA I, KARPISKOVA R (2006). Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. isolates from pigs in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina*, **51**: 303-310.
- STEVENS MP, HUMPHREY TJ, MASKELL DJ (2009). Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **364**: 2709-23.
- ŞAHAN Ö, ARAL EM, ADEN MMA, AKSOY A, YILMAZ Ö, JAHED R, AKAN M (2016). Türkiye'deki broyler tavuk işletmelerinden izole edilen *Salmonella* serovarlarının antimikrobiyel direnç durumu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **63**: 1-6.

- TAWYABUR M, ISLAM MS, SOBUR MA, HOSSAIN MJ, MAHMUD MM, PAULS, HOSSAIN MT, ASHOUR HM, RAHMAN MT (2020). Isolation and Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from Healthy and Diseased Turkeys. *Antibiotics (Basel)*, **9**: 770.
- TIERREZ A, GARCÍA-DEL PORTILLO F (2005). New concepts in *Salmonella* virulence: the importance of reducing the intracellular growth rate in the host. *Cell Microbiol*, **7**: 901-909.
- TSAI M-H, WU S-R, LEE H-Y, CHEN C-L, LIN T-Y, HUANG Y-C, CHIU C-H (2012). Recognition of mechanisms involved in bile resistance important to halting antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **40**: 151-157.
- UZZAU S, BROWN DJ, WALLIS T, RUBINO S, LEORI G, BERNARD S, CASADESÚS J, PLATT DJ, OLSEN JE (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology & Infection*, **125**: 229-255.
- VAN TT, MOUTAFIS G, ISTIVAN T, TRAN LT, COLOE PJ (2007). Detection of *Salmonella* spp. in retail raw food samples from Vietnam and characterization of their antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6885-6890.
- WAGHAMARE RN, PATURKAR AM, VAIDYA VM, ZENDE RJ, DUBAL ZN, DWIVEDI A, GAIKWAD RV (2018). Phenotypic and genotypic drug resistance profile of *Salmonella* serovars isolated from poultry farm and processing units located in and around Mumbai city, India. *Vet World*, **11**: 1682-1688.
- WAGNER C, HENSEL M (2011). Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Adv Exp Med Biol*, **715**: 17-34.
- WALLIS TS, GALYOV EE (2000). Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol*, **36**: 997-1005.
- WHITE AP, GIBSON DL, COLLINSON SK, BANSER PA, KAY WW (2003). Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *J Bacteriol*, **185**: 5398-5407.

- WHITE DG, ZHAO S, SUDLER R, AYERS S, FRIEDMAN S, CHEN S, MCDERMOTT PF, MCDERMOTT S, WAGNER DD, MENG J (2001). The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats. *N Engl J Med*, **345**: 1147-1154.
- WIGLEY P, HULME SD, POWERS C, BEAL RK, BERCHIERI JR A, SMITH A, BARROW P (2005). Infection of the reproductive tract and eggs with *Salmonella enterica* serovar pullorum in the chicken is associated with suppression of cellular immunity at sexual maturity. *Infection and immunity*, **73**: 2986-2990.
- WRAY C, WRAY A (2000). *Salmonella in domestic animals*, Cabi.
- XIE J, WU F, XU X, YANG X, ZHAO R, MA Q, LI P, WANG L, HAO R, JIA L (2018). Antibiotic resistance and molecular characterization of the hydrogen sulfide-negative phenotype among diverse *Salmonella* serovars in China. *BMC infectious diseases*, **18**: 1-9.
- YAVARI L (2012). *Antibiotic Resistance in Salmonella enterica and the Role of Animal and Animal Food Control*. Thesis. Umea Universitet.
- YENER B, AKÇELİK N, ŞANLIBABA P, AKÇELİK M (2012). Çoklu ilaç dirençli *Salmonella* suşlarının tanısı. *Türk Hij Den Biyol Derg.*, **69**: 201- 212.