

**Şanlıurfa ili ve Civarındaki Klinik İnsan ve Hayvan Vakaları
ile Gıdaladaki *Salmonella* Çeşitliliğininin Moleküler
Düzeyde Belirlenmesi**

Program Kodu: 3501

Proje No: 1110192

Proje Yürütücüsü:

Yrd. Doç. Dr. Yeşim SOYER

Araştırmacı(lar):

Yrd. Doç. Dr. Dilek Avşaroglu

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Avni Kırmacı

Doç. Dr. Osman Yaşar Tel

Prof. Dr. Fadile Yıldız Zeyrek

Danışman(lar):

Prof. Dr. Nihat Dilsiz

Prof. Dr. Martin Wiedmann

Bursiyerler:

Ece Bulut

Elif Günel

HAZİRAN 2014

ANKARA

ÖNSÖZ

“Şanlıurfa ili ve Civarındaki Klinik İnsan ve Hayvan Vakaları ile Gıdaladaki *Salmonella* Çeşitliliğininin Moleküler Düzeyde Belirlenmesi” konulu ve 111O192 no’lu bu proje 15 Aralık 2011- 15 Haziran 2014 tarihleri arasında gerçekleştirilmiş olup TÜBİTAK- TOVAG tarafından desteklenmiştir.

Proje bütçesi 242.625 YTL’dir.

Proje çalışmaları, Yrd. Doç. Dr. Yeşim Soyer’in yürütücülüğünde, Prof. Dr. Fadile Yıldız Zeyrek, Doç. Dr. Osman Yaşar Tel, Yrd. Doç. Dr. Dilek Avşaroglu ve Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Avni Kırmacı ile birlikte yapılmıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	2
İÇİNDEKİLER.....	3
TABLO LİSTESİ	5
KISALTMALAR	6
ABSTRACT	8
1. GİRİŞ	9
2. LİTERATÜR ÖZETİ	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1 GEREÇ	21
3.1.1 Cihazlar, Kimyasal Maddeler ile Cam Plastik Sarf Malzemeler	21
3.1.2 İnsan, Hayvan ve Klinik İnsan Örnekleri ile <i>Salmonella</i> İzolatları	21
3.1.3 Kimyasallar, Enzimler ve Antimikrobiyaller	23
3.1.4 Analizler için Kullanılan Bilgisayar Yazılımları	23
3.2 YÖNTEM	23
3.2.1 <i>Salmonella</i> İzolasyonu	23
3.2.2 <i>Salmonella</i> Doğrulanması ve Saklama	24
3.2.3 Serotiplendirme	26
3.2.4 Multi Lokus Sekans Tiplendirme (MLST) Analizi	26
3.2.5 <i>Salmonella</i> İzolatlarının Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Saptanması	28
3.2.6 Vuruşlu Alan Jel Elektroforezi (PFGE) Analizi	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	36
4.1 Gıda örneklerinde <i>Salmonella</i> prevalansı ve mevsimsellik dağılımları	36
4.2 Hayvan dışkı örneklerinde <i>Salmonella</i> prevalansı	39
4.3 Klinik İnsan İzolatları	41
4.4 Gıda izolatları, hayvan ve insan dışkı izolatlarında serotiplendirme	41
4.4 Çoklu Alan Sekans Tiplendirmesi (MLST)	45
4.4.1 <i>Salmonella</i> serotip ve STlerinin kaynak ve coğrafi bölge açısından incelenmesi	50
4.5 Vuruşlu Alan Elektroforezi (PFGE)	51

4.6. Antimikrobiyal dirençlilik analiz sonuçları	60
4.6.1. Disk difüzyon yöntemi ile <i>Salmonella</i> izolatlarının incelenmesi	60
4.6.2 Çoklu ilaç dirençliliği (ÇİD) gösteren izolatların dağılımı	65
4.6.3 Minimal inhibisyon konsantre (MİK) yöntemi ile antimikrobiyal dirençliliklerin belirlenmesi	68
4.6.4 Fenotipik antimikrobiyal sonuçlarının insan sağlığı açısından incelenmesi	70
4.6.5 Gıda-kaynaklı izolatlarda antimikrobiyal dirençliliğin genetik olarak incelenmesi ..	73
4.6.6 Hayvan-kaynaklı izolatlarda antimikrobiyal dirençliliğin genetik olarak incelenmesi	74
4.6.7 Klinik insan vakalarından izole edilen izolatlarda antimikrobiyal dirençliliğin genetik olarak incelenmesi	75
4.6.8 <i>Salmonella</i> izolatlarının fenotipik ve genetik antimikrobiyal profillerin uyumu	77
5. SONUÇLAR	79
6. REFERANSLAR	82

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. 2010 yılında Türkiye ve Şanlıurfa'da görülen Salmonella kaynaklı insan vakaları (Sağlık Bakanlığı verileri; kişisel görüşme)	12
Tablo 2. PZR Master Karışımı ve invA primer sekansı	25
Tablo 3. PZR Master Karışımı	27
Tablo 4. MLST 7 gen primer sekansları	27
Tablo 5. Disk difüzyon yönteminde kullanılan alan çapları (CLSI,2002;2013)	29
Tablo 6. Antimikrobiyal ajanların minimum inhibisyon konsantreleri (CLSI, 2013)	30
Tablo 7. PZR Master Karışımı	31
Tablo 8. Antibiyotik dirençliliği kodlayan genler, primerleri ve primer koşulları	31
Tablo 9. Elektroforez Koşulları	34
Tablo 10. Salmonella-pozitif örneklerin örnekleme dönemi ve gıda tipi yönüyle karşılaştırılması	38
Tablo 11. Örnekleme dönemlerine ait örnek seti büyüklüğü ve örnekleme dönemlerinde tespit edilen Salmonella izolat sayısı	40
Tablo 12. Gıda tiplerine göre 59 gıda izolatında serotip dağılımı	42
Tablo 13. Hayvan türlerine göre 53 adet hayvan kaynaklı Salmonella enterica izolatının serotip dağılımı	43
Tablo 14. İnsan kaynaklı 50 Salmonella izolatında tespit edilen serotiplerinin cinsiyete göre dağılımı.	44
Tablo 15. 59 adet Salmonella izolatına ait 10 serotipin gıda tiplerine göre dağılımı	45
Tablo 16. 53 adet hayvan kaynaklı Salmonella izolatına ait 15 STnin hayvan türlerine göre dağılımı*	46
Tablo 17. İnsan kaynaklı Salmonella izolatlarına ait sekans tipleri	47
Tablo 18. Serotiplerin MLST için Sekans Tipi (ST), PFGE için PFGE izi (PT) dağılımları	56
Tablo19. PFGE Tiplerinin (PT) 59 Gıda Örneği Üzerine Dağılımı*	58
Tablo 20. PFGE Tiplerinin (PT) 53 Hayvan Örneği Üzerine Dağılımı*	58
Tablo 21. PFGE Tiplerinin (PT) 50 Adet Klinik İnsan Cinsiyetlerine Göre Dağılımı	59
Tablo 22. Disk difüzyon sonuçlarına göre gıda kaynaklı Salmonella izolatlarının antimikrobiyal dirençlilik profilleri *	61
Tablo 23. Disk difüzyon sonuçlarına göre hayvan kaynaklı Salmonella izolatlarının antimikrobiyal dirençlilik profilleri *	63
Tablo 24. Disk difüzyon sonuçlarına göre klinik insan vakalarından izole edilen Salmonella izolatlarının antimikrobiyal dirençlilik profilleri *	65
Tablo 25. Salmonella izolatlarının seçilen antimikrobiyal ajanlara ilişkin E-test metodu ile belirlenen MİK değerleri	69
Tablo 26. Gıda kaynaklarından izole edilen <i>Salmonella</i> izolatlarının antimikrobiyal kategorilerine göre dağılımları	71
Tablo 27. Hayvan kaynaklarından izole edilen Salmonella izolatlarının antimikrobiyal kategorilerine göre dağılımları	71
Tablo 28. Klinik insan kaynaklarından izole edilen Salmonella izolatlarının antimikrobiyal kategorilerine göre dağılımları	72
Tablo 29. Gıdalardan izole edilen dirençli Salmonella izolatlarının antimikrobiyal dirençlilik genlerinin dağılımı	73
Tablo 30. Hayvanlardan izole edilen dirençli Salmonella izolatlarının antimikrobiyal dirençlilik genlerinin dağılımı	75
Tablo 31 Klinik insan vakalarından izole edilen dirençli Salmonella izolatlarının antimikrobiyal dirençlilik genlerinin dağılımı	76
Tablo 32. Genetik ve fenotipik antimikrobiyal dirençlilik profillerinin uyumu	77

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Gıda kaynaklı izolatlarla ait 10 sekans tipinin ST 1 (Typhi) ile köklendirilmiş filogenetik ağacı	48
Şekil 2. Hayvan kaynaklı izolatlarla ait 15 sekans tipinin ST 1 (Typhi) ile köklendirilmiş filogenetik ağacı	49
Şekil 3. İnsan kaynaklı izolatlarla ait 6 sekans tipinin filogenetik ağacı	49
Şekil 4. S. Enteritidis'e ait PFGE dendogramı 4 farklı dala ayrılmıştır.	52
Şekil 5. S. Kentucky serotipini ifade eden izolatların PFGE izleri	52
Şekil 6. Typhimurium serotipini ifade eden izolatların PFGE izleri	52
Şekil 7. Serovar Anatum'a ait PFGE dendogramı	53
Şekil 8. Serovar Montevideo'ya ait PFGE dendogramı	54
Şekil 9. Serovar Telaviv'e ait PFGE dendogramı	55

KISALTMALAR

Ak: Amikasin
Amc: Amoksisillin-klavulanik asit
Amp: Amfisillin
C: Kloramfenikol
Cip: Siprofloksasin
Cn: Gentamisin
Cro: Seftriakzon
ÇİD: Çokluilaç dirençliliği (MDR: Multidrug resistance)
Eft: Seftiofur
Etp: Ertapenem
Fox: Cefokzitin
İpm: İmipenem
K: Kanamisin
Kf: Sefalotin
MLST: Çoklu Alan Sekans Tiplendirmesi (Multi locus sequence typing)
N: Nalidiksik asit
PFGE : Vuruşlu Alan Jel Elektroforezi (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)
PT : PFGE Tipi
S: Streptomisin
Sf: Sulfisokzazol
ST : Sekans Tipi
Sxt: Sulfametokzazol-trimethoprim
T: Tetrasiklin

ÖZET

İnsan ve hayvan patojeni olan *Salmonella* da çiftlikten/tarladan çatala kadar olan zincirde varlığını sürdürmektedir. *Salmonella enterica* türleri konakçalarına göre farklı gruplara ayrılmaktadır. Günümüzde antibiyotik dirençli *Salmonella* suşları insan ve hayvan sağlığını tehdit etmektedir. Toplum sağlığını korumak için *Salmonella*'nın, çiftlikten/tarladan çatala kadar olan zincirden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu çalışmanın amacı; genotipik ve fenotipik yöntemleri kullanarak çiftlikten çatala kadar gıdan kısmı olan büyük baş ve küçük baş hayvanlarda, insanlarda ve gıdalarda *Salmonella* çeşitliğinin popülasyon düzeyinde araştırılmasıdır. Bu amaçla Şanlıurfa bölgesinde üretilen ve açıkta satılan gıdalardan, Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesine ve Veteriner Hastanesine gelen insan ve hayvan klinik vakalardan örnek alınıp *Salmonella* izolasyonu yapılmıştır. *invA* geni ile *Salmonella* olarak tanımlanan izolatlar fenotipik (serotipleme) ve genotipik [çoklu bölge sekans tiplleme (Multilocus Sequence Typing, MLST); vuruşlu alan jel elektroforezi (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)] olarak karakterize edilmiştir. Sonuç olarak, 59 gıda, 53 hayvan ve 50 klinik insan izolatu elde edilmiştir. MLST analizi ile gıda izolatlarında 10 Sekans Tipi (ST), hayvan izolatlarında 15 ST ve insan klinik vakalarından elde edilen izolatlarda ise 6 farklı ST bulunmuştur. MLST'den daha fazla ayırıştırıcı gücü bulunan PFGE, gıda izolatlarında 18 PFGE Tipi (PT) bulurken, hayvan ve klinik insan vakalarından sırasıyla 27 ve 10 PT karakterize etmiştir. Antibiyotik dirençlilik testleri fenotipik ve genetik metodlarla araştırılmış, kaynaklar arasında farklılıklar gözlemlenmiştir. Gıda-kaynaklı izolatlarda tavuklardan izole edilen *Salmonella* izolatlarında çokluilaç dirençliliği dikkat çekmektedir. Antimikrobiyal dirençlilik genleri de, farklı kaynaklar ve serovarda değişiklik göstermiş; aminoglikozit, tetrasiklin, ve beta-laktam antimikrobiyal gruplarının fenotipik ve genetik sonuçları da uyumlu bulunmuştur. Tüm izolatların detaylı bilgileri ve de fenotipik ve genotipik özelliklerini halka açık websitelerine yüklenmiştir (Food Microbe Tracker: <http://www.foodmicrobetracker.com/login/login.aspx>; Pathogen Detector: pathogendetector-metu.rhcloud.com). Bu proje hem Şanlıurfa bölgesindeki hem de Türkiye'deki gıda patojenleri üzerine yapılması gereken surveyans çalışma eksikliğini giderilmesinde önemli bir katkıda bulunmuştur. Böylece Şanlıurfa bölgesindeki *Salmonella* geçişi (örneğin *Samonella*'nın nasıl insanlara geçtiği) ve ekolojisi hakkında ön-bilgiye kavuşulmuştur.

ABSTRACT

Being a human and animal pathogen, *Salmonella*, such as other pathogens, can survive in the farm/field to fork chain, with different host species. To protect public health, *Salmonella* should be eliminated from the farm/field to fork chain. The objective of this research is to understand *Salmonella* diversity from farm to fork chain by taking samples from ovine, cattle, humans and foods, at the population level by using genotypic and phenotypic methods. For this aim, samples were collected from street food, produced and sale at Şanlıurfa region, as well as from human and animal clinical cases at Medical and Veterinerary Schools at Harran University and *Salmonella* was isolated from all these samples. Confirmed *Salmonella* isolates with *invA* gene were further characterized using phenotypic (serotyping) and genotypic [Multilocus sequence typing (MLST) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE)] methods. As a result, 59 food, 53 animal and 50 human clinical isolates were obtained. MLST study showed 10 Sequence Types (STs) in food isolates, 15 STs in animal and 6 STs in human clinical isolates. PFGE, representing a better discrimination than MLST, distinguished 18 PFGE Types (PTs) in food isolates, where animal isolates showed 27 patterns and human clinical isolates were represented by 10 PTs. Antimicrobial resistance profiles were also detected by phenotypic and genetic methods (disk diffusion and minimal inhibitory concentration and screening of antimicrobial resistance encoding genes). Antimicrobial resistance testing results differed according to the source and serovar of the isolate. The chicken originated food isolates had taken attention due to high number of MDR profiles. There was a great agreement between phenotypic and genetic results of aminoglycoside, tetracycline and beta-lactam antimicrobial resistance profiles. Isolate information as well as results of phenotypic and genotypic characterizations was downloaded publicly available websites (Food Microbe Tracker: <http://www.foodmicrobetracker.com/login/login.aspx>; Pathogen Detector: pathogendetector-metu.rhcloud.com). This project helped us to fill the gap of surveillance studies on foodborne pathogens in Sanliurfa region, as well as Turkey. Characterization of *Salmonella* isolates collected from animal and human, as well as foods in Sanliurfa region provided better understanding of transmission (i.e. transmission of *Salmonella* to humans) and ecology of *Salmonella* in Sanliurfa region.

1. GİRİŞ

Salmonella hem hayvan hem de insanda hastalığa yol açan bir Gram negatif bakteridir. *Salmonella* genomu iki türü içermektedir; *enterica* ve *bongori*. *Salmonella enterica* altı alt türe bölünmektedir. Bu alt türlerden en önemlisi memelilerde hastalık yapabilen serotipleri içeren *Salmonella enterica* subsp. *enterica*'dır (Brenner ve ark., 2000). *Salmonella*'nın günümüzde 2500'in üzerinde serotipi mevcuttur, bu serotiplerin çoğunu (yaklaşık % 60'ını) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* alt türü içermektedir (Grimont ve Weil, 2007). Bu serotipler konakçıda hastalık yapabilme kabiliyetlerine göre de üçe ayrılmaktadırlar (Uzzau ve ark., 2000):

- (i) *Konakçı sınırlı serotipler*: Belli konakçılarda sepsise neden olan serotiplerdir. Bu tip serotipler sadece belli bir konakçıda kanda enfeksiyona neden olmaktadır, örneğin *Salmonella* Typhi sadece insanlarda yüksek ateşe neden olan kan enfeksiyonuna neden olmaktadır. Başka bir konakçıda bu semptomlara yol açtığı görülmemiştir.
- (ii) *Konakçıya adapte olmuş serotipler*: Belli konakçılarda sistemik hastalıklara neden olurken, az da olsa diğer memelilerde bağırsak enfeksiyonuna neden olan serotiplerdir. Örneğin *Salmonella* Dublin sığılarda sepsise neden olurken, nadir olarak insanlarda gastroenterik hastalıklara yol açmaktadır.
- (iii) *Konakçıyla sınırlandırılmayan serotipler*: Yaygın olarak insan ve bir çok hayvanda gastroenterite yol açan serotiplerdir. Örneğin *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Newport. Bu tür serotiplerin genotipleme ile belirlenen alt tiplerinin belli konakçılarda hastalık yaparken diğer konakçılarda aynı etkiye neden olmamaktadır (Alcaine ve ark., 2006; Rabsch ve ark., 2002; Soyer ve ark., 2010). Alcaine ve ark. (2006) *Salmonella* Newport'un iki klade (aynı ataya sahip kolla) sahip olduğu ve çoklu bölge sekans tipleme (Multilocus Sequence Typing, MLST) tip 8'in sığır vakalarına özgü, aynı zamanda insanlarda da hastalık yapabilen alt tip olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, Soyer ve ark. (2010) *Salmonella* Newport serotipinin alt tipi olan PFGE 121 ve 126 klinik sığır vakalarına özgü olduğunu bildirmişlerdir.

Günümüzde gıda kaynaklı salgınların tespitinde geleneksel belirleme yöntemlerinin yanı sıra genetik tipleme teknikleri de kullanılmaktadır. Geleneksel yöntemlere ilaveten identifikasyon (belirleme) analizlerinde polimeraz zincir reaksiyon (PZR) kullanılması ile daha çabuk ve kesin sonuçlar alınmaktadır. Ancak sadece PZR kullanılan çalışmalarda ortamda bulunan ölü

ve de canlı mikroorganizmaların ayrımı yapılamamaktadır. Önceleri serotipleme teknikleri ile yetersiz tiplendirme yapılabilirken günümüzde bakteri farklılıklarının tespitinde fenotipik ve genotipik alt tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır. *Salmonella*'nın fenotipik olarak tiplendirilmesinde en çok kullanılanlar serotipleme ve faj tiplendirme yöntemleridir. Fenotiplemenin yetersiz olduğu durumlarda daha hızlı, daha doğru sonuçlar veren genotipleme yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar içinde en yaygın olarak kullanılanları DNA amplifikasyonu temelli yöntemler [örneğin MLST ve çoklu alan değişken sayıdaki tandem tekrarları (Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats, MLVA)] ve tüm genomun restriksiyon enzimleri ile parçalanması esasına dayanan vuruşlu alan jel elektroforezidir (PFGE) (van Belkum ve ark., 2007). Gelişmiş ülkelerde sağlık kuruluşlarının laboratuvarlarına gelen klinik insan izolatlarının alt tiplendirilmesi rutin olarak yapılmaktadır. İnsan izolatlarının bilgileri sadece sağlık kuruluşlarının, kullanımı halka açık olmayan, veri bankalarına (örneğin PulseNet) yüklenmektedir. Alt tiplerin birbiri ile aynı veya benzer şekilde gruplaşıp gruplaşmadığı incelenmekte, gruplaşma gösteren izolatların ortak kaynaktan alınıp alınmadığına dair epidemiyolojik çalışmalar yapılmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar sonunda muhtemel bulaşma kaynağı olan gıda tespit edilir ve öngörülen kaynaktan yapılan analizler sonucunda gözlenen gruplaşmaların salgın olup olmadığı belirlenir. Bu nedenle hem insanlardan, hem hayvanlardan hem de gıdalardan izole edilen izolatların alttiplendirilmesi çok önemlidir. Ülkemizde bu eksikliğin giderilmesi için yapılan çalışmalar çoğunlukla insan klinik örneklerinin alttiplendirilmesi üzerinedir (Hosoglu ve ark., 2003; Tansel ve ark., 2003; Ciftci ve ark., 2004; Erdem ve ark., 2004; Erdem ve ark., 2005a; Erdem ve ark., 2005b; Us ve ark., 2009). Bu çalışmaların çiftlikten/tarladan çatala kadar uzanan zincirin tüm halkalarına yayılması gerektiği düşünülmektedir.

Son yıllarda gelişmiş ülkelerde bir çok salgının kaynağı olarak *Salmonella* rapor edilmiştir. Et ve et ürünlerinin yanı sıra sebzelerdeki, kabuklu ve yağlı tohumlardaki kontaminasyonlar da salgına neden olmaktadır. ABD'nde Mart 2009'da başlayan ve aylarca süren salgının kaynağı aynı üretimhanede üretilen *Salmonella* ile kontamine olmuş Antep fıstığı ve ürünleri olarak belirlenmiştir. Yine aynı ülkede 2006'da *Salmonella* ile kontamine olmuş domates, 2007'de *Salmonella* ile kontamine olmuş tavuk eti, 2009'da *Salmonella* ile kontamine olmuş acı biber, marul ve yarfıstığı ülke çapında salgınlara neden olmuşlardır (<http://www.cdc.gov/Salmonella/outbreaks.html>) (CDC 2014). Salgınlar hastalardan ve gıdalardan izole edilen *Salmonella* izolatlarının serotipleme ve PFGE ile karakterizasyonu sonucunda tespit edilmiştir. Maalesef ülkemizde de bir çok gıda kaynaklı salgın olmaktadır. İnsan vakalarının kümelenmesinin nedeni olan gıdalarda herhangi bir araştırma yapılmadığı için bu kümelenmeler maalesef salgın olarak rapor edilememekte ve gerekli tedbirler alınamamaktadır.

Lieftucht and Reacher (1999) yaptığı bir surveyans çalışmada enterik enfeksiyonlar için uluslararası surveyans ağı olan Enter-net' deki (International surveillance network for the enteric infections) insan *Salmonella* Paratyphi B vakalarının artışı incelenmiş ve bu artış ile ülkemizin turistik bölgelerinden biri olan Alanya'ya seyahat etme arasındaki ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Benzer bir çalışmada da 14 Haziran- 5 Temmuz 2008 tarihleri arasında 8914 Avusturyalı lise mezuniyetini kutlayan turistlerin Antalya'daki üç oteli kapsayan otel zincirindeki ziyaretleri sırasında bir *Salmonella* Enteritidis kaynaklı hastalık kümeleşmesi meydana gelmiş ve bu kümeleşmenin salgın olup olmadığı Avusturyalı bilim adamları tarafından incelenmiştir (Kasper ve ark., 2009). Bu çalışmada toplam 103 kişi hasta olduğu ve bu kişilerden 59'dan *Salmonella* Enteritidis izole edildiği bildirilmiştir. *Salmonella* Enteritidis'in dört farklı faj tipi tespit edilmiştir. Bu çalışmada Türk otoritelerinin otellerde herhangi bir işlem (örneğin otellerden gıda örnekleri alınması) yapıp yapmadığının bilinmediğinden bahsedilmiş ve hatta en güncel *Salmonella* enfeksiyonu hakkındaki bilgiye (2000 yılına ait bilgi) Dünya Sağlık Kuruluşundan elde edildiğinin altı çizilmiştir: "The most recent data on the national reported incidence of *Salmonella* infection in Turkey, retrieved from the WHO Surveillance Program for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe, was only 39.2/100,000 population in 2000" (Kasper ve ark., 2009).

Ülkemizde *Salmonella* tipleri *Salmonella* enfeksiyon konusunda maalesef yeterli ve doyurucu çalışmalar yapılmadığı için, Kasper ve arkadaşları (2009) Türkiye'ye özgü *Salmonella* tiplerini ve *Salmonella* enfeksiyonu yapma düzeyini inceledikleri çalışmada, ülkemize yönelik veriler için başka ülkelerin araştırmalarında yararlandıklarını açıklamışlardır (Anonymous Swedish Travel and Tourist Data Base). Maalesef bu tür epidemiyolojik çalışmalar ülkemizde yürütülmemektedir. Bu eksikliğin giderilmesi için çaba sarf edilmesi gerekmektedir. Antalya gibi olmasa da GAP bölgesi, özellikle de Şanlıurfa ili, tarihi ve kültürel zenginlikleri yönüyle günümüzde önemli bir turistik merkezdir. Yöreye yeni gelen turistlere yapılan ilk uyarı açıkta satılan gıdaları tüketmemeleri yönündedir. GAP bölgesi gıda kaynaklı hastalıkların yoğunluğu nedeniyle kötü bir üne sahiptir. Harran Üniversitesi'nin 2007 yılında düzenlediği uluslararası kongreye yurt içi ve dışından çok sayıda bilim adamının katılımı sağlanmıştır. Yurt dışı ve şehir dışı katılımcıların hemen hepsi ishal, kusma ve ateş gibi semptomlarla rahatsızlık belirtileri göstermiştir. Rahatsızlanan katılımcılarla ben de hastaneye kaldırıldım. Tedavimiz yapıldı hastalığa neden olan ajan için herhangi bir analiz yapılmadı. Buna ilaveten hangi gıdanın hastalığımıza neden olduğu tespit etmek için epidemiyolojik araştırma da yapılmadı. Yurt dışı katılımcılardan birinin ise sağlığı o denli bozuldu ki ABD'ye dönemeyerek Macaristan'a, anavatanına gitmek zorunda kaldı. Macaristan'da yapılan test sonuçlarına göre

hastalık etkeninin *Salmonella* olarak tespit edildiği şahsıma daha sonraki ikili görüşmemizde bildirilmiştir. Ülkemizde rutin analiz yapılmadığı ve epidemiyolojik olarak veriler analizlenmemektedir. Bu durumda bu vakayı referans olarak sunamamaktayım. Bu gibi durumlarla karşılaşılması için ivedikle gıda güvenliği konusunda araştırmaların çoğalması, üretici-tüketicinin bilgilendirilmesi ve böylece çiftlikten/tarladan çatala giden patojen zincirinin kırılması gerektiği görüşündeyiz.

Sağlık Bakanlığı çalışanları ile yapılan kişisel görüşmeler sonucunda 2010 yılında Türkiye ve Şanlıurfa ilinde meydana gelen insan *Salmonella* vaka bilgileri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. 2010 yılında Türkiye ve Şanlıurfa’da görülen *Salmonella* kaynaklı insan vakaları (Sağlık Bakanlığı verileri; kişisel görüşme)

<i>Salmonella</i> Türleri	Şanlıurfa	Türkiye
<i>Salmonella</i> Typhi	191	1,090
<i>Salmonella</i> Paratyphi A	7	78
<i>Salmonella</i> Paratyphi B	4	57
<i>Salmonella</i> Paratyphi C	0	10
<i>Salmonella</i> O4 (B)	0	40
<i>Salmonella</i> O7 (C1)	4	16
<i>Salmonella</i> O8 (C2-C3)	0	32
<i>Salmonella</i> O9 (D1)	0	163
<i>Salmonella</i> O9,46 (D2)	0	3
<i>Salmonella</i> O3,10 (E1)	0	1
<i>Salmonella</i> O1,3,19 (E4)	0	0
<i>Salmonella</i> O13 (G)	0	1
<i>Salmonella</i> O18 (K)	0	17
<i>Salmonella</i> (diğer)	4	487
<i>Salmonella</i> sp. (tiplendirilmemiş izolat)	145	440
Toplam	355	2435

Bakterilerin antibiyotiklere olan dirençlilikleri tüm dünyada problem yaratmaktadır. Özellikle de bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde büyük sorunlar yaratmaktadır. Antibiyotiklere dirençli gıda kaynaklı patojenlerin gelişimi insanların ilaç tedavilerini de riske sokmaktadır

(Mead ve ark., 1999). Avrupa Birliğinde European Food Safety Authority (EFSA)'nın Haziran 2010'da yayınladığı rapora göre *Salmonella*'da antibiyotiğe karşı dirençliliğin üye ülkelerde toplanan hayvan ve gıda kaynaklı örneklerden izole edilen *Salmonella*'da yaygın olduğu bildirilmiştir. Test edilen bir çok antimikrobiyeye dirençlilik profillerinin ülkeden ülkeye değiştiği tespit edilmiştir. Üye ülkelerde en çok *Salmonella* izolatlarının tetrasiklin, ampicillin ve sulfonamide dirençlilik gösterdikleri bildirilmektedir (toplam *Salmonella* izolatlarının % 13-47'sinin). Bu dirençlilikler kaynaktan kaynağa da değişim göstermektedir. Örneğin domuz ve sığırdan izole edilen izolatlarda, kanatlılardan izole edilenlere izolatlara göre dirençlilik seviyesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna ilaveten, bu raporda *Salmonella*, *Campylobacter* ve *E. coli*'deki ciprofloksacin seviyesindeki artışın altı çizilmiştir, çünkü fluoroküinolonlar insan vakalarında kullanılan önemli antimikrobiyallerdir (EFSA, 2010).

Gıda kaynaklı salgınlar ortak bir gıdanın sindirilmesi sonucunda iki veya daha fazla benzer hastalığın oluşması olarak adlandırılmaktadır. Gıda kaynaklı salgınlar ülkelerin sağlık kuruluşlarınca takip edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ve EFSA tarafından takip edilmektedir. Enter-net'e ve PulseNet Europe'a üye olan ülkemizin bu tip durumlarda daha aktif rol oynaması gerektiği düşünülmektedir. Bu salgıların önüne geçilmesinde ve de bu salgın oluşması durumunda ise salgın kaynağının nasıl tespit edilmesinde surveyans çalışmalarının önemi ortaya çıkmaktadır.

PulseNet* International'ın raporunda (INFOSAN Information Note No. 4/2009 – PulseNet International) da belirtildiği gibi, uluslar arası düzeyde (i) patojenler üzerine moleküler surveyans (izleme) çalışmalarına, (ii) uluslararası standardize edilmiş alttıplendirme metodlarının geliştirilmesi ve oturtulması için işbirliğine ve (iii) gıda kaynaklı patojenlerin alt tiplerinin coğrafi dağılımı ve yayılımının tespit edilmesine yönelik işbirliği çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Türkiye PulseNet International'a üye ülkelerden biridir. Ülkemizde, özellikle de GAP bölgesinde (Şanlıurfa ve civarı), surveyans çalışmalar bakımından büyük eksiklikler mevcuttur. Bu proje ile Şanlıurfa bölgesindeki açıkta satılan, çiğ olarak tüketilen gıdalar (kurutulmuş biber [isot], antep fıstığı, açıkta satılan peynir) ile klinik insan ve hayvan vakalarından kan ve dışkı örnekleri toplanmış ve bu örneklerden *Salmonella* izolasyonu yapılmıştır. Bir sene süren izolasyon ve tanımlamada geleneksel metodların yanı sıra moleküler metodlar da kullanılmıştır. *Salmonella* izolatları -80°C'de saklanmıştır. Bu izolatlar fenotipik (serotiplendirme) ve genotipik (MLST, PFGE ve antibiyotiğe dirençli genlerin varlığının belirlenmesi) olarak tiplendirilmiştir. İzolatlar hakkındaki tüm bilgiler ve analiz sonuçları halka açık bir izolat veri bankası olan ve Cornell Üniversitesi bünyesinde bulunan Food Microbe Tracker adlı (eski adı; Pathogen Tracker) veri bankasına

(<http://www.foodmicrobetracker.com/login/login.aspx>) aktarılmıştır. Bunun haricinde izole edilen patojenler için Türkiye'ye özgü ulusal bir data bankası daha oluşturulmuş, ve projemizden elde edilen bütün bilgiler tüm araştırmacılarla karşılıksız paylaşılmıştır (pathogendetector-metu.rhcloud.com). Bunlara ilaveten Harran Üniversitesi Ziraat Mühendisliği Gıda Mühendisliği Bölümü'nde aktif olarak çalışan bir moleküler alt tipleme laboratuvarında Fen, Veteriner, Tıp ve Ziraat Fakültelerindeki lisans üstü öğrencilerine eğitim verilmiştir. Bu amaç için çoklu disiplinlerin bir araya gelmesi ve beraber çalışması önerilmiştir. Harran Üniversitesi Ziraat Mühendisliği ve ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü'nde merkezinde aktif olarak çalışan bir moleküler alt tipleme laboratuvarında hem Fen, Veterinerlik, Tıp ve Ziraat Fakültelerindeki öğretim üyeleri ve hem de lisans üstü öğrencileri beraber çalışmıştır. Bununla birlikte Cornell Üniversitesi Gıda Bilimi bölümü ile yapılan işbirliği sayesinde hem Dr. Wiedmann'dan danışmanlık alınması hem de BioNumerics adlı çok pahalı bir yazılım ile analizlenmesi gereken PFGE jel fotoğraflarının analizleri yapılmıştır.

Genel olarak başardığımız hedefler aşağıdaki gibidir:

(i) Şanlıurfa bölgesinde aktif olarak çalışan, çoklu disiplinlerin bir arada çalıştığı bir alt tipleme laboratuvarında moleküler teknikler kullanılarak gıda kaynaklı patojenler, özellikle de *Salmonella* izole edilmiştir. Daha sonra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ve *Brucella* gibi diğer gıda kaynaklı patojenlerin izolasyonunun ve karakterizasyonunun yapılması da planlanmaktadır. Önerilen proje ile ulusal ve uluslararası özellikleri bünyesinde barındıran, çok ortaklı bir alt tipleme laboratuvarı hem ulusal hem de uluslararası işbirliği yapabilme kapasitesine sahip olmuştur. Bu amaç çerçevesinde üç üniversite Orta Doğu Teknik, Yüzüncü Yıl ve Harran Üniversitesi'nin beş ayrı fakültesinin (Mühendislik, Ziraat, Fen, Veterinerlik ve Tıp Fakültelerinin) imkanlarının kullanılmasının planlandığı, çoklu disiplinleri bir araya getiren bu projeye ABD Cornell Üniversitesi de destek olmuştur. Böylece insan, hayvan ve gıda *Salmonella* izolatlarının alt tiplemesi ile başlayacağımız araştırmamızda ile çiftlikten/tarlardan çatala giden zincirin tüm halkaları incelemiştir. Buna ilaveten, bu meziyetleri içinde barındıran laboratuvar; Şanlıurfa bölgesinde, yurtda ve hatta uluslararası çapta referans laboratuvarı da olabilir. Patojenlerin coğrafi olarak gruplaştığı, literatürde bildirilmektedir (Davis ve ark., 2007; Soyer ve ark., 2010). Buna ilaveten antibiyotik dirençliliğinin bölgeden bölgeye ve konakçıdan konakçıya değiştiği de gösterilmiştir (Hoelzer ve ark., 2010). Coğrafi gruplaşmalarda patojenlerin farklı gruplarının tespit edilmesi, taze ve işlenmiş meyve ve sebze ihraç eden ülkemiz için özellikle önemlidir. Hem ülkemizde hem de gıda ihraç ettiğimiz ülkelerde gıda kaynaklı hastalıkların izlenmesinde ve kaynağının bulunmasında güvenilir veri tabanlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı şekilde seyahat sırasında meydana gelen gıda kaynaklı hastalıkların da takibinde bu tip veri tabanlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu veri

tabanları üniversitelerde araştırmalar için kullanılacağı gibi gıda endüstrisi ve de sağlık kuruluşları tarafından da kullanılabilir. Bahsedilen çiftlikten/tarladan çatala olarak adlandırılan zincirdeki patojenlerin genotipik özelliklerini içeren halka açık veri tabanları ülkemizde bulunmamakla beraber dünyada da az sayıda bulunmaktadır. İleri çalışmalarında öngörülen Şanlıurfa bölgesindeki taze sebze ve meyve üretimi ve hayvancılık göz önüne alındığında bu bölgede tespit edilen patojenlerin ve onların alt genotipik gruplarının bilinmesi ile bulaşmanın kaynağı tespit edilmesiyle ve üreticinin konu hakkında bilgilendirilmesi sağlanarak daha sağlıklı ürünler üretilecektir. Taze meyve ve sebze kaynağı olmasının yanında günümüzde turizm merkezlerinden biri olan GAP bölgesindeki bu eksikliğin giderilmesi özellikle önemlidir. Çiftlikten/tarladan çatala gıda güvenliğinin sağlanması için gerekli elzem laboratuvarın kurulması için ilk adımı bu proje ile atılmıştır. Proje ile çiftlikten/tarladan çatala gıda güvenliğinin sağlanmasının yanı sıra hem iç tüketimdeki hem de ihraç edilen gıdaların güvenliğinin sağlanmasını mümkün kılacak adımlar atılmıştır. Ayrıca bir turizm ülkesi olan Türkiye’de gıda hizmet sektöründe kalite güvencesi sağlanması, böylece gıda kaynaklı salgınların önüne geçilmiş olunması için gelişmeler kaydedilmiştir. Böylece gıda kontaminasyonu sonucu oluşacak ekonomik kayıpların baştan önlenmesine yardımcı olunmuştur (INFOSAN Information Note No. 4/2009).

(ii) Şanlıurfa bölgesinde gıda kaynaklı patojen *Salmonella*’nın fenotipik ve genotipik dağılımları belirlenmiştir. Günümüzde patojenlerin antibiyotiğe dirençli suşlarının artması insan sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır. İnsanlarda ve hayvanlarda gereksiz ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı patojen mikroorganizmaların antibiyotiğe dirençlilik kazanmalarını tetiklemektedir. Şanlıurfa bölgemizde özellikle klinik hayvan vakalarında test yapılmadan antibiyotik kullanılmaktadır. Bu da çiftlik zincirinden başlayıp insana kadar giden patojen zincirini etkilemektedir. Çalışmamızda hem hayvanlarda hem de insanlarda analiz yapılacağı için izolat kaynağının izolatların antibiyotiğe karşı dirençliliğe etkisi olup olmadığı da incelenmiştir. Serotip dağılımları ve antibiyotik dirençlilik profilleri hasta tedavisinde direkt olarak kullanılabilir. Örneğin antibiyotiğe dirençli suşların örneklerimizde bulunması ve bunların hangi antibiyotiğe dirençli olduklarının belirlenmesi toplum sağlığı açısından çok önemlidir. Tıp Fakültesi üyeleri ile beraber çalışılacağı için hastanede çalışan doktorlara bilgi akışı sürekli yapılmıştır. Bu durum Şanlıurfa’da çalışan veteriner hekimlerimiz içinde aynı olmuştur. Genotipik karakterizasyon sonucu elde edilen bilgiler ile hangi *Salmonella* suşlarının hangi konakçı ile ilişkili olduklarını ortaya çıkarılmıştır.

(iii) Dünyada kabul gören moleküler tipleme yöntemleri kullanılarak Şanlıurfa bölgesine özgü suşlar belirlenmiştir. Bu bilgilerden bir veri bankası oluşturulmuştur. Bu veri bankası PulseNet’e de data sağlayabilecek kalitede sonuçları içeren bir veri bankası olmuştur. Buna

ilavatten hangi moleküler tekniklerle belirlenen suşların Şanlıurfa bölgesinde yaygın olduğu belirlenmiştir. Örneğin, Almanya'da meydana gelebilecek bir salmonelloziz vaka gruplaşmasının epidemiyolojik incelenmesi aşamasında şüpheli salgın kaynaklarından birinin Şanlıurfa'dan ihraç edilen isotlar olması durumunda projemizden elde edilecek sonuçlar kullanılabilir. PFGE, alt tiplendirme tekniklerinden biri olup, günümüzde Avrupa ve Amerika Birleşik Devletlerindeki sağlık kuruluşlarında klinik izolatlarının alt tiplendirmelerinde rutin olarak kullanılmaktadır. Sağlık kuruluşlarının veri bankaları halka açık değildir. Ancak oluşturulacak bilgiler Cornell Üniversitesi'nde bulunan ve halka açık olan Food Microbe Tracker'a, eski adı ile Pathogen Tracker adlı veri bankasına (<http://www.foodmicrobetracker.com/login/login.aspx>) yüklenmiş ve tüm dünyadaki araştırmacıların hizmetine, her hangi bir karşılık beklenmeden, sunulmuştur. Food Microbe Tracker çoğunluğu Amerika'da izole edilen patojenleri içermekle birlikte, Avrupa'dan (örneğin, Portekiz, İspanya) da izole edilen patojenleri de içermektedir. Mayıs 2010 itibari ile 5476 adedi *Salmonella* olmak üzere 31333 izolatın fenotipik ve genotipik bilgilerini içermektedir. Bu durumda Cornell Üniversitesi Gıda Bilimi Öğretim Üyesi Dr. Martin Wiedmann ile işbirliği yapılmıştır.

Bu proje ile Şanlıurfa yöresindeki *Salmonella* izolat mozaiği genetik tiplendirme yöntemleri ile ortaya çıkarılmıştır. Bilgimiz dahilinde bu yörede daha önce böyle bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Şanlıurfa yöresinde hem Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde hem de Veterinerlik Fakültesine gelen vakalardan geleneksel yöntemlerle izole edilen *Salmonella* izolatlarının alt tiplendirme yapılmamaktadır. Klinik vaka kümeleşmelerinin kaynağının belirlenmesi için hiç bir çaba gösterilmemektedir. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı ile yapılan ikili görüşmeler sonucunda bu durumun Güneydoğuya özgü olmadığı, Türkiye çapında da aynı olduğunu öğrenilmiştir. Önemli bir ihracat ve turizm ülkesi olan Türkiye'de de gelişmiş ülkelerde uygulanan gıda kaynaklı salgınların takip edilmesi ve salgınların önüne geçilmesi için gerekli tedbirlerin alınması gerekmektedir. Elde edilen bilgiler çiftlikten çatala giden zincirin tüm halkalarını içermektedir. Sonuç olarak Şanlıurfa bölgesinde işleyen çoklu disiplinlerin beraber çalıştığı bir moleküler alt tiplendirme laboratuvarı ile toplum sağlığını tehdit eden unsurları, özellikle bakterilerin, çiftlikten ve/veya tarladan çatala ve de insanlara geçiş dinamiğini inceleneyip, patojenlerin ekolojisi, biyolojisi ve geçiş dinamikleri hakkında daha detaylı bilgiye sahip olduk. Geniş kapsamda amacımız insan sağlığını tehdit eden *Salmonella'* ya engel olunması için hangi noktalardan zincire katıldığını tespit ederek, salgınların önüne geçilmesi hedefidir ve bu hedef Şanlıurfa bölgesi için sağlanmıştır. Bu bağlamda patojen zincirinin kırılması için gerekli tedbirler alınabilmesi için data sağlanmıştır.

Bulduğumuz bölgede yapılmış her hangi bir surveyans çalışma olmaması da çalışmalarımızın katma değerinin ne kadar yüksek olacağını ortaya koymaktadır. Literatürden bildiğimiz gibi farklı ülkelerde ve de aynı ülkede farklı bölgelerde baskın genotipler mevcuttur. Bu tiplerin belirlenmesi özellikle salgın incelemelerinde önem kazanmaktadır. Davis ve arkadaşlarının (2007) Amerika Birleşik Devletlerinde yaptığı çalışmada Kuzeybatı Pasifik Bölgesine özgü epidemik *Salmonella* Typhimurium türün ülkenin başka bölgelerinde rastlanmadığını bildirmişlerdir. Bu bulgu, şüpheli gıda kaynaklı salgın incelenmesine ışık tutacak; eğer belirlenen alt tip ülkenin başka bir yerinde görülecek bir salgında, kaynağın büyük ihtimalle Kuzeybatı Pasifik Bölgesine ait bir üründen kaynaklandığı sonucuna varılacaktır. Bu bilginin daha önce belirlenmesi salgın durumunda zaman kaybetmeden nokta atışı yapılabilmesini sağlamaktadır. Avrupa Birliği başta olmak üzere taze meyve ve sebze ile işlenmiş gıda ihracatı yapan ülkemiz uluslararası arenada kaliteli ve sağlıklı ürün sağlayan ve salgın durumlarında kendini savunabilen bir konuma gelmesi için alt yapı laboratuvarlarına destek verilmesi ve gıda kaynaklı patojenlerin alt tip bilgilerini içeren veri bankalarının oluşturulması gerektiğine inanılmaktadır. Gıda ile bulaşan hastalık etmenlerinin çiftlikten tabağa giden yolunun kesilmesi için farklı birimlerin beraber çalışmasının elzem olduğu düşünülmektedir.

*: PulseNet, Amerika Birleşik Devletlerinde toplum sağlığı ve gıda mevzuat düzenleyici kuruluşlarının (CDC; US Department of Agriculture, USDA/ The Food Safety and Inspection Service, FSIS; Food and Drug Administration, FDA) oluşturduğu ulusal bir ağıdır (network) ve CDC tarafından koordine edilmektedir. PulseNet International ise dünyadaki gıda kaynaklı salgınları izlemek için kurulmuş bir ağıdır. Ülkemiz PulseNet International üyesi olan PulseNet Europe'a dahildir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Gıda kaynaklı enfeksiyonlar, kamu sağlığına büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Bu tehdit sadece gelişmekte ülkelerle sınırlı olmayıp, gelişmiş ülkelerde de mevcuttur. Örneğin Mead ve arkadaşlarının 1999 yılında ABD'yi temel alarak yaptıkları bir çalışmada, yılda 76 milyon enfeksiyon vakası görüldüğü saptanmıştır. Bakterilerin, toplam ölüm vakalarının yaklaşık % 90'ına (% 88) neden olduğu gözlemlenmiş ve bu bakterilerden: *Salmonella* (% 31), *Listeria* (% 28), *Toxoplasma* (% 21), *Campylobacter* (% 5) ve *E. coli* O157:H7 (% 3)'den ilk altı patojenin, toplam ölüm oranının % 90'ını oluşturduğunu tespit edilmiştir. Yine ABD'de geçtiğimiz yıl 2013'te FoodNet (Foodborne Diseases Active Surveillance Network) tarafından gerçekleştirilen surveyans çalışmasına göre, nüfusun % 15'i, 48 milyon insanda, 19,056 gıda kaynaklı hastalık tespit edilmiş, buna bağlı olarak 4,200 insan hastaneye kaldırılmış, ve 80 ölüm gerçekleşmiştir. Hastalıklara en sık sebep olan *Salmonella*, hastalıkların % 38'inden sorumlu patojendir. Dünya geneli içinse, *Salmonella*'nın her yıl yaklaşık 93.8 million hastalığa sebep olduğu ve gerçekleşen salmonelloz vakalarının 155,000 ölümle sonuçlandığı belirtilmiştir (Majowicz ve ark., 2010). Ülkemiz için gıda kaynaklı zehirlenmelerin oranı ve buna yol açan mikroorganizmaların dağılımını veren bir çalışma bilgimiz dahilinde mevcut değildir. Ancak yetkili kuruluşlarla yapılan ikili görüşmelerde en yaygın gıda kaynaklı bakteriyel patojenin *Salmonella* olduğu bilinmektedir.

1995 ve 2008 yılları arasında dünya genelinde 83 ülkeden toplanan yıllık surveyans çalışmaları sonucu, insan kaynaklı en sık raporlanan türlerin 307 serovar arasında *Salmonella* Enteritidis ve Typhimurium olduğu görülmüştür; bu iki serovar toplanan tüm izolatların % 78.8'ini oluşturarak dünya genelinde 1.5 milyon insanda görülmüştür (Vieira, 2009). EFSA (2014)'nin 2012 verilerine göre 91,034 insan salmonelloz vakası 27 Avrupa Birliği üye ülkesinde rapor edilmiştir. Bu vakaların çoğunluğunun hayvanlardan (sığır, domuz, kanatlı hayvan ve ürünlerinden) insanlara geçtiği bildirilmektedir. Vieira'nın sonuçlarına uygun olarak, yine en sık rapor edilen serovarlar subsp. *enterica*'ya dahil olan Enteritidis ve Typhimurium olmuştur (EFSA, 2014). Ağustos 2010'da CDC'nin yayınladığı rapora göre 2007 yılında ABD'de rapor edilen 1097 adet gıda kaynaklı salgın oluşmuştur. Bu salgınlar sonucunda 21,244 vaka 18'i ölümle sonuçlanmıştır. Salgınlardan 497 adedinde laboratuvarıda tek bir etiyolojik kaynak belirlenmiştir. Bu salgınların % 52'si bakteri kaynaklı olup %27'sini *Salmonella*'nın neden olduğu vakalar (3,465) oluşturmaktadır. Bu durumda etiyolojik kaynağı belli olan salgınların en çok norovirus oluşturmakta, bunu da *Salmonella* takip etmektedir. Ölüm oranlarına bakıldığında ise, en yüksek ölüm oranı *Salmonella*'nın etiyolojik olarak neden olduğu vakalarda (% 28) görülmektedir (CDC, 2010). Avrupa Birliği ve üye aday ülkelerindeki insan salmonelloz vakalarının % 26'sına neden olan izolatların bir

veya daha fazla ilaca dirençli oldukları ve en yüksek direnç seviyeleri ampicillin, tetracycline ve sulfonamidde tespit edilmiştir (EFSA, 2013). Bu ülkeler arasında Türkiye bulunmamaktadır.

İnsanlarda en sık görülen tifo-dışı salmonelloziz semptomları genellikle ishal, kusma, ateşlenme gibi görece hafif sonuçlar doğusa da, bazı serotiplerin kronik romatizma ve genellikle ölümlü sonuçlanabilen septisemi gibi hayati sonuçları, özellikle yaşlı ve bağışıklık sistemi baskılanmış insanlarda görülmüştür (Chen ve ark., 2012).

Gıda marketlerindeki küreselleşme ve gıdaların üretim ve dağıtımları aşamasında yeni yöntemlerle kontamine olmuş bir gıda ürününün şehir dışı, ülke dışı tüketicilere ulaşabilme imkânı, çoklu şehir ve hatta çoklu ülkelerde gıda kaynaklı hastalıkların artmasına neden olmuştur (Barrett ve ark., 1994). İnsanların uluslararası yolculuk imkanlarının artması ve göçlerin de bu artışa etkisi olduğu bilinmektedir (Aarestrup ve ark., 2007). Moleküler alt tipleme teknikleri ve veri analizi için geliştirilen bilgisayar yazılımlarındaki gelişmeler, laboratuarlara hastalıkları tanıma ve bakteriyel enfeksiyon nedeni salgınları inceleyebilme imkanı sağlamaktadır (van Belkum, 1998). Gıda ticaretin ülkeler arasında artması ve de ile de antimikrobiyal dirençli izolatların yayılımı artmıştır. Bugüne kadar bakteri alt tipleme için bir çok DNA tanı yöntemleri geliştirilmiştir (Olive ve Bean, 1999). PFGE, gıda kaynaklı patojenleri ve diğer bakterileri alt tiplemede daha duyarlı ve daha ayırıcı olması nedeniyle günümüzde "altın standart" olarak kullanılmaktadır. PFGE tekniğinin tekrarlanabilirliğindeki sorunlar nedeniyle CDC tarafından 1996 yılında PFGE'nin standardizasyonu ve gerçek zamanlı bilgi paylaşımı sağlayan iletişim ağının kurulması gerçekleştirilmiştir (Swaminathan ve ark., 2001). PFGE tekniğinin önümüzdeki uzun yıllar boyunca gıda kaynaklı bakteriyel patojenlerin alt tipleme için altın standart olarak kullanılması öngörülmektedir (Gerner-Smidt ve ark., 2006). Ancak nukleotid dizilimleri kullanılmadığı için fenotipik analizleri yapılamamaktadır. Evrimsel ilişkinin tespiti için fenotipik analizlere elverişli PZR temelli nukleotid dizilimlerinin kullanıldığı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygınlarından biri MLST'dir. Mutasyona karşı en çok korunan genlerin yedi tanesinin sekanslanmasıyla elde edilen bilgi ile MLST analizi, dünya genelinde *Salmonella* çeşitliliğine ışık tutarken; bakteri çeşitliliğinin gen değişiminden ziyade mutasyonlarla gerçekleştiği göz önünde bulundurulduğunda, bu çeşitliliğin başlangıç rotasını da belirlemiş olur (Wiedmann, 2002).

Bakterilerin antibiyotiklere olan dirençlilikleri tüm dünyada problem yaratmaktadır. Özellikle de bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde büyük sorunlar yaratmaktadır. Antibiyotiklere dirençli gıda kaynaklı patojenlerin gelişimi insanların ilaç tedavilerini de riske sokmaktadır (Mead ve ark. 1999). EFSA'nın 2013'te yayınladığı rapora göre *Salmonella*'da antibiyotiğe karşı dirençliliğin üye ülkelerde toplanan insan, hayvan ve gıda kaynaklı *Salmonella*'da

yaygın olduğu bildirilmiştir. Test edilen bir çok antimikrobiyeye dirençlilik profillerinin ülkeden ülkeye fazlacadeğiştiği tespit edilmiştir. ye ülkelerden örneklenen et ve hayvanlarda *Salmonella* izolatlarının en çok tetrasiklin, ampicillin ve sulfonamide dirençlilik gösterdikleri bildirilmektedir (toplam *Salmonella* izolatlarının %7-61'inin). Bu direnlilikler domuz ve hindiler için daha yüksek; fakat tavuk eti, yumurta tavukları ve sığırılar için daha az görülmektedir. Çoklu antimikrobiyal dirençlilik özelliği ise en çok tavuk eti, hindi ve domuzlardan izole edilen *Salmonella*'da görülmüş, Tavuk etlerinden izole edilen *Salmonella* Infantis'lerin dirençlilik oranlarının siprofloksasin için % 96.5 ve nalidiksik asit içinse % 96.0 olduğu bildirilmiştir (EFSA, 2014).

Ülkemizde de maalesef birçok gıda kaynaklı salgın olmaktadır. İnsan vakalarının kümelenmesinin nedeni olan gıdalarda herhangi bir araştırma yapılmadığı için bu kümelenmeler salgın olarak rapor edilememekte ve gerekli tedbirler alınamamaktadır. Bu salgınların kaynaklarının fenotipik (rneğin serotip ve antimikrobiyal dirençlilik profilleri) ve genotipik (rneğin PFGE tipleri) zellikleri de bilinmektedir. Ancak lkemizde gıda, hayvan ve insanlarda ayrı ayrı yapılan çalışmalar mevcuttur. Gıdalarda yapılan çalışmalar tavuk etlerinin *Salmonella* ile bulaşık olma oranının çok yüksek olduğunu göstermektedir. Çetinkaya ve ark. (2008) yaptığı bir çalışmada tavuk parçaları, parçalanmış et, hazır salatalar çiğ sebzeler ve çiğ süt gıdaları ile toplam 416 örnek toplanarak yapılmış bir *Samonella* prevalans çalışmasında, kontaminasyon sadece tavuk etinde gözlenmiş, yaygınlık oranı 0.24 % olarak tayin edilmiştir. Çalışmamız bir çok kaynaktan izole edilen *Salmonella*'ların belirlenmesi ve bu bakterinin fenotipik (serotiplendirme, antimikrobiyal dirençlilik tayini) ve genotipik (MLST, PFGE analizleri) incelenmesine olanak sağlamış, Türkiye'deki *Salmonella* eşitliliği ve *Salmonella*'nın evrimsel ilişkilerine işık tutacak çalışmaların başında gelmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 GEREÇ

3.1.1 Cihazlar, Kimyasal Maddeler ile Cam Plastik Sarf Malzemeler

İlk dört ay içinde (12/2011 – 03/2012) projenin yürütülmesi için gerekli olan laboratuvar cihazları ve sarf malzemeleri temin edilmiştir. Bu kapsamda çalkalamalı su banyosu (Memmert WN8-14), çalkalıyıcı (Interscience 400P), derin dondurucu (Thermo Scientific Elit Plus), elektroforez ünitesi 12x14 cm (OBI Elektroforez), hassas terazi (Mettles Toledo MS 400D), mikrodalga fırın (Arçelik MD554 Intellwave), pH-metre (Thermo Scientific Eutech PH 700) ve vortex (Velp ZX3) alınmıştır. Son olarak da antibiyotik dirençlilik testi için disk dispenser (Oxoid -164972-136) temin edilmiştir.

3.1.2 İnsan, Hayvan ve Klinik İnsan Örnekleri ile *Salmonella* İzolatları

Projemizde belirtilen dört dönemde Şanlıurfa yöresinde üretilen, bu yöreye özgü ve en çok tüketilen açıkta satılan gıdalardan örnek toplanmıştır (Ek 1-4).

Örnekleme döneminde toplanan gıda örnekleri özel bir formatta (örn: 1-F-A) etiketlenmiştir. Her etiketteki birinci sayı gıda örneğini, ortadaki harf (F-S) numunelerin satın alındığı bölgeyi, en sondaki harf ise (A-B-C) gıda numunesinin ait fiyat seviyesini temsil etmektedir.

Gıda numunelerinin toplanma işlemi Harran Üniversitesi, Gıda Mühendisliği tarafından Nisan 2012 ve Mart 2013 tarihleri arasında, ilkbahar, yaz, sonbahar ve kış mevsimlerine karşılık gelen örnekleme dönemlerinde gerçekleştirilmiştir. Şanlıurfa'daki dükkanlar, pazar yerleri ve seyyar satıcılar ziyaret edilerek, her örnekleme döneminde 48 adet gıda örneği toplanmış ve 4 dönem sonunda toplamda 192 örnek elde edilmiştir. 8 farklı gıda tipinden örnekler toplanmakla birlikte, bu gıda tipleri aşağıdaki gibidir:

1. Sığır kıyma eti (no: 24)
2. Koyun kıyma eti (no: 24)
3. Tavuk eti (no: 24)
4. Sığır kökenli sakatat (no: 24)
5. Taze peynir (no: 24)
6. Urfa peyniri (no: 24)
7. İ sot (no: 24)
8. Antep fıstığı (no: 24)

Her örnekleme döneminde, Şanlıurfa'daki iki farklı bölge ziyaret edilerek, her bölgede, bir gıda tipine ait 3 adet numune satın alınmıştır (Ek 1-4). Böylelikle, bir gıda tipine ait, her örnekleme döneminde 6 farklı numune elde edilmiştir. Örneklerin satın alınma işlemi bir gün içerisinde bitirildikten sonra, soğuk zincir şartları altında *Salmonella* tespiti ve izolasyonu işlemlerinin gerçekleştirilmesi için örnekler Ankara ODTÜ Gıda Mühendisliği'ne ulaştırılmıştır. Urfa peyniri, tavuk eti, sakatat, taze peynir, küçükbaş kıyma ve büyükbaş kıyma örnekleri hiç bekletilmeden analize alınmıştır. Kuru biber (isot) ve Antep fıstığı örnekleri ise analize kadar 4°C' de muhafaza edilmiştir.

Hayvan dışkı örneklerinin toplanması Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi tarafından gerçekleştirilmiştir. Örnekleme dönemleri ilkbahar, yaz, sonbahar, kış mevsimlerini temsil edecek şekilde düzenlenmiştir. Örnekleme dönemlerinde klinik hayvan izolatlarından dışkı toplanması planlanmıştır. Ancak klinik salmonellozis vakası görülmemesi nedeniyle hayvan pazarlarından, kesimhanelerden ve çiftliklerden örnek toplanmıştır. Örnek toplama bilgileri EK 5-8'de detaylı bir şekilde verilmiştir, 4 örnekleme dönemi sonucunda en az 50 adet hayvan *Salmonella* izolatı hedefine ulaşmak amacıyla kış mevsim içerisinde ek bir örnekleme gerçekleştirilmiştir. İlkbahar, yaz, sonbahar ve kış (ek örnekleme dönemi de dahil) dönemlerinde sırasıyla 82, 91, 117 ve 65 adet örnek toplanmıştır. Toplamda, 9 Nisan 2012 ve 15 Ocak 2013 tarihleri arasında 355 adet dışkı örneği elde edilmiştir. Bu örnek koleksiyonu, 231 adet koyun dışkısı, 105 adet sığır dışkısı, 11 adet tavuk dışkısı ve 8 adet keçi dışkisinden oluşmaktadır (Ek 5-8). Örnekler büyük çoğunlukla kesimhanelerden toplanmıştır. Pazarlardan da örnekleme yapılmıştır. Hayvan dışkı örneklerinde *Salmonella* tespit ve izolasyon işlemleri Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi'nde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen şüpheli *Salmonella* kolonileri agarlar üzerinde Ankara ODTÜ Gıda Mühendisliği'ne gönderilmiştir.

Örnekleme dönemi boyunca Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama Hastanesine salmonellozisten şüphelenilen insan vakalarından dışkı örnekleri toplanmıştır (Ek 9). Yalnızca 6 izolat bahar döneminde ve 13 izolat ise yaz dönemi içerisinde toplanmıştır. Projede hedeflenen insan kaynaklı izolat sayısı en az 50 olduğundan, yine aynı hastaneye ait geçmişte izole edilmiş ve Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama Hastanesi bünyesinde saklanan 31 izolat da proje dahil edilmiştir. Bu izolatların toplanma tarihleri Ağustos 2010 ve Eylül 2010 tarihleri arası değişmektedir (Ek 9). Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde toplanan şüpheli *Salmonella* spp. izolatlarının doğrulanması ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yapılmıştır.

Toplamda elde edilen 192 gıda örneğinden 59; 355 hayvan örneğinden de 54 *Salmonella* izolatı elde edilmiştir. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden elde edilen 50 adet şüpheli

Salmonella izolatu, ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü'nde doğrulanmıştır. İzolatlar ve gıda örnekleri ile ilgili detaylı bilgi Ekler kısmında (Ek 1-9) verilmiştir.

3.1.3 Kimyasallar, Enzimler ve Antimikrobiyaller

Kullanılan kimyasal, enzim ve antimikrobiyal bilgileri "Ekler kısmında (Ek 10-12) verilmiştir.

3.1.4 Analizler için Kullanılan Bilgisayar Yazılımları

DNA izlerinin gözlenmesi ve kaydı Bio-Rad Universal Hood II gel imager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) ile; bant normalizasyonları ve gerekli PFGE analizlerinin gerçekleştirilmesi BioNumerics yazılımı (Applied-Maths, Kortrijk, Belgium) ile yapılmıştır. Cornell Üniversitesi Gıda Bilimi Bölümü'ndeki Prof. Dr. Martin Wiedmann'nın laboratuvarındaki BioNumerics yazılımına uzaktan erişim aracılığı ile bağlanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. DNASTar (DNASTAR Inc, Madison, ABD) yazılımına ait SeqMan, SeqBuilder and MegAlign kullanılmıştır. Alelik tip ve sekans tipi tayinleri için University of Warwick *Salmonella enterica* MLST Database (kaynak: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>) kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için Microsoft Office Excel ve DNASP yazılımı (Rozas, 2009) kullanılmıştır. p değerlerinin hesaplanması için ise <http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1/> web sitesi kullanılmıştır.

3.2 YÖNTEM

3.2.1 *Salmonella* İzolasyonu

Gıdalarda *Salmonella* İzolasyonu:

25 g katı örnek steril karıştırıcıya alınarak, üzerine önzenginleştirme besiyeri olarak 225 mL peptone triptic soy broth (pTSB) ilave edildikten sonra stomacher içerisinde homojenize edilmiştir. Karışım aseptik koşullarda ağzı kapatılabilir steril torbalara alınarak 35°C'de 6 saat inkübe edilmiştir. Selektif zenginleştirme Rappaport Vassiliadis (RVS) ve tetrahionate (TT) brothda yapılmıştır. RVS brotha 1:100 dilue edilen ön zenginleştirilmiş örnek 24 saat 42°C'deki etüvde inkübe edilmiştir. TT brotha 1:10 dilue edilen ön zenginleştirilmiş örnek 24 saat 37°C'deki etüvde inkübe edilmiştir. Selektif besiyerinden 10 µL'lik hacim xylose lysine deoxycholate (XLD) agara ve brilliant-green agara (BGA) sürülerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Toplanan *Salmonella* spp. izolatlarının doğrulanması ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yapılmıştır.

Hayvan Dışkılarında *Salmonella* İzolasyonu:

Salmonella'ya bağlı klinik vakalarda hayvan dışkı örneğinden XLD ve *Salmonella-Shigella* (SS) agara direkt ekim yapıp ve 37°C'de 24 saat inkübe edilerek izolasyona gidilmiştir. Çiftlik ve mezbahalardan alınan örneklerde ise 25 g hayvan dışkı (tavuk dışkısı örneklerinden 1 g) örneği steril karıştırıcıya alınarak, üzerine ön zenginleştirme besiyeri olarak 225 mL (tavuk dışkı örneği için ise 9 mL) peptone triptic soy broth (pTSB) ilave edildikten sonra homojenize edilmiştir. Karışım aseptik koşullarda ağzı kapatılabilir steril torbalara alınarak 35°C'de 6 saat inkübe edilmiştir. Selektif zenginleştirme Rappaport Vassiliadis (RV) ve tetrahionate (TT) brotlarda paralel olarak yapılmıştır. RV brotha 1:100 ve TT brotha 1:10 dilue edilen ön zenginleştirilmiş örnek 24 saat 42°C'deki çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. Her bir selektif besiyerinden 50 µL'lik hacim xylose lysine deoxycholate (XLD) ve SS agara sürülüp ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda selektif katı besiyerinde *Salmonella* olduğundan şüphelenilen (XLD'de merkezi siyah renkli pembe ve SS'de renksiz koloni morfolojisine sahip) her bir petriden üç koloni brain hearth infusion (BHI) agara sürülmüştür. Bir gece 37°C'de koloniler geliştirilmiştir. Toplanan *Salmonella* spp. izolatlarının doğrulanması ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yapılmıştır.

İnsan Klinik Vakalarında *Salmonella* İzolasyonu:

Salmonelloziz şüphesi ile Harran Üniv. Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına başvuran hastalardan dışkı ve/veya kan örnekleri alınmıştır. Dışkı örnekleri direkt kanlı agar, EMB agar ve *Salmonella-Shigella* (SS) agar besiyerlerine ekilmiştir. Gram negatif ve pozitif bakterilerin ayrımı kanlı agar ve EMB agarda gelişimlerine göre yapılmıştır. 37°C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda selektif SS agarda *Salmonella* şüpheli laktoz negatif koloniler (renksiz ya da siyah merkezli koloni morfolojisine sahip olanlar) izole edilmiş ve bu izolatlara biyokimyasal testler uygulanmıştır. Şüpheli koloniler öncelikle Simmon's sitrat, üre agar, triple sugar iron (TSI) agar ve hareket besiyerlerine inoküle edilerek, sitrat, üre, TSI ve hareket testleri yapılmıştır. Kan örnekleri ise steril şartlarda direkt kan kültür şişelerine alınarak otomatize sistem BD BACTEC 9050 cihazında inkübe edilmiş. Üreme olan örneklerden EMB, kanlı ve çukolata agar besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. EMB agar besiyerinde üreyen laktoz negatif koloniler, *Salmonella* spp. ayrımı için bahsedilen yöntemler uygulanmıştır. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesinde toplanan *Salmonella* spp. izolatlarının doğrulanması ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yapılmıştır.

3.2.2 *Salmonella* Doğrulanması ve Saklama

Salmonella doğrulanma işlemi PZR kullanılarak belirlenmektedir. BHI katı besiyerinde geliştirilen saf kültürden bir koloni, steril kürdan yardım ile alınıp 95 µL steril su içeren PZR

tübüne aktarılmıştır. Mikrodalga fırında 30 saniye mikrodalgaya maruz bırakılıp hücre parçalanmıştır. Bu solüsyon PZR analizlerinde kullanılmıştır. Lize olmuş hücreleri içeren solüsyondan 1 µL alınıp 49 µL PZR master karışımı içeren PZR tübüne aktarılmıştır. PZR master karışımı ve kullanılan *invA* primer sekansları Tablo 2 de' verilmiştir (Rahn ve ark., 1992, Kim ve ark., 2007).

Tablo 2. PZR Master Karışımı ve *invA* primer sekansı

PZR Reaksiyon Solüsyonu [Konsantrasyon]	Primer sekansı 5' –3'	Hacim (ul)
dH ₂ O		31
5X Go Taq Flexi buffer		10.0
MgCl ₂ [25mM]		3.0
dNTPs [10mM]		1.0
<i>invA</i> -F [12.5 µM]	GAA CCC TCA GTT TTT CAA CGT TTC	2.0
<i>invA</i> -R [12.5 µM]	TAG CCG TAA CAA CCA ATA CAA ATG	2.0
Taq DNA polymeraz		0.25
TOPLAM		49

Aşağıdaki amplifikasyon koşulları uygulanarak 678 bp'lik *invA* gen bölgesi amplifiye edilmiştir.

Amplifikasyon koşulları:

94°C'de 8 dakika [1X]

94°C'de 30 saniye

60°C 'de 30 saniye [35X]

72°C'de 30 saniye

72°C'de 5 dakika

4°C ∞ [1X]

PZR reaksiyonu sonucunda elde edilen üründen 5 µl alınarak ve DNA moleküler ağırlığı bilenen markerlar ile birlikte %1.5'lik agaroz jelinde 110 V'da yaklaşık yarım saat yürütülmüştür. Jeldeki DNA bantları etidyum bromide solüsyonunda bekletildikten sonra

görüntülenmiştir. 678 bp bölgedeki bant tespiti invA varlığını yani izolatların *Salmonella* bakterisi olduğunu göstergesidir.

Salmonella olduğu doğrulanan bu izolatların dondurulmasına başlanmıştır. BHI petrilerinden bir koloni alınarak BHI brothda 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Çoğaltılan organizmalar isimlendirilip, son konsantrasyonu %15 gliserol olacak şekilde tüplerde -80°C'de ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü'ndeki laboratuvarında saklanmaktadır.

5.2.3 Serotiplendirme

Proje süresince elde edilmiş olan insan, hayvan ve gıda kaynaklı *Salmonella* izolatlarının serotiplendirilmesi için, şu an Türkiye Halk Sağlığı Kurumu olarak yeniden yapılandırılmış olan eski Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'nden hizmet alımına gidilmiştir. White-Kauffman-LeMinor Sınıflandırılmasına, cam yüzeyde bakteriye ait yüzey antijenlerinin 250'den fazla antiserum ile çöktürülmesi esasına dayanır. Antiserumlar O, H, Faz1 ve Faz2 antijenlerine yönelik reaksiyon gerçekleştirir. Yaklaşık 20 µl antiserum *Salmonella* kültürü ile karıştırılarak sonuç elde edilir. Gözle görülür çökeltme antiseruma ait antijenin varlığını göstererek pozitif sonuç verirken; homojen karışım negatif sonuç anlamına gelir.

3.2.4 Multi Lokus Sekans Tiplendirme (MLST) Analizi

Gıda, Hayvan ve Klinik İnsan İzolatlarında DNA İzolasyonu ve 7 Metabolik Genin PZR ile Amplifikasyonu:

İzole edilen tüm *Salmonella* izolatlarında genotipik analizlerin yürütülmesi için genomik DNA saflaştırılmıştır. *Salmonella* stoğu BHI katı besiyerine çizilecek ve 37°C'de bir gece inkübe edilmiş, tek koloni alınıp BHI brothda 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Hücre süspansiyonundan ticari kit 'NanoBiz Bakteri Genomik Saflaştırma Kiti' yardımı ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Saflaştırılmış *Salmonella* DNA'ları 7 gen MLST PZR reaksiyonunda kullanılmıştır (Achtman ve ark., 2012).

PZR master karışımı Tablo 3'de ve kullanılan genlerin primer sekansları Tablo 4'te verilmiştir (Jolley ve Maiden, 2010).

Tablo 3. PZR Master Karışımı

PZR Reaksiyon Solusyonu [Konsantrasyon]	Hacim (µl)
dH ₂ O	71.5
10X PZR bufer	10.0
MgCl ₂ [25mM]	6.0
dNTPs [10mM]	2.0
Primer*-F [12.5 µM]	4.0
Primer* [12.5 µM]	4.0
Taq DNA polym.	0.5
TOPLAM	98

*: primer sekanları Tablo 4'te verilmiştir

Tablo 4. MLST 7 gen primer sekanları

Gen	Primer sekansı 5' –3'	Amplifiye edilecek bölge, bp
<i>aroC</i> -F	GGCACCAGTATTGGCCTGCT	826
<i>aroC</i> -R	CATATGCGCCACAATGTGTTG	
<i>thrA</i> -F	GTCACGGTGATCGATCCGGT	852
<i>thrA</i> -R	CACGATATTGATATTAGCCCG	
<i>purE</i> -F	ATGTCTTCCCGCAATAATCC	510
<i>purE</i> -R	TCATAGCGTCCCCCGCGGATC	
<i>sucA</i> -F	AGCACCGAAGAGAAACGCTG	643
<i>sucA</i> -R	GGTTGTTGATAACGATACGTAC	
<i>hisD</i> -F	GAAACGTTCCATTCCGCGCAGAC	894
<i>hisD</i> -R	CTGAACGGTCATCCGTTTCTG	
<i>hemD</i> -F	ATGAGTATTCTGATCACCCG	666
<i>hemD</i> -R	ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA	
<i>dnaN</i> -F	ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA	833
<i>dnaN</i> -R	AATTTCTCATTTCGAGAGGATTGC	

Aşağıdaki amplifikasyon koşulları uygulanarak 7 farklı gen bölgesi amplifiye edilmiştir.

Amplifikasyon koşulları:

94°C'de 10 dakika [1X]

94°C'de 1 dakika

60°C 'de 1 dakika [35X]

72°C'de 1 dakika

72°C'de 7 dakika

4 °C ∞ [1X]

PZR reaksiyonu sonucunda elde edilen üründen 5 µl alınacak ve DNA moleküler ağırlığı bilenen markerlar ile birlikte %1.5'lik agaroz jelinde 110 V'da yaklaşık yarım saat yürütülmüştür. Jeldeki DNA bantları etidyum bromide solusyonunda bekletildikten sonra görüntülenmiştir. Bant tespiti pozitif sonuç olacak ve PZR ürün, NanoBiz PZR Saflaştırma Kiti yardımı ile saflaştırılmış ve sekansı yapılmak üzere sekanslama birimine gönderilmiştir.

Sekans verilerinin incelenmesi ve DNASTAR yazılımı ile filogenetik analizlerin yapılması:

DNASTAR Lasergene adlı yazılım kullanılarak sekans analizlenmesi yapılmaktadır. Sekans sonuçları öncelikle manuel olarak gözden geçirildikten sonra, DNASTAR Lasergene'de sıralandırılmışdır (align edilmektedir). Aynı zamanda Warwick Üniversitesi, İngiltere, bünyesindeki *Salmonella* data bankası kullanılarak her bir gen için öncelikle alilik tip tespit edilmekte, daha sonra da sekans tipi belirlenmektedir. Eger daha önce bulunmamış bir alilik tip belirlenirse, yeni alilik tip numarası verilmiştir. Biyoinformatik araçlar kullanılarak evrimsel analizler yapılmış ve izolatlar arasındaki ilişki tespit edilmiştir. Buna ilaveten E-burst grupları da tespit edilmiştir. E-burst grupları 7 gende bulunan alelik tiplerin çoğunda (6 ya da 5 alel) eşit numaralar almıştır; yani 5-6 alelik tipi aynı olan sekans tipi gruplarına verilen isimdir.

3.2.5 *Salmonella* İzolatlarının Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Saptanması

Disk Difüzyon Metodu:

4 mL Mülller-Hinton sıvı besiyerine kültür steril öze yardımı ile aktararak, 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra steril suda 1:100 dilüsyonlar yapılır, amaç 0.5 McFarland standardıyla aynı ($1.5 \cdot 10^8$ cfu/ml) hücre konsantrasyonu elde etmektir. 100 µL kültür içeren besiyer, Mülller-Hinton agar içeren petrilere yayılmıştır. Antibiyotik içeren 6 mm kağıt diskler agarın yüzeyine yerleştirilir ve 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Disk difüzyonu için 19 farklı antimikrobiyal kullanılmıştır. Kullanılan antimikrobiyal diskler (Oxoid, Basingstoke, UK) Tablo 5'de verilmektedir. Kontrol organizması *E. coli* ATCC 25922'dir. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından belirlenen standartlara (Tablo 5) göre sonuçlar duyarlı (S), orta (I) ve dirençli (R) olarak belirlenmiştir (CLSI, 2013).

Tablo 5. Disk difüzyon yönteminde kullanılan alan çapları (CLSI,2002;2013)

Antimikrobiyal grup	Antimikrobiyal ajan	Disk içeriği (µg)	Alan çapı (mm)		
			Duyarlı (S)	Orta (I)	Dirençli (R)
Aminoglukositler	Amikasin ¹	30	≥17	15-16	≤14
	Gentamisin ¹	10	≥15	13-14	≤12
	Kanamisin ¹	30	≥18	14-17	≤13
	Streptomisin ¹	10	≥15	12-14	≤11
Beta laktamlar	Amfisillin ¹	10	≥17	14-16	≤13
	Seftiofur ²	30	≥21	18-20	≤17
	Sefoksitin ¹	30	≥18	15-17	≤14
	Seftriakson ¹	30	≥23	20-22	≤19
	Sefalothin ¹	30	≥18	15-17	≤14
	Amoksisillin-klavulanik asit ¹	20/10	≥18	14-17	≤13
	Ertapenem ¹	10	≥23	20-22	≤19
	Imipenem ¹	10	≥23	20-22	≤19
	Fenikoller	Kloramfenikol ¹	30	≥18	13-17
Kuinolonlar ve	Nalidiksic asit ¹	30	≥19	14-18	≤13
Florokuinolonlar	Siprofloksasin ¹	5	≥21	16-20	≤15
Tetrasiklinler	Tetrasiklin ¹	30	≥15	12-14	≤11
Sulfanomitler ve	Trimethoprim-sulfamethoksazol ¹	1.25/23.75	≥16	11-15	≤10
Trimethoprimler	Sulfisoksazol ¹	300	≥17	13-16	≤12
Macrolidler	Azitromisin ³	15			

¹ CLSI, 2013. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement, Vol:33, ISBN 1-56238-865-7

² CLSI, 2002. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard—Second Edition, Vol: 22, ISBN 1-56238-461-9

³ Azitromisin is CLSI raporlarında *Enterobacter* grubunda tanımlanmamıştır. Bu nedenle disk difüzyon testlerinde sonuçları verilmemiştir.

Proje kapsamında izole edilen tüm izolatlar disk difüzyon yöntemi ile fenotipik olarak tiplendirilmiştir.

Minimal İnhibisyon Konsantre (MIK) Yöntemi:

İzole edilen tüm *Salmonella* izolatlarının antibiyotik dirençlilik profilleri için minimal inhibisyon konsantre (MIK) yöntemi mikro seyreltme metodu uygulanarak kullanılmıştır (CLSI, 2013). *Salmonella* izolatları Mueller-Hinton agar içeren petrilere sürülmüş ve 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Steril tek kullanımlık plastik öze yardımı ile % 0.85 NaCl içeren steril tuzlu su içine alınmıştır. İnokulum 10⁵ koloni oluşturma ünitesine spektrofotometre (Shimadzu UV-1700 Pharma Spec) yardımı ile ayarlanmıştır. Hazırlanan süspansiyondan 15 µL alınıp 11 mL Mueller-Hinton broth içeren tüplere aktarılmış ve karıştırılmıştır. Karışımdan 100 µL alınıp

artan konsantrelerde 19 farklı antibiyotik (Tablo 6) içeren mikrotiter plakaların haznelerine ilave edilmiştir. Plakalar 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişme görülmeyen ilk haznedeki konsantrasyon minimal inhibisyon konsantreleri (MIK) olarak belirlenmiştir. Belirlenen MIK ($\mu\text{g/mL}$) Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)'den ve European Union Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)'de verilen kırılma noktaları (break points) ile karşılaştırılmış ve duyarlı, orta ve dirençli olarak kodlanması planlanmıştır (Tablo 6).

Mikro seyreltme yöntemine ilaveten E-test metodu da denenmiştir. BHI agarda bir gece inkübe edilmiş izolatlar, 0.85% tuzlu suya aktarılmış, bulanıklığı 0.5 McFarland standardıyla karşılaştırılarak ayarlanmıştır. Steril swap yardımıyla, sıvı besiyerden Mueller Hinton agara ekim yapılmıştır. Ardından her bir antimikrobiyal için E-testler (Biomérieux, SA), ekim yapılan agarların üzerine steril pens ile konulmuş ve $35\pm 2^\circ\text{C}$ 'de 16-20 saat inkübe edilmişlerdir. Sonuçları okurken, MIK değeri, inhibisyon alanından altında kalan konsantrasyon değerine bakılarak belirlenmiştir.

Tablo 6. Antimikrobiyal ajanların minimum inhibisyon konsantreleri (CLSI, 2013)

Antimikrobiyal ajan	MIK kırılma noktası ($\mu\text{g.mL}$)		
	Duyarlı (S)	Intermediate(I)	Dirençli (R)
Amikasin	≤ 16	32	≥ 64
Gentamisin	≤ 4	8	≥ 16
Kanamisin	≤ 16	32	≥ 64
Streptomisin	≤ 32	N/A	≥ 64
Ampisilin	≤ 8	16	≥ 32
Amoksisilin-Klavulanik asit	$\leq 8 / 4$	16 / 8	$\geq 32 / 16$
Seftiour	≤ 2	4	≥ 8
Sefriaksone	≤ 8	16 - 32	≥ 64
Sephalotin	≤ 8	1	≥ 32
Sefoksitin	≤ 8	16	≥ 32
Sülfametoksazol-Sülfisoksazol	≤ 256	N/A	≥ 512
Trimetoprim-Sülfametoksazol	$\leq 2 / 38$	N/A	$\geq 4 / 76$
Kloramfenikol	≤ 8	16	≥ 32

Siproflaksasin	≤ 1	2	≥ 4
Nalidiksik asit	≤ 16	N/	≥ 32
Tetrasiklin	≤ 4	8	≥ 16
İmipenem	≤ 13	14-15	≥ 16
Ertapenem	≤ 1	16-18	≥ 19
Azithromycin	<16	N/A	≥ 16

Antibiyotiğe dirençli genlerin (blaTEM-1, blaPSE-1 (AKA CARB-2), blaCMY-2, ampC, cat1,cat2, flo, cmlA, aadA1, aadA2, strA, strB, aacC2, aphA1-lab, dhfrI, dhfrXII, sull, sullI, tetA, tetB, tetG) PZR ile analizleri:

Safılaştırılmış *Salmonella* DNA'ları antibiyotik dirençlilik profilleri genotipik olarak belirlenmiştir. PZR master karışımı Tablo 7'de verilmiştir. Kullanılacak genler ve primerleri Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 7. PZR Master Karışımı

PZR Reaksiyon Solusyonu [Konsantrasyon]	Hacim(ul)
dH ₂ O	71.5
10X PZR Buffer	10.0
MgCl ₂ [25mM]	6.0
dNTPs [10mM]	2 0
Primer*-F [12.5 µM]	4.0
Primer* [12.5 µM]	4.0
Taq DNA polym.	0 5
TOPLAM	98

*: primer sekanları Tablo 8'de verilmiştir

Tablo 8. Antibiyotik dirençliliği kodlayan genler, primerleri ve primer koşulları

Gen	Primer Sekansı	Dirençlilik gösterdiği	Primer Bağlanma Sıc. (°C)	Referans
<u>Beta Lactam dirençlilik</u> <i>bla</i> TEM-1	F: CAG CGG TAA GAT CCT TGA GA R: ACT C C CGT CGT GTA GAT A	Class A beta-lactamase	53.9	Chen ve ark., 2004
<i>bla</i> PS13E-1 (AKA	F: TGC TTC GCA ACT ATG ACT AC	Class A beta-lactamases	52.4	Chen ve

<i>CARB2)</i>				ark., 2004
<i>blaCMY-2</i>	R: AGC CTG TGT TTG AGC TAG AT F: TGGCCGTTGCCGTTATCTAC	Ceftiofur, Ceftriaxone	60.8	Chen ve ark., 2004
<i>ampC</i>	R: CCCGTTTTATGCACCCATGA F: AAC ACA CTG ATT GCG TCT GAC	Beta-lactamases	60	Perez- Perez ve Hanson, 2002
	R: CTG GGC CTC ATC GTC AGT TA			
<u>Chloramphenicols</u>				
<i>cat1</i>	F: CTTGTCGCCTTGCGTATAAT	Chloramphenicol	TD 55- 45	Chen ve ark., 2004
<i>cat2</i>	R: ATCCCAATGGCATCGTAAAG F: AACGGCATGATGAACCTGAA	Chloramphenicol	60	Chen ve ark., 2004
<i>Flo</i>	R: ATCCCAATGGCATCGTAAAG F: CTGAGGGTGTCTGCATCTAC	Chloramphenicol	54.4	Chen ve ark., 2004
<i>cmIA</i>	R: GCTCCGACAATGCTGACTAT F: CGCCACGGTGTGTTGTTAT	Chloramphenicol	58.5	Chen ve ark., 2004
	R: GCGACCTGCGTAAATGTCAC			
<u>Aminoglycosides</u>				
<i>aadA1</i>	F: TATCAGAGGTAGTTGGCGTCAT	Streptomycin	53.6	Randall ve ark., 2004
<i>aadA2</i>	R: GTTCCATAGCGTTAAGGTTTCATT F: TGTTGGTTACTGTGGCCGTA	Streptomycin	57.3	Randall ve ark., 2004
<i>strA</i>	R: GATCTCGCCTTTCACAAAGC F: CTTGGTGATAACGGCAATTC	Streptomycin	51.8	Gebreyes ve Altier, 2002
<i>strB</i>	R: CCAATCGCAGATAGAAGGC F: ATCGTCAAGGGATTGAAACC	Streptomycin	57	Gebreyes ve Altier, 2002
<i>aacC2</i>	R: GGATCGTAGAACATATTGGC F: GGCAATAACGGAGGCAATTCGA	Gentamicin, Kanamycin	57.9	Chen ve ark., 2004
<i>aphA1-lab</i>	R: CTCGATGGCGACCGAGCTTCA F: AAACGTCTTGCTCGAGGC	Kanamycin	54	Frana ve ark., 2001
	R: CAAACCGTTATTCATTTCGTGA			
<u>Trimethoprim</u>				
<i>dhfrI</i>	F: CGGTCGTAACACGTTCAAGT	Trimethoprim	51.7	Chen ve ark., 2004
<i>dhfrXII</i>	R: CTGGGGATTCAGGAAAGTA F: AAATTCCGGGTGAGCAGAAG	Trimethoprim	57.9	Chen ve ark., 2004
	R: CCCGTTGACGGAATGGTTAG			
<u>Sulfonamides</u>				
<i>sull</i>	F: TCACCGAGGACTCCTTCTTC	Sulfoxazole	55.6	Chen ve ark., 2004
<i>sullI</i>	R: CAGTCCGCCTCAGCAATATC F: CCTGTTTCGTCCGACACAGA	Sulfoxazole	56	Chen ve

				ark., 2004
<u>Tetracycline</u>	R: GAAGCGCAGCCGCAATTCAT			
<i>tetA</i>	F: GCGCCTTTCCTTTGGGTTCT	Tetracycline	57.7	Chen ve ark., 2004
<i>tetB</i>	R: CCACCCGTTCCACGTTGTTA F: CCCAGTGCTGTTGTTGTCAT	Tetracycline	58.4	Chen ve ark., 2004
<i>tetG</i>	R: CCACCACCAGCCAATAAAAT F: AGCAGGTCGCTGGACACTAT	Tetracycline	60	Chen ve ark., 2004
	R: CGCGGTGTTCCACTGAAAAC			
TD, touchdown				

Amplifikasyon koşulları:

94°C'de 8 dakika [1X]

94°C'de 30 saniye

Annealing Sıcaklık* 30 saniye [35X]

72°C'de 30 saniye

72°C'de 5 dakika

4°C ∞ [1X]

*: her gen için primer bağlanma sıcaklığı

PZR reaksiyonu sonucunda elde edilen üründen 5 µl alınarak ve DNA moleküler ağırlığı bilenen markerlar ile birlikte %1.5'lik agaroz jelinde 110 V'da yaklaşık yarım saat yürütülmüştür. Jeldeki DNA bantları etidyum bromide solusyonunda bekletildikten sonra görüntülenmiştir. Bant varlığı genin organizmada olup olmadığını gösterir.

3.2.6 Vuruşlu Alan Jel Elektrofrez (PFGE) Analizi

PFGE analizi PulseNet protokolü kullanılarak ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümünde gerçekleştirilmiştir (Ribot ve ark., 2006).

Katı Besi Yerinde Gelistirilen Kültürlerden Plug Hazırlanması:

-80°C dondurucuda saklanan *Salmonella* stoğundan BHI katı besi yerine çizilen izolatlar 37°C'de 14-18 saat inkübe edilmiştir. Geliştirilen kültürler steril pamuklu çubuklar yardımıyla 4ml hücre süspansiyon buffera aktarılmıştır. Oluşan hücre-buffer karışımının absorbansı spektrofotometre yardımıyla 610 nm de 1.3-1.4 arası ayarlanacak ve optik yoğunluğu ayarlanmış olan karışımlar plug yapım aşamasına kadar buz içerisinde bekletilmiştir. Her izolat için 400µl karışım 1.5ml mikro tüplere aktarıldıktan sonra tüplere 20µl Proteinaz-K enzimi eklenmiş ve bu şekilde hücrelerin parçalanma süreci başlamıştır. Hücre-buffer karışımları 400µl Seakem Agarose (1%)-SDS ile karıştırılarak plug kalıplarına dökülmüş ve agaroz katılaştıktan sonra plug oluşumu tamamlanmıştır.

Agaroz jel içerisinde olan hücreler Proteinaz-K eklenmiş 5 ml hücre parçalama solusyonu ile sallamalı su banyosunda kalmış ve hücre parçalama işlemi sonra gerçekleştirilmiştir. Ortaya çıkan hücre artıklarını temizlemek amacıyla pluglar 2 kez steril de-iyonize su ile, 4 kez de Tris-EDTA (TE) bufer ile 50°C'de tutulan çalkalamalı inkübatörlerde yıkanmıştır. Pluglar TE bufer içerisinde elektroforeze kadar 4°C'de saklanmıştır.

Plugların *Xba*I Restriksiyon Enzimi ile DNA Kesim İşlemi

Pluglardan 2 mm'lik parçalar halinde kesilerek *Xba*I enzimine ait buffer solüsyonunda bekletildikten sonra *Xba*I enzim içeren solüsyonun içine aktarılmış ve DNA restriksiyon işlemi 37°C'de 4 saat olarak belirlenmiştir.

Elektroforez ve Jel Fotoğraflarının Elde Edilmesi

DNA parçalama işleminden sonra 2 mm plug parçaları Seakem Agarose (1%)-TBE jeline yerleştirildikten sonra jel tamamı PFGE elektroforez haznesine alınmaktadır. Elektroforez için 100 bp'den kromozom büyüklüğündeki 10 Mbp'e kadar geniş yelpazede bulunabilen DNA parçalarını analiz edebilen CHEF-DR III, BioRad sistemi kullanılmıştır. Elektroforez haznesine 2.1 L 0.5X TBE bufer ile doldurulduktan sonra *Salmonella* için belirlenmiş koşullarda elektroforez başlatılmıştır. *Salmonella* Braenderup H9812 molecular standart olarak kullanılmıştır. Elektroforez koşulları ise Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Elektroforez Koşulları

DNA büyüklük aralığı	30kb - 700kb
% Agaroz	%1

Voltaj Gradyanı	6.0 v/cm
Elektroforez süresi	19 saat
Dahili açı	120°
Başlangıç Akım Süresi	2.16s
Bitiş Akım Süresi	1.03 dk 80s
Pompa Hızı	70 (0.75L/dk)

PFGE Jel fotoğrafında DNA bantlarının görüntülenebilmesi için Quantity One yazılımı ile beraber bir jel görüntüleme sistemi olan Molecular Imager-Gel Doc-XR System Universal Hood II kullanılmıştır. Elde edilen bant görüntülerinin analitik olarak incelenmesi için BioNumerics adlı yazılımı kullanılmıştır. BioNumerics yazılımı ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü bünyesinde bulunmadığı için PFGE jel fotoğraflarını Cornell Üniversitesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü'ndeki Prof. Dr. Martin Wiedmann'nin laboratuvarındaki bilgisayara uzaktan erişim yoluyla bağlanılıp BioNumerics yazılımı kullanılarak inceledik. Tüm dendogramlar da BioNumerics yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Gıda örneklerinde *Salmonella* prevalansı ve mevsimsellik dağılımları

Salmonella izolasyonu ve tespiti çalışmaları sonucunda, 192 gıda örneğinin 59'unda (% 30.1) *Salmonella* saptanmıştır. *Salmonella* prevalansı gıda tipine göre büyük değişiklik göstermekle birlikte en yüksek prevalans tavuk eti ve sığır sakatatı örneklerinde tespit edilmiştir. Her iki gıda tipinde, toplamda 24 örnekten 14 tanesinde (% 58.3) *Salmonella* tespit edilmiştir. Sığır kıyma eti örneklerinde 13 örnekte (% 54.2), koyun kıyma eti örneklerinde 12 örnekte (% 50), taze peynir örneklerinde 4 örnekte (%16.7) ve Urfa peyniri örneklerinde 2 örnekte (% 8.3) *Salmonella* saptanmıştır. Kuru gıda örnekleri olan, antep fıstığı ve isotta *Salmonella*'ya rastlanmamıştır.

Türkiye'deki gıda örneklerine ait geçmiş prevalans çalışmaları farklı illerde farklılıklar göstermektedir: Ankara, Samsun, Bursa, Konya ve Elazığ gibi şehirlerde yapılan araştırmalar neticesinde, kanatlı etlerinde % 0.75 ve % 88.4 arasında değişen *Salmonella* prevalans değerleri tespit edilmiştir (Sırıken ve Türk, 2013). Coğrafi koşullar, kesimhane ve çiftlik koşulları gibi etkenler göz önüne alındığında, çalışmamızda tavuk etlerinde tespit edilen % 58.3'lük değer Türkiye için çelişki göstermemektedir. Ancak, bu sonuç 2012 EFSA hayvan hastalıkları raporu göz önüne alındığında AB üyesi ülkelerinin *Salmonella* prevalans ortalamasına (% 5.5) göre oldukça yüksek bir değer arz etmektedir (EFSA, 2014).

Bununla beraber, çalışmamızda tavuk etleri kadar yüksek *Salmonella* kontaminasyonuna sahip sığır sakatatı örneklerine dair geçmişte yapılan araştırmalar Afyonkarahisar'da kasaplarda toplanan örneklerin % 16'sında ve kesimhanelerden toplanan sığır karaciğeri örneklerinin % 8'inde *Salmonella* saptanmıştır (Akkaya ve ark., 2012). Ayrıca, Ankara'da satılan karaciğer örneklerinin % 33.3'ünde *Salmonella* saptanmıştır (Ulutürk, 1993). Almanya'da yapılan bir diğer çalışmada ise, bir kesimhanede iç çıkarma işlemi sonrasında toplanan sığır karaciğer örneklerinin % 32'sinde *Salmonella* tespit edilmiştir (Samuel ve ark., 1980).

Hijyenik olmayan kıyma çekme aletleri ve elle muamele gibi etkenlerden dolayı kıyma örnekleri patojen kontaminasyonuna daha açık hale gelmektedir. Ayrıca, kıyma çekme işlemi sonucunda, yüzeydeki bakteriler et dokusu içerisine de nüfuz edebilmektedir. Bu nedenle, çeşitli ülkelerde kontamine kıyma örnekleri salgınlara sebep olmuş ve üretici firmalar tarafından ürünler piyasadan toplatılmıştır (Stobbee, 2013; Robinson, 2013). Daha önce Türkiye'de yapılmış, kıyma örneklerine dair prevalans çalışmaları % 2.8 ve % 25 arasında değişen *Salmonella* prevalans değerlerini göstermektedir (Yıldız ve Ulukanlı, 2012).

Çiğ et ürünleri kadar riskli bir ürün grubu olmamasına rağmen, peynir örneklerinde *Salmonella*'ya rastlanabilmektedir. Salamura, olgunlaştırma, düşük pH ve düşük nem oranı gibi olumsuz çevresel koşullara rağmen, hijyenik olmayan proses ve elle muamele koşulları, yeterli olmayan ısıl işlem ve çiğ süt kaynaklı kirlilik gibi nedenlerden dolayı peynirlerde *Salmonella* kontaminasyonu olabilmektedir. Geçmiş çalışmalar da, salamura çözeltilerinde önemli tuz yoğunluğuna rağmen, beyaz peynir örneklerinde bazı *Salmonella* serotiplerinin hayatta kalabildiği gözlemlenmiştir (Erkmen ve Bozoglu, 1995). Bununla beraber, Kousta ve ark. (2010) 1983 ve 2007 yılları arasında peynir kaynaklı salmonelloz salgınlarını listelemiştir. İstanbul'da satılan tulum peynirlerindeki *Salmonella* prevalansını araştıran başka bir çalışmada 250 peynir örneğinden 6 tanesinde (% 2.4) *Salmonella* tespit edilmiştir. Başka bir çalışma ise 50 adet Van otlu peynirinin 3 tanesinde (% 6) *Salmonella* tespit edilmiştir (Tekinşen ve Özdemir, 2006). Küflü peynirlerin mikrobiyal kalitesini inceleyen başka bir çalışmada ise 30 adetlik numune setinde 7 örnekte (% 23.3) *Salmonella*'ya rastlanmıştır (Hayaloglu ve Kirbag, 2007).

Özetle, Türkiye'de ve dünyada yapılan diğer çalışmalar göz önüne alındığında, çalışmamız sonucunda, tavuk etinde (% 58.3) ve iki peynir türünde (taze peynir: % 16.7, Urfa: % 8.3) saptanan prevalans değerleri, literatürdeki değerlerle uyumlu görünmektedir. Bununla beraber, kırmızı et çeşitleri, sığır kıyma, koyun kıyma ve sığır sakatat örneklerinde saptanan değerler göreceli olarak daha yüksek görünmektedir.

Prevalans değerlerindeki bu tür farklılıklar iklim koşulları ve coğrafi şartlar, kesimhanelerde, kasaplarda ve perakende satış yerlerindeki hijyen uygulamaları, gıdaların işlenmesi ve elle muamelesine dair koşullar sebebiyle oluşabilmektedir. Bu çalışmada, yöre insanının tüketim alışkanlıklarını daha doğru yansıtabilmek amacıyla, Şanlıurfa şehrindeki geleneksel çarşı ve pazar yerleri ziyaret edilmiştir. Çalışmamızda satın alınan gıda örneklerinin hiçbiri etiketli, paketli veya markalı ürünler olmamakla beraber, bu tip örneklerin tabii olduğu gıda güvenliği ve hijyen uygulamaları tescilli marka ürünlerinin tabii olduğu uygulamalar kadar sıkı olmayabilmektedir. Ayrıca, gıda üretim yerlerinde yapılan inceleme ve denetimler, sertlik, yasal mevzuat koşulları ve zaman aralığı açısından ülkeden ülkeye ve hatta aynı ülke içerisinde bölgeden bölgeye değişebilmektedir. Dolayısıyla, bu durum gıdalarda kontaminasyon risklerinin oluşma ihtimalinde değişimlere sebep olabilmektedir.

Ayrıca, örnek seti büyüklüğü prevalans değerlerindeki değişime sebep olan başka bir etkidir. Örneğin, *Salmonella*, kabuklu kuruyemiş ve baharat gibi kuru gıda mamullerinde sık rastlanan bir patojen olmamasına rağmen, bu gıdalardan kaynaklanan *Salmonella* salgınları, bu patojenin bu tür kuru gıdaların tüketimi vasıtasıyla hastalık yapabilme ve hayatta kalabilme yeteneğini göstermektedir (Uesugi ve ark., 2007; Souza Sant'Ana ve ark., 2012).

Bununla beraber, kuru gıdalardaki *Salmonella* prevalansı çok yüksek değerlere sahip olmamaktadır ve bu tür gıdalardan *Salmonella* tespiti fazla sayıda numune içeren büyük çaplı örnekleme gerektirebilmektedir. Çalışmamızda, isot ve antep fıstığı örneklerinde *Salmonella* tespit edilememesinin sebebinin sınırlı sayıdaki örnek seti olması ihtimal dahilindedir. Ayrıca, laboratuvarımız bünyesinde yapılan başka bir projede, Şanlıurfa'daki antep fıstığı satıcılarından toplanan 50 örneğin 3 tanesinde (% 6) *Salmonella* tespit edilmiştir.

Gıda örneklerinde en yüksek prevalans değeri sonbahar döneminde tespit edilmiştir. Bu dönemde, 48 örneğin 18 tanesinde (% 37.5) *Salmonella* tespit edilmiştir. Sonbahar dönemini, 15 örnekle (% 31.3) yaz, 13 örnekle (% 27.1) sonbahar ve kış dönemleri takip etmiştir. En yüksek prevalans değerinin bulunacağı dönemin yaz dönemi olacağına dair bir beklentimiz bulunmasına rağmen sonbahar dönemindeki yüksek prevalans değerininin Şanlıurfa yöresindeki sıcaklık değerlerinin farklı olmasından dolayı olduğunu düşünmekteyiz. Çünkü Şanlıurfa yöresindeki baharların, Türkiye'nin birçok bölgesine nazaran daha ılık mevsimsel koşullarda geçmektedir ve bahar aylarındaki ortalama sıcaklık verileri *Salmonella* gibi mezofilik bakterilerin yaşamasına elverişlidir (İlgili değerler <http://www.mgm.gov.tr> adresinde mevcuttur).

Tablo 10'da görüldüğü üzere, 14 adet *Salmonella*-pozitif tavuk örneğinin 6 tanesi ilkbahar döneminde toplanmıştır. Sonbahar ve yaz örnekleme dönemlerinde, 3'er adet kış döneminde ise 2 adet kontamine tavuk eti örneği toplanmıştır Bununla beraber, 13 adet pozitif sığır kıyma örneğinin 6 tanesi ve 12 adet koyun kıyma örneğinin 5 tanesi sonbahar dönemine aittir.

Tablo 10. *Salmonella*-pozitif örneklerin örnekleme dönemi ve gıda tipi yönüyle karşılaştırılması

Örnekleme dönemi (Dönem içi <i>Salmonella</i> -pozitif örneklerin toplam sayısı)	Gıda tipi	<i>Salmonella</i> -pozitif örneklerin toplam sayısı
İlkbahar (13)	Tavuk eti	6
	Sığır sakatat	4
	Koyun kıyma	1
	Taze peynir	1
	Urfa peyniri	1
Yaz (15)	Koyun kıyma	4
	Sığır kıyma	4

	Tavuk eti	3
	Sığır sakatat	3
	Urfa peyniri	1
Sonbahar (18)	Sığır kıyma	6
	Koyun kıyma	5
	Tavuk eti	3
	Sığır sakatat	3
	Taze peyniri	1
Kış (13)	Sığır sakatat	4
	Sığır kıyma	3
	Tavuk eti	2
	Koyun kıyma	2
	Taze peynir	2

4.2 Hayvan dışkı örneklerinde *Salmonella* prevalansı

Projemizde Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi'ne gelen salmonelloziz klinik vakalarından *Salmonella* izolasyonu yapılacaktır, proje dönem aralığında şüpheli salmonelloziz vakası Hayvan Hastanesi'ne başvurmadığı için B-planına geçilmiştir. Bölgedeki kesimhanelerden ve hayvan çiftliklerden hayvan dışkı örnekleri toplanmıştır (Ekler 5,6,7,8). Toplamda dört ayrı örnekleme periyodu süresince toplanan 355 hayvan dışkı örneğinin 53 adedinde (% 14.9) *Salmonella* tespit edilmiştir.

11 tavuk dışkı örneği ve 8 keçi dışkı örneği haricinde, toplanan sığır ve koyun dışkı örnekleri, Şanlıurfa'da hayvan pazarının da konumlandığı Eyyübiye bölgesindeki kesimhanelerden toplanmıştır (Ek 5,6,7,8). İlkbahar, yaz, sonbahar, kış (kış ek örnekleme dönemi de dahil) dönemlerinde sırasıyla, 82, 91, 117 ve 65 dışkı örneği toplanmıştır. Örnek koleksiyonu hayvan bazında incelendiğinde, toplamda 231 koyun dışkısı, 105 sığır dışkısı, 11 tavuk dışkısı ve 8 keçi dışkısı toplanmıştır. En yüksek *Salmonella* prevalansı kış örnekleme döneminde gözlemlenmekle beraber (% 23.1), tüm mevsimlere ait prevalans değerleri Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Örnekleme dönemlerine ait örnek seti büyüklüğü ve örnekleme dönemlerinde tespit edilen *Salmonella* izolat sayısı

Örnekleme dönemi	Toplanan örnek sayısı	Doğrulanmış <i>Salmonella</i> izolat sayısı
İlkbahar	82	6 (% 7.3)
Yaz	91	16 (% 17.6)
Sonbahar	117	16 (% 13.7)
Kış	65	15 (% 23.1)
TOPLAM	355	53

Prevalans değerleri hayvan tipine göre incelendiğinde sığır ve koyun dışkı örneklerinin sırasıyla 33 (% 31.4) ve 19 (% 8.2) tanesinde *Salmonella* varlığı saptanmıştır. 8 adet keçi örneğinin hiç birinde *Salmonella* gözlemlenmezken 11 adet tavuk dışkısından 1 tanesinde *Salmonella* tespit edilmiştir. Ancak hayvan tipleri için prevalans değerlerininin karşılaştırılması çok anlamlı olmayacaktır, çünkü toplanan örnek sayıları ziyaret edilen hayvan pazarları ve kesimhanelere bağlı olarak değişmektedir.

Literatürde sığır dışkılarındaki *Salmonella* varlığına yapılmış olan çalışma sonuçları çeşitlilik göstermektedir. Teksas, ABD’de yapılmış olan bir çalışmaya göre 706 sığıra ait post ve dışkı örneklerinin % 32.6’sında *Salmonella* tespit edilmiştir (Loneragan ve ark., 2012). Bununla beraber Burkina Faso’da yapılmış olan başka bir çalışmada 304 sağlıklı kesimlik sığıra ait dışkı örneklerinin % 52’sinde *Salmonella* tespit edilmiştir (Kagambèga ve ark., 2013). Bununla beraber, Meksika’daki başka bir çalışmada bir kesimhanede toplanan 68 dışkı örneğinin % 94.1’inde *Salmonella* saptanmıştır (Vázquez-Garcidueñas ve ark., 2014). Buna ilaveten, Kars ilinde koyun ve sığırlara ait rektal swab örnekleriyle yapılan 1000 örnekleme başka bir çalışmada sadece 7 örnekte *Salmonella*’ya rastlanmıştır (Genç, 2002).

Koyun dışkılarındaki *Salmonella* varlığına dair çalışmalara ait çeşitli sonuçlar bulunmaktadır. Güneybatı ABD’de yapılmış bir çalışmada 155 koyun dışkı örneğinin % 7’sinde *Salmonella* tespit edilmiştir. Etiyopya’da yürütülmüş başka bir araştırmada 624 koyun örneğinin (mezanterik lenf bezi, karaciğer, dalak ve kas dokusu örnekleri) 18 tanesinde (% 2.9) *Salmonella* tespit edilmiştir (Molla ve ark., 2006). Küçükbaş hayvanlara ait Meksika’da yapılmış başka bir çalışmada ise 72 koyun dışkı örneğinin 18 adedinde (% 25) *Salmonella* tespit edilmiştir (Jimenez ve ark., 2011).

Sonuç olarak, çalışmamızda dışkı örneklerinde tespit edilen *Salmonella* prevalans değerleri literatürdeki geniş prevalans değer aralığının içerisinde kalmaktadır. Bununla beraber, çalışmamızca tespit edilen değerler, kesimhanelerde gıda güvenliği uygulamalarının yeterli olmaması sebebiyle bu yerlerin *Salmonella* kontaminasyonuna açık olabileceğini göstermektedir.

4.3 Klinik İnsan İzolatları

Klinik insan örnekleri örnekleme dönemi içerisinde Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi tarafından toplanmıştır. Çalışmaya dahil edilen insan kaynaklı izolatlar, farklı klinik ve polikliniklerden *Salmonella* gastroenteriti, tifo veya paratifo ön tanısı ile laboratuvara gönderilen hastalardan ve Şanlıurfa ili ilçelerinde yapılan rutin sağlık taramaları sonucunda elde edilmiştir. *Salmonella*-pozitif çıkan örneklerin izolatları diğer işlemler için Orta Doğu Teknik Üniversitesi'ne gönderilmiştir. Bahar döneminde 6, yaz döneminde 13 adet olmak üzere 19 adet doğrulanmış *Salmonella* izolatı örnekleme döneminde elde edilmiştir. Çalışma planında amaçlanmış olan 50 adet izolatı elde edebilmek için yine aynı yöreden elde edilen ve aynı hastanede -20°C'de saklanmış olan 31 adet izolat Ankara'ya gönderilmiştir. Bu izolatların Şanlıurfa yöresinden toplanma tarihleri Ağustos 2010 ile Eylül 2011 arasında değişmektedir (Ek 9). Geçmiş tarihlerden toplanan klinik vaka izolatları çalışmamıza dahil olduğundan, prevalans ve *Salmonella*'nın mevsimselliği üzerine çalışılmamıştır. Numunelerin 48'si (%96.3) dışkı, 2'si (%3.7) ise kandan oluşmuştur. Örnek alınan hastaların yaşları 2-82 arasında olup, yaş ortalaması 43.2 olarak tespit edilmiştir. Çalışma grubunu oluşturan toplam 50 hastanın 28'i kadın (%57.4), 22'si (%42.6) ise erkek olarak bulunmuştur. Hastaların 32 (%66.7)'i şehir merkezinde ikamet ederken, 18 (%33.3)'i ilçelerde ikamet etmektedir. Cinsiyet ve kullanılan izolatların kaynağının şehir veya taşra olması ile serotip arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$).

4.4 Gıda izolatları, hayvan ve insan dışkı izolatlarında serotiplendirme

Çalışmamızda fenotipik altiplendirme yöntemi olarak kullanılan serotiplendirme Türkiye Halk Sağlığı Kurumu laboratuvarında yapılmakla beraber, projemizin gıda kaynaklı izolatları içerisinde bir farklı alttür ve 12 farklı serotip, hayvan izolatları içerisinde subsp. *enterica* haricinde 2 farklı alttür ve 13 adet serotip tespit edilmiştir. Klinik insan vakalarından elde edilen izolatlardan 6 farklı serotip bulunmuştur. Bununla beraber, serotiplendirilmesi yapılmış,

fakat serotip sonuçları diğer moleküler alttıplendirme metotlarının (MLST, PFGE) sonuçları ile örtüşmeyen 6 adet gıda kaynaklı *Salmonella* izolatu tekrar serotiplendirme için ilgili laboratuvara gönderilmiş ve ikinci serotiplendirme raporuna göre 3 adet gıda izolatu serotipleri değişmiş ve diğer metot sonuçlarıyla uyumlu hale gelmiştir. Bununla beraber, ilk serotip sonuçları *Salmonella* subsp. *salamae* olarak bildirilen kalan 3 izolat için, laboratuvar faz 2 H antijen solüsyonlarında bazı sorunlar bulunduğunu ve bu örneklerin laboratuvarda tekrardan değerlendirilmeye alındığını belirtmiştir. Ek olarak, 4 adet hayvan izolatu (subsp. *salamae*, serotip Sandiego, Paratyphi B ve Enteritidis) benzer sebeplerden dolayı laboratuvarda tekrar değerlendirilmektedir. Bu izolatlardan ikinci serotip değerlendirme sonucunda serotipi Chester olarak bildirilen 2 izolata dair serotip verisi diğer alttıplendirme sonuçlarıyla oldukça uyumsuz görüldüğünden dolayı bu izolatlar tekrar değerlendirilmek üzere laboratuvara geri gönderilmiştir. En güncel hali ile gıda ve hayvan serotiplendirme sonuçları Tablo 12 ve 13'te verilmiştir.

Tablo 12. Gıda tiplerine göre 59 gıda izolatında serotip dağılımı

Tür	Alt tür	Serotip	Toplam Sayı	İzolat sayısı					
				Siğir kıyma	Koyun kıyma	Tavuk eti	Sakatat	Taze peynir	Urfa peyniri
<i>Salmonella enterica</i>	subsp. <i>enterica</i>	Infantis	15	-	-	14	1	-	-
		Telaviv	13	2	3	-	3	4	1
		Anatum	11	6	5	-	-	-	-
		Montevideo	7	1	1	-	5	-	-
		Reading	2	1	-	-	1	-	-
		Newport	2	1	-	-	1	-	-
		Kentucky	2	1	-	-	1	-	-
		Hadar	1	-	-	-	-	-	1
		Chester	1	-	1	-	-	-	-
		Othmarschen	1	-	1	-	-	-	-
		Typhimurium	1	-	-	-	1	-	-
		Enteritidis	1	-	-	-	1	-	-

subsp. <i>salamae</i>	-	2	1	1	-	-	-	-
Toplam	59	13	12	14	14	4	2	

Gıda örneklerinde (Tablo 12) 59 izolatta 13 farklı serotipin serotiplendirme sonucu elde edilmesi ile Simpson Çeşitlilik İndeksi (SID) 0.846 olarak hesaplanmıştır. Alttür (subsp.) *enterica* haricinde iki izolat *salamae* alttürüne ait çıkmıştır. Alttür *enterica* 12 farklı serotipe ayrılmış, en sık tespit edilen serotip Infantis (%25.4) olmakla beraber bu serotipi Telaviv (22.0 %), Anatum (% 18.6) ve Montevideo (% 11.9) takip etmiştir. Üç ve daha az izolata sahip diğer serotipler ise şunlardır: Reading, Kentucky, Newport, Hadar, Cehster, Othmarschen, Typhimurium ve Enteritidis.

Hayvan örneklerinde serotiplendirme sonuçları (Tablo 13) 53 izolatın 49 tanesinin *Salmonella enterica* subsp. *enterica* kalan 4 izolatın ise *S. enterica* subsp. *diarizonae* (n: 3) ve subsp. *salamae* (n: 1) olduğunu göstermektedir. 49 adet *Salmonella enterica* subsp. *enterica* izolatında 13 farklı serotip tespit edilmiştir. Bu grup izolatlar için, Simpson Çeşitlilik İndeksi (SID) 0.848 olarak hesaplanmıştır. Hayvan izolatlarının % 34.0'sinin serotipinin Montevideo olduğu tespit edilmiştir. Serotip Montevideo hayvan izolatları arasında en sık tespit edilen serotip olmakla birlikte sığır kaynaklı izolatların % 45.5'i ve tavuklardan elde edilen tek örnek bu serotipe aittir.

Tablo 13. Hayvan türlerine göre 53 adet hayvan kaynaklı *Salmonella enterica* izolatının serotip dağılımı

Tür	Alttür	Serovar	Toplam Sayı	İzolat sayısı			
				Sığır	Koyun	Tavuk	Keçi
<i>Salmonella enterica</i>	subsp. <i>enterica</i>	Montevideo	18	15	2	1	-
		Telaviv	8	7	1	-	-
		Kentucky	7	6	1	-	-
		Typhimurium	3	1	2	-	-
		Caracas	2	2	-	-	-
		Chester	2	1	1	-	-
		Newport	2	1	1	-	-

	Poona	2	-	2	-	-
	Sandiego	1	1	-	-	-
	Anatum	1	-	1	-	-
	Enteritidis	1	-	1	-	-
	Hadar	1	-	1	-	-
	Reading	1	-	1	-	-
subsp. <i>diarizonae</i>	-	3	-	2	1	-
subsp. <i>salamae</i>	-	1	1	-	-	-
Toplam		53	33	18	2	-

Sığır ve koyun dışkı izolatları karşılaştırıldığında, koyun grubundaki dağılımın daha eşit dağıldığı gözlemlenmiştir. Koyun grubunda, serotip dağılımları incelendiğinde en çok izolat içeren serotipler Montevideo, Typhimurium ve Poona ve aynı zamanda alttür olan subsp. *diarizonae*'dir. Buna karşın, sığır grubundaki dağılım daha sınırlıdır, sadece üç serotip (Montevideo, Telaviv ve Kentucky) sığır izolatlarının % 84.9'unu (28/30) içermektedir.

İnsan izolatlarında en sık görülen serotip Paratyphi B'dir. Cinsiyet ve kullanılan izolatların kaynağının şehir veya taşra olması ile serotip arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$) olmamasına rağmen Paratyphi B'nin kadınlarda daha sık görüldüğü gözlemlenmiştir ($p<0.05$) (Tablo 14). Kentucky (% 14.3) ve Paratyphi B (% 67.9) serotipleri erkeklere oranla kadınlarda daha çok tespit edilmiştir, buna karşın Typhimurium (% 22.7) ve Enteritidis (%100) ise en çok erkeklerde tespit edilmişti, ancak istatistiksel açıdan bu serotipler ile cinsiyet arasında bir önemli bir ilişki tespit edilmemiştir. ($p>0.05$) (Tablo 14).

Tablo 14. İnsan kaynaklı 50 *Salmonella* izolatında tespit edilen serotiplerinin cinsiyete göre dağılımı.

Serovar	Toplam Sayı	Kadın	Erkek
Paratyphi B	32	19	13
Typhimurium	7	2	5
Kentucky	5	4	1
Enteritidis	2	-	2

Othmarschen	2	1	1
Typhi	2	1	1
Toplam	50	28	22

Sunulan araştırmada ilçelerde sadece serotip Paratyphi'nin görülmesi dikkat çekicidir. Bunun sebebi; ilçelerde tarama sonucu *Salmonella* izolasyonu yapıldığından, dışkı örneklerini veren kişilerin asemptomatik taşıyıcılar olması olabileceği gibi, hijyen şartlarının azlığı nedeniyle, insandan insana bulaşmanın daha fazla olması olabilir. şehir merkezinde görülen serotipler Enteritidis, Kentucky, Othmarschen, Paratyphi B, Typhi ve Typhimuriumdur. Bu Typhi benzeri olmayan serotiplerin insanlara bulaşık gıda yoluyla geçtiği düşünülmektedir.

Gülmez ve ark. (2013) yaptığı bir srveyans çalışmasında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarında 2008-2011 tarihleri arasında izole edilen *Salmonella* numunelerinde en çok tespit edilen ilk üç serotip; Enteritidis (% 61.4), Infantis (% 6.43) ve Typhimurium (% 6.42) olmuştur. Projemizin ıktıları ile Gülmez ve ark. yaptığı kıyaslandığında çalışma ile kıyaslandığında, Ankara ile şanlıurfa ilinlerindeki insan *Salmonella* serotip dağılımlarının çok farklı olduğu görülmektedir. Bunun bir çok nedeni olabilmektedir, ancak günümüzde gelişmekte ülkelerde görülen su ve insandan insana bulaşan Typhi ve Paratyphi B serotiplerinin şanlıurfa'da hala ciddi rahatsızlıklara yol açtığı kesindir.

4.4 Çoklu Alan Sekans Tiplendirmesi (MLST)

Gıda rneklerinde MLST analizi ile elde edilen alt tipler (Tablo 15), serotiplendirme sonucunda çıkan alt tipler ile paralel sonuçlar vermiştir. 59 gıda örneğinde, 10 adet sekans tipi (ST) tespit edilmiştir. SID değerisi ise 0.832 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 15. 59 adet *Salmonella* izolatına ait 10 serotipin gıda tiplerine göre dağılımı

ST	Karşılık Gelen Serotip	Toplam Sayı	Sığır kıyma	Koyun kıyma	Tavuk eti	Sakatat	Taze peynir	Urfa peyniri
32	Infantis	15	-	-	14	1	-	-
1068	Telaviv	13	2	3	-	3	4	1
64	Anatum	11	6	5	-	-	-	-
195	Montevideo	7	1	1	-	5	-	-
93	Reading	2	1	-	-	1	-	-
166	Newport	2	1	-	-	1	-	-
314	Kentucky	2	1	-	-	1	-	-

33	Hadar	1	-	-	-	-	-	1
93	Chester	1	-	1	-	-	-	-
1832	Othmarschen	1	-	1	-	-	-	-
19	Typhimurium	1	-	-	-	1	-	-
195	Enteritidis	1	-	-	-	1	-	-
195	subsp. <i>salamae</i>	2	1	1	-	-	-	-
Toplam		59	13	12	14	14	4	2

Sonuç olarak, MLST gıda örneklerinde serotiplendirmeden daha ayırıcı alt tiplendirme sağlamasa bile serotiplendirmeden daha doğru sonuçlar vermiştir. Bunun en önemli nedeni sonuçlarımızı eş zamanlı olarak 6357 izolat içeren UoW databankasında karşılaştırma yapmamızdır. Chester ve Reading; Enteritidis, subsp. *salamae* ve Montevideo serotipleri arasındaki ST benzerliklerinin serotiplendirme sırasında oluşan hatalarda mı yoksa genetik ilişkilerinden mi kaynaklandığı gelecekteki çalışmalarda ortaya konmalıdır.

Hayvan izolatlarının MLST analizi sonucunda 15 farklı ST tespit edilmiştir (Tablo 16). Gıda izolatlarından farklı olarak, hayvan izolatlarında MLST'nin serotiplendirmeden daha ayırıcı güce sahip olduğu gözlemlenmiştir. MLST, 4 adet serotipte (Montevideo, Kentucky, Newport, Chester) serotip-içi ayırıcıma sağlamıştır.

Tablo 16. 53 adet hayvan kaynaklı *Salmonella* izolatına ait 15 STnin hayvan türlerine göre dağılımı*

Sekans Tipi	Karşılık Gelen Serotip	Toplam Sayı	Sığır	Koyun	Tavuk	Keçi
195	Montevideo	11	9	2	-	-
1068	Telaviv	8	7	1	-	-
138	Montevideo	7	6	-	1	-
1807	Kentucky	6	6	-	-	-
19	Typhimurium	3	1	2	-	-
*	subsp. <i>diarizonae</i>	3	-	3	-	-
812	Poona	2	-	2	-	-
1521	Caracas	2	-	2	-	-
1068	Chester	1	1	-	-	-
93	Chester	1	-	1	-	-
1822	Newport	1	-	1	-	-
31	Newport	1	1	-	-	-

64	Anatum	1	-	1	-	-
11	Enteritidis	1	-	1	-	-
33	Hadar	1	-	1	-	-
1068	Sandiego	1	1	-	-	-
314	Kentucky	1	-	1	-	-
1831	Reading	1	-	1	-	-
195	subsp. <i>salamae</i>	1	1	-	-	-
	Toplam	53	33	16	1	-

*: subsp. *diarizonae* izolatları için *dnaN* bölgesi çoğaltılamamıştır; bu nedenle bu izolatlara ait bir sekans tipi yoktur.

Hayvan izolatları için hesaplanan SID değeri 0.876 olarak bulunmuştur. Bununla beraber, 3 adet subsp. *diarizonae* izolatında MLST ile alt tiplendirme yapılamamıştır. Zira, bu izolatlarda ait *dnaN* geni için PCR ile bantlanma gözlemlenmemiş ve çoğaltma işlemi gerçekleştirilememiştir. Bu izolatlar için farklı primer setleri denenmiş, fakat amplifikasyon yine de yapılamamıştır. Bu izolatların *dnaN* genindeki primer bağlanma bölgelerinde muhtemel bir polimorfizm primerlerin bağlanmasına engel olmuş olabilir. Bu yüzden, bu izolatların daha önce tespit edilmemiş bir alt tip olduğu düşünülmektedir. *dnaN* genine ait alelik tip olmadığı için bu 3 izolatın sekans tipi çıkarılamamıştır. Bu nedenle, bundan sonraki MLST ile ilgili istatistiki verilerde bu izolatlar hariç tutulacaktır.

İnsan izolatları için tıpkı çalışmamızın gıda izolatlarında olduğu gibi MLST analizi serotiplendirmeden daha ayrıştırıcı bir alt tiplendirme ile sonuçlanmamıştır (Tablo 17). İnsan izolatlarında 6 farklı sekans tipi tespit edilmiştir. Bulunan her sekans tipi bir serotip karşılık gelmiştir. İnsan izolatlarında en sık görülen sekans tipi Paratyphi B izolatlarının tamamını kapsayan ST 86'dır. ST 86, insan kaynaklı izolatların % 64'ünü oluşturmakla beraber diğer yaygın sekans tipleri ST 19 (Typhimurium, n: 7) ve ST 314 (Kentucky, n: 5) olarak görünmektedir.

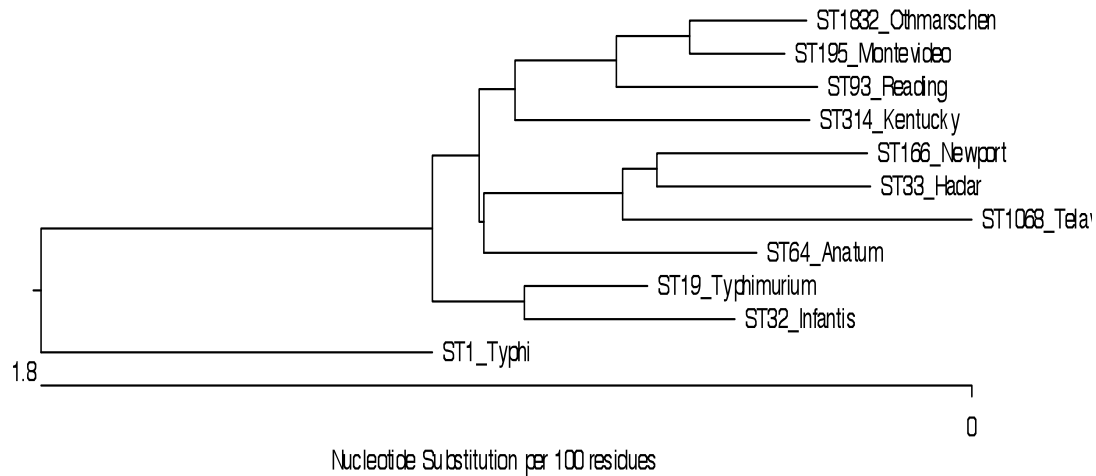
Tablo 17. İnsan kaynaklı *Salmonella* izolatlarına ait sekans tipleri

Serotipleri (Toplam no)	Sekans tipi (ST)
Enteritidis (2)	ST11
Kentucky (5)	ST314

Othmarschen (2)	ST1832
Paratyphi (32)	ST86
Typhi (2)	ST1
Typhimurium (7)	ST19

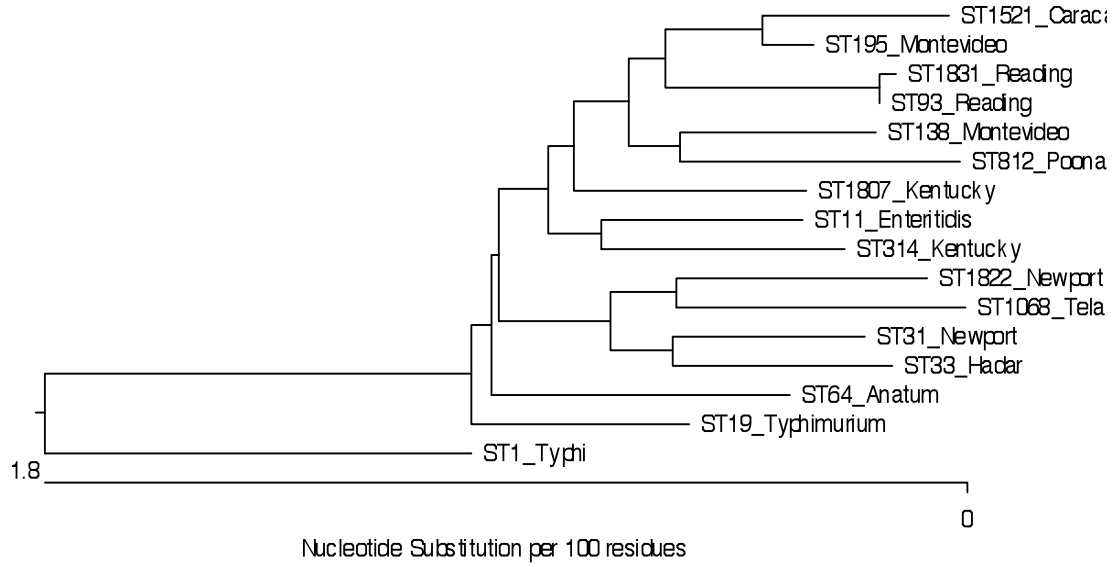
Yapılan bu çalışmamızda MLST analizleri sonucunda, University of Warwick Achtman araştırma grubu tarafından işletilen MLST databankasında sekans bilgileri mevcut olmayan, 4 yeni sekans tipi (ST 1807, ST 1822, ST 1831, ST 1832) ortaya çıkarılmıştır. Bu sekans tiplerine dair bilgiler, kamuya açık ve sürekli yenilenebilir olan bu databankasına girilmiş ve Türkiye'den izole edilmiş izolatlara ait veriler diğer araştırmacılarla paylaşılmıştır.

Farklı alt tiplerin 7 metabolik genine ait DNA nükleotit sıralamasını baz alan MLST metodu, alt tipler arası ilişkinin incelenmesinde, filogenetik ağaçların inşa edilerek suşlar arası akrabalığın gözlemlenmesine olanak sağlamaktadır. Çalışmamızdaki gıda izolatlarında tespit edilen 10 sekans tipine ait filogenetik ağaca, izolatlarımıza hem fenotipik hem genotipik açıdan daha uzak olan serotip Typhi'ye ait ST 1 de ilave edilmiş ve gıda izolatlarına ait sekans tiplerinin teorik evrimsel atasının konumu belirlenmiştir. Şekil 1'deki filogenetik ağaç incelendiğinde, ST 1832 ve ST 195; ST 32 ve ST 19; ST 166 ve ST 33 gibi sekans tiplerinin filogenetik açıdan birbirlerine daha yakın olduğu, aynı en yakın ortak ataya sahip oldukları tespit edilmiştir.



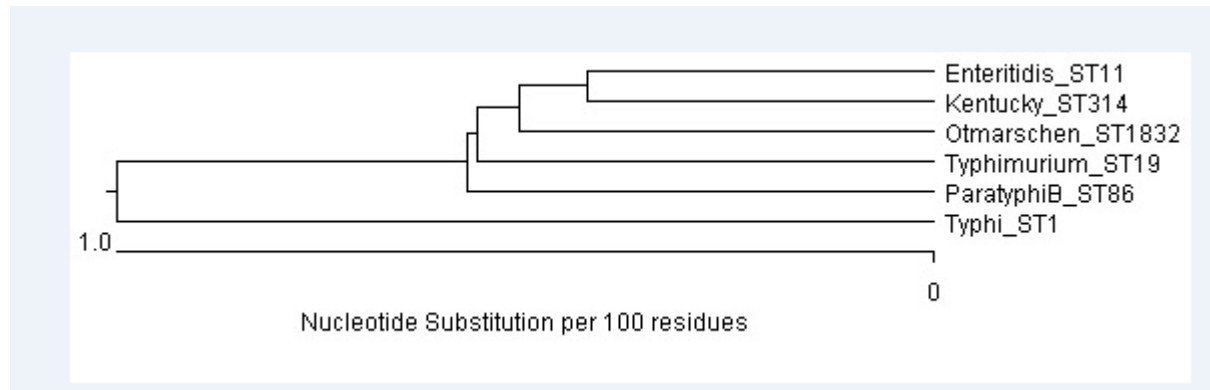
Şekil 1. Gıda kaynaklı izolatlara ait 10 sekans tipinin ST 1 (Typhi) ile köklendirilmiş filogenetik ağacı

Gıda izolatlarına ait filogenetik ağaçla aynı yaklaşımla kurulmuş, hayvan izolatlarına ait ağaç ST 1831 ST 93; ST 1521 ve ST 195; ST 812 ve ST 138; ST 11 ve ST 314; ST 31 ve ST 33; ST 1068 ve ST 1822 arasında daha yakın evrimsel ata varlığına işaret etmektedir (Şekil 2).



Şekil 2 Hayvan kaynaklı izolatlara ait 15 sekans tipinin ST 1 (Typhi) ile köklendirilmiş filogenetik ağacı

İnsan izolatlarına ait filogenetik ağaç, ST 1 zaten insan izolatları arasında bulunduğu için köklendirilmemiştir (Şekil 3). 6 sekans tipinin birbirine yakınlığı incelendiğinde, ST 1'den sonra diğer alt tiplere en uzak akrabalığı olan sekans tipinin serotip Paratyphi B'ye karşılık gelen ST 86 olduğu gözlemlenmektedir.



Şekil 3 İnsan kaynaklı izolatlara ait 6 sekans tipinin filogenetik ağacı

4.4.1 *Salmonella* serotip ve STlerinin kaynak ve coğrafi bölge açısından incelenmesi

Serotip ve ST tiplerini diğer çalışmalarla rahatlıkla karşılaştırabilmekteyiz. Projemizde elde edilen izolatlar ait serotip ve STler incelendiğinde, sonuçlar bazı alt tipler ve kaynakları arasında muhtemel bir ilişkiye işaret etmektedir. Bunlardan en göze çarpanı ise, serotip Infantis (ST 32) izolatları ve tavuk etleri arasındaki bağıntıdır. Çalışmamızda izole edilen 15 Infantis (ST 32) izolatının 14 adedi tavuk eti kaynaklıdır. EFSA tarafından kasaplık tavuklar üzerindeki *Salmonella* varlığına dair yapılmış olan bir çalışma serotip Infantis'in tavuk etlerinde yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir. Örneğin Macaristan, Slovenya ve İsviçre'de izole edilen *Salmonella* izolatlarının sırasıyla % 97.8, % 57.1 ve % 40'ının bu serotype ait olduğu belirtilmektedir (Felício, 2011). Hayvan ve insan kaynaklı örneklerden ise bu alt tipe ait izolatlar elde edilememiştir. Ayrıca, projemizde izole edilen gıda kaynaklı 11 adet serotip Anatum (ST 64) izolatının, 6 adedinin sığır kıyım etinden geri kalan beş adedinin ise koyun kıyım etinden izole edilmiştir. Bu serotype insan izolatları arasında rastlanmazken hayvan izolatları arasında bir adet koyun dışkılarından elde edilmiş Anatum bulunmaktadır. Dolayısıyla, Anatum (ST 64) ve kırmızı et çeşitleri arasında muhtemel bir ilişki olabileceği varsayılmaktadır. Daha önce Ankara'da yapılan bir çalışma da bu serotipin Ankara bölgesindeki sığır mezenterik lenf yumrularında en sık izole edilen serotip olduğunu göstermektedir (Kuplulu, 1995). Ayrıca, hayvan kaynaklı Montevideo (ST 138, ST 195) izolatlarımızın 18 adedinden 15'inin sığırlardan elde edilmiştir. Gıda izolatlarından elde edilen Montevideo (ST 195) izolatlarının yedi adedinden 5 tanesi sığır sakatatlarından izole edilmiştir. Bu durum da bu alt tip ve sığır arasında muhtemel bir ilişkiye dikkat çekmektedir. Son olarak, insan kaynaklı izolatlar arasında Paratyphi B (ST 86) önemli bir yer almaktadır. İnsan kaynaklı izolatlarımızın, % 64'ü bu alt gruba aittir.

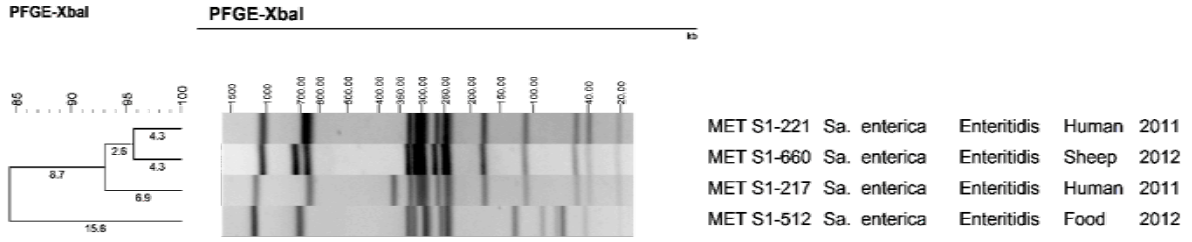
Gıda izolatları arasında, serotip Telaviv, bu serotype dahil olan 13 izolatla, en sık tespit edilen ikinci serotiptir. Diğer sık karşılaşılan alt tiplerden farklı olarak, Telaviv (ST1068) 5 farklı gıda tipinden (koyun ve sığır kıyım, sakatat, Urfa peyniri ve taze peyniri) izole edilen izolatlarda tespit edilmiştir. Hayvan izolatlarında ise, bu alt tip Montevideo (ST 195) alt tipinden sonra, en sık karşılaşılan alt tiptir. Hayvan ve gıda izolatları birlikte ele alındığında, Telaviv (ST 1068) en yaygın alt tip olarak görünmektedir. Bununla beraber, AB ve ABD'deki Typhimurium, Enteritidis gibi serotiplerin yaygın olarak izole edildiği benzer çalışmalara bakıldığında, serotip Telaviv oldukça nadir rastlanılan bir tür olarak görünmektedir. CDC *Salmonella* yıllık rapor tabloları incelendiğinde, bu serotipin 1998 ve 2000'de sadece iki defa insanlardan izole edildiği belirtilmektedir. Avrupa Birliği bünyesinde çalışan 'Gıda ve yem için

hızlı alarm sistemi' (RAFSS) verileri incelendiğinde, bu serotype ait 2003'te 3 adet ve 2011'de ise 1 adet bildirim yapıldığı görülmektedir. Yapılan bu bildirimler ise, sadece Türkiye'den ihraç edilmiş gıda maddelerinden kaynaklıdır. Bizim çalışmamız dışında, Türkiye'de yapılmış bir çalışma, Ankara'da satılan bir sığır kıyma örneğinde bu serotype rastlanıldığı belirtilmiştir. Bizim çalışmamız dışında Telaviv serotipini vurgulayan diğer çalışma ise 300 numunelik sığır dışkısı örnekleri üzerinde Malta, Gozo Adası'nda yapılmış, serotip Telaviv'in 131 *Salmonella* izolatu içerisinde en sık rastlanılan ikinci alt tip olduğu bir çalışmadır (Vella ve Cuschieri, 1995).

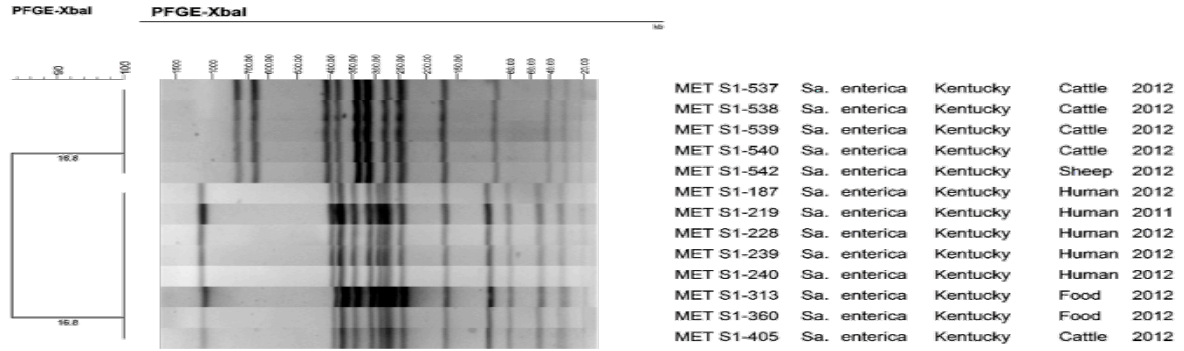
4.5 Vuruşlu Jel Alan Elektroforezi (PFGE)

PFGE sonucu 59 gıda, 54 hayvan ve 50 klinik insan izolatu, yani toplamda 162 izolat için 43 farklı PFGE tipi (PT) bulunmuştur (SID: 0.915) (Ek 13). Gıda izolatları 12, hayvan izolatları 17 ve insan izolatları 6 farklı serotiple temsil edilirken; PFGE jel fotoğrafları göz önüne alındığında gıda izolatları için 18 (Tablo 19, Ek 14), hayvan izolatları için 27 (Tablo 20, Ek 15) ve insan izolatları için 10 (Tablo 21, Ek 16) farklı motif belirlenmiş; PFGE yönteminin serotiplendirme ve MLST yönteminden daha fazla ayırıştırıcı güce sahip olduğu bulunmakla birlikte, en fazla ayrışan izolat kaynağının hayvan izolatları olduğu gözlenmiştir.

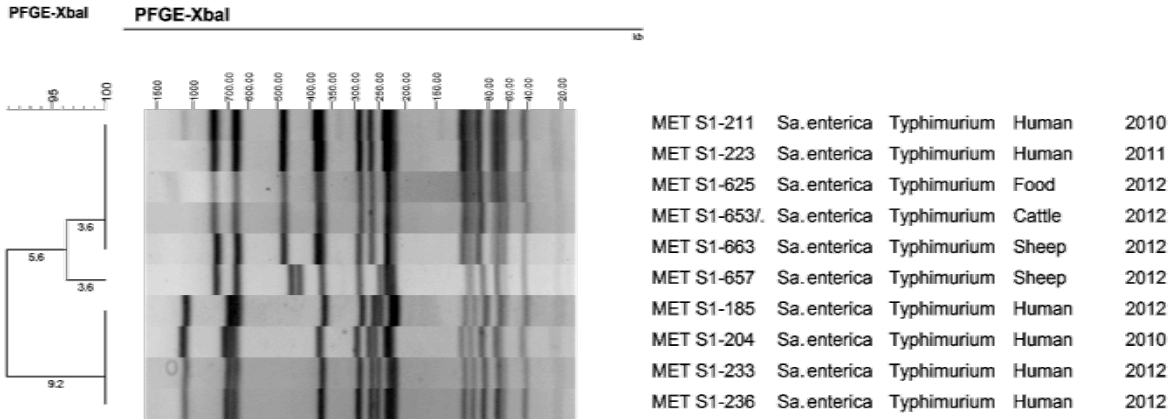
Üç serotip, Enteritidis (n: 4), Kentucky (n: 13) ve Typhimurium (n: 10), 3 kaynak tipinde de (gıda, hayvan ve klinik insan) gözlenmiş; Enteritidis 4 PT'ye, Kentucky 2 PT'ye ve Typhimurium ise 3 PT'ye ayrılmıştır. Serotip Kentucky ve Typhimurium izolatlarında tespit edilen sırasıyla PT10 ve PT13, her 3 kaynaktan da izole edilmiştir. PT 10 motifini 1 adet sığır kıyması ve 1 adet sakatat kaynaklı olmak üzere 2 gıda izolatu (MET S1-313 ve MET S1-360), 1 adet sığır dışkısı (MET S1-405) ve 5 adet klinik insan izolatu (4'ü kadın, 1'i erkek – MET S1-187, MET S1-219, MET S1-228, MET S1-239 ve MET S1-240) paylaşmış; PT13 motifini ise 1 adet sakatat kaynaklı gıda izolatu (MET S1-625), 1 adet sığır ve 1 adet de koyun dışkısı olmak üzere 2 adet hayvan izolatu (MET S1-653 ve MET S1-663) ve 2 adet klinik insan izolatu (1'i kadın, 1'i erkek - MET S1-211 ve MET S1-223) paylaşmıştır (Şekiller 4, 5, ve 6).



Şekil 4 S. Enteritidis'e ait PFGE dendrogramı 4 farklı dala ayrılmıştır.



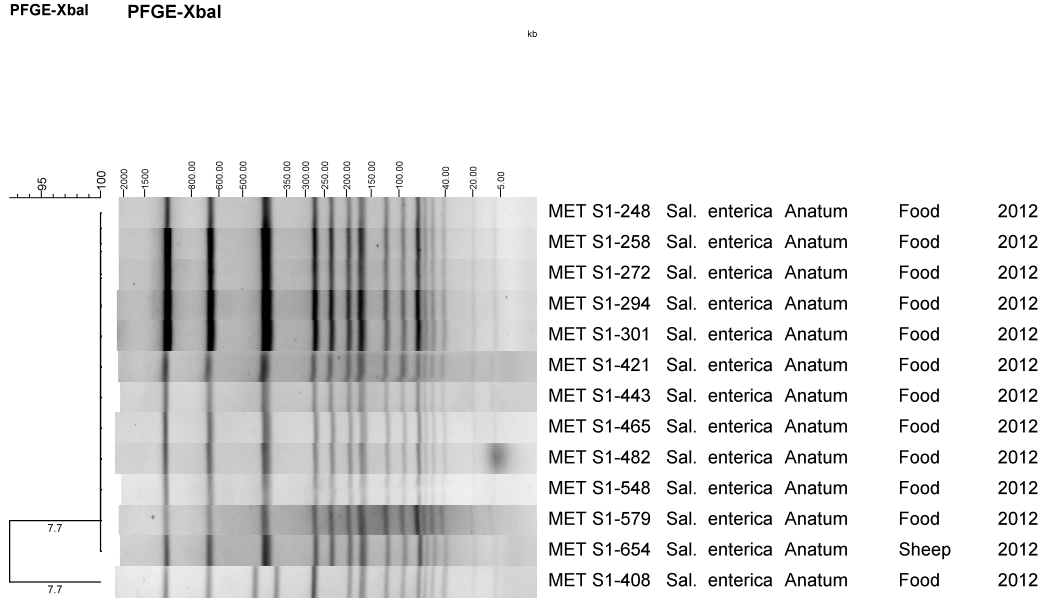
Şekil 5 S. Kentucky serotipini ifade eden izolatların PFGE izleri



Şekil 6. Typhimurium serotipini ifade eden izolatların PFGE izleri

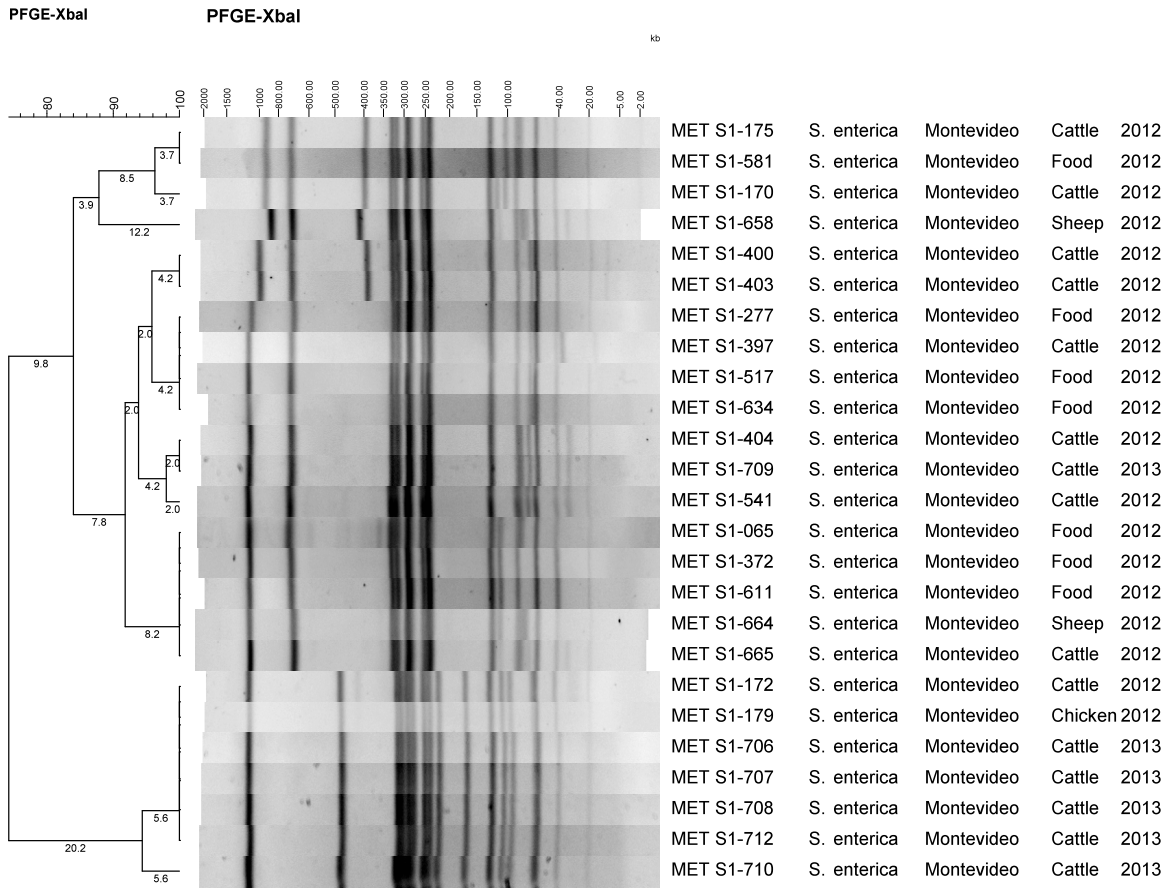
Serovar Sandiego, Anatum, Hadar, Poona ve de subsp. *diarizonae* hariç geri kalan tüm serovarlar ve *enterica* dışındaki alttürler birden fazla PT'ye ayrılmıştır. Sandiego izolat sayısının 1, Hadar ve Poona izolatsayılarının 2 ve subsp. *diarizonae* izolat sayısının 3 olduğu göz önünde bulundurulursa bu serotipler için PFGE'nin ayrıştırma gücünü ve de serotip içi genotip dağılımları için bir çıkarım yapmamızı zorlaştırmaktadır. Ancak 13 adet izolat sayısı bulunan serovar Anatum'un PFGE yöntemiyle daha fazla ayrıştırılamamasının sebebinin bu

serotip için bölgesel çeşitliliğin olmaması ve bu serotipin klonal yapı göstermesi olduğu söylenebilir (Şekil 7).

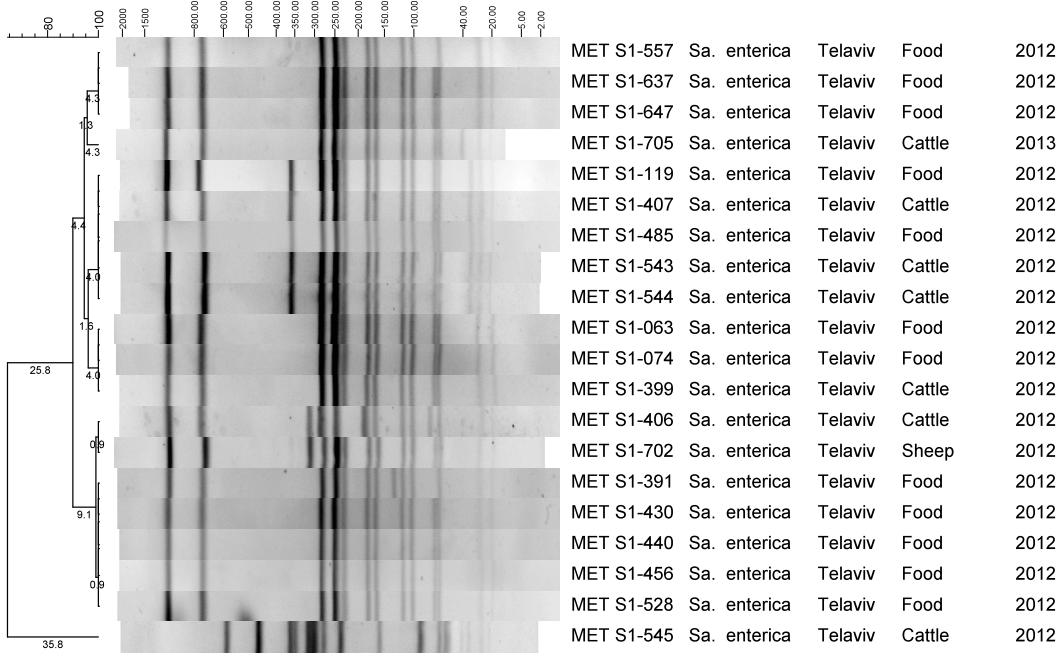


Şekil 7 Serovar Anatum'a ait PFGE dendrogramı

PFGE sonuçlar doğrultusunda elde edilen bir diğer durum ise serovar bazında PFGE ayrışmasının en fazla Montevideo (8 adet PT) (Şekil 8) ve Telaviv'de (6 adet PT) (Şekil 9) olmasıdır. Bu serovarları takiben 4 farklı PFGE izi ile Enteritidis serotipi gelmektedir (Şekil 4).



Şekil 8 Serovar Montevideo'ya ait PFGE dendrogramı



Şekil 9 Serovar Telaviv'e ait PFGE dendogramı

İzolat kaynaklarına göre PFGE ayrıştırma gücü incelendiğinde, en fazla PFGE iz sayısı hayvan izolatları arasında, Montevideo ve Telaviv serovarlari için olmak üzere; Montevideo için 8 adet PT ve Telaviv için ise 5 adet PT bulunmuştur. Gıda kaynakları için de Montevideo, Telaviv ve Infantis en fazla PFGE iz sayısını oluşturmuş; Montevideo için 4, Telaviv ve Infantis içinse üçer adet PFGE izi saptanmıştır. İnsan örnekleri içinse en fazla PFGE iz Paratyphi B serovari için 4 adet olmak üzere bulunmuştur (Tablo 18).

Tablo 18. Serotiplerin MLST için Sekans Tipi (ST), PFGE için PFGE izi (PT) dağılımları

Altür	Serovar	PFGE Types (PTs) of Isolates from*					
		Gıda		Hayvan		İnsan	
		PT	ST	PT	ST	PT	ST
<i>enterica</i>	Anatum (12)	PT 42 (11)	ST 64 (11)	PT 42 (1)	ST 64 (1)	-	-
	Caracas (2)	-	-	PT 1 (1), PT 2 (1)	ST 1521 (2)	-	-
	Chester (3)	PT 17 (1)	ST 93 (1)	PT 17 (1), PT 38 (1)	ST 1068 (1), ST 93 (1)	-	-
	Enteritidis (4)	PT 21 (1)	ST 195 (1)	PT 6 (1)	ST 11 (1)	PT 4 (1), PT 5 (1)	ST 11 (2)
	Hadar (2)	PT 41 (1)	ST 33 (1)	PT 41 (1)	ST 33 (1)	-	-
	Infantis (15)	PT 7 (2), PT 8 (12), PT 9 (1)	ST 32 (15)	-	-	-	-
	Kentucky (14)	PT 10 (2)	ST 314 (2)	PT 3 (6), PT 10 (1)	ST 1807 (6), ST 314 (1)	PT 10 (5)	ST 314 (5)
	Montevideo (25)	PT 21 (3), PT 25 (3), PT 28 (1)	ST 195 (7)	PT 19 (3), PT 20 (1), PT 22 (1), PT 24 (2), PT 25 (2), PT 28 (2), PT 31 (7)	ST 195 (11), ST 138 (7)	-	-
	Newport (4)	PT 40 (2)	ST 166 (2)	PT 11 (1), PT 39 (1)	ST 1822 (1), ST 31 (1)	-	-
	Othmarschen (3)	PT 27 (1)	ST 1832 (1)	-	-	PT 29 (2)	ST 1832 (2)
	Paratyphi B (32)	-	-	-	-	PT 15 (28), PT 16 (4)	ST 86 (32)
	Poona (2)	-	-	PT 18 (2)	ST 812 (2)	-	-
	Reading (3)	PT 32 (2)	ST 93 (2)	PT 43 (1)	ST 1831 (1)	-	-
	Sandiego (1)	-	-	PT 38 (1)	ST 1068 (1)	-	-
	Telaviv* (21)	PT 33 (9), PT 34 (3), PT 36 (1)	ST 1068 (3)	PT 12 (1), PT 33 (2), PT 34 (3), PT 37 (1), PT 38 (1)	ST 1068 (8)	-	-
	Typhi (2)	-	-	-	-	PT 23 (1), PT 26 (1)	ST 1 (2)
Typhimurium (11)	PT 13 (1)	ST 19 (1)	PT 13 (2), PT 14 (1)	ST 19 (3)	PT 13 (2), PT 35 (5)	ST 19 (7)	
<i>diarizonae</i> (3)	-	-	PT 30 (3)	*	-	-	
<i>salamae</i> (3)	PT 21 (1), PT 22 (1)	ST 195 (2)	PT 25 (1)	ST 195 (1)	-	-	

*: dnaN geni çoğaltılmadığı için ST bulunmamaktadır

MLST sonuçları ve PFGE sonuçları karşılaştırıldığında, MLST tarafında ayrıştırılmamış olan Caracas, Chester, Enteritidis, Infantis, Montevideo, Othmarshen, Paratyphi B, Telaviv, Typhi ve Typhimurium, ve alt tür subsp. *salamae* PFGE yöntemiyle en az 2 farklı PFGE izine ayrılmıştır. Kullanılan moleküler alt tiplendirme yöntemleri arasında PFGE yönteminin daha fazla ayrıştırıcı gücü olduğu bulunmuştur (SID: 0.975). Ancak bazı serotipler birden fazla izolata sahip olup, PFGE tarafından bile ayrıştırılmamıştır; bu serotipler Anatum, Hadar ve Poona'dır. Aynı şekilde alt grup diarizonae da PFGE tarafından alt gruplara ayrıştırılmamıştır (Tablo 18).

Oluşturulan dendogramlar incelendiğinde, gıda örnekleri için PT 21 Montevideo, subsp. *salamae* ve Enteritidis arasında; PT 22 ve PT 25 ise subsp. *salamae* ve Montevideo arasında paylaşılan PFGE izleridir. PT 38 ise hayvan dışkı izolatları arasında paylaşılan PT olmakla birlikte Telaviv, Chester ve San Diego serovarlarını içermektedir. Literatürde yakın ilişkili serotiplerin (örneğin Typhimurium ve 4,5,12:i:-, Newport ve Bardo gibi serotipler) aynı ST'ine ve de aynı PFGE izine sahip oldukları bildirilmektedir (Soyer et al., 2010). Ancak bu paylaşımın yanlış serotiplendirmeden mi yoksa bu serotiplerin birbirlerine çok yakın olmalarından dolayı mıdır daha detaylı araştırılması gerekmektedir.

Klinik insan vakaları arasında ise herhangi bir PT paylaşımı olmamıştır. Kaynak sınırlaması olmadan 3 kaynakta da paylaşılan PFGE izleri PT 10 ve PT 13 olduğunu belirtmiştik (Şekiller 5 ve 6). Toplam sekiz adet PFGE izi ise sadece gıda ve hayvan izolatları arasında paylaşılmakta: PT 17, 22, 25, 28, 33, 34, 41 ve 42. Bu PFGE izleri aynı serotipler tarafından ifade edildiği gibi farklı serotipler tarafından da ifade edilmektedir. Örneğin PT 28, PT 34, PT 41, PT 42 ve PT 17 izleri sırası ile Montevideo, Telaviv, Hadar, Anatum ve Chester serotiplerinden tespit edilmişken, PT 21 ve 25 izleri Montevideo ve subsp. *salamae* izolatları arasında paylaşılmıştır (Tablo 18).

Ne gıda ne de hayvan izolatları ile sadece insan izolatlarının paylaştığı bir PFGE izine rastlanmamıştır.

Gıda çeşitlerine, hayvan türlerine ve insan cinsiyetlerine özgü PFGE izlerinin varlığını belirlemek için PFGE izlerinin dağılımları detaylı incelenmiştir (Tablolar 19, 20 ve 21). Tavuk eti ve sakatatından izole edilen Infantis izolatların % 80'ini PT 8 PFGE izine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu PFGE izinin tavuk ve ürünleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Tablo19. PFGE Tiplerinin (PT) 59 Gıda Örneği Üzerine Dağılımı*

PFGE Tipi (PT)	Serotip	Toplam Sayı	İzolasyon sayısı					
			Siğir kıyma	Koyun kıyma	Tavuk eti	Sakatat	Taze peynir	Urfa peyniri
PT 7			-	-	2	-	-	-
PT 8	Infantis	15	-	-	11	1	-	-
PT 9			-	-	1	-	-	-
PT 33			1	3	-	3	2	-
PT 34	Telaviv	13	1	-	-	-	2	-
PT 36			-	-	-	-	-	1
PT 42	Anatum	11	6	5	-	-	-	-
PT 21			-	1	-	2	-	-
PT 25	Montevideo	7	-	-	-	3	-	-
PT 28			1	-	-	-	-	-
PT 21	subsp.	2	-	1	-	-	-	-
PT 22	<i>salamae</i>		1	-	-	-	-	-
PT 32	Reading	2	1	-	-	1	-	-
PT 40	Newport	2	1	-	-	1	-	-
PT 10	Kentucky	2	1	-	-	1	-	-
PT 17	Chester	1	-	1	-	-	-	-
PT 41	Hadar	1	-	-	-	-	-	1
PT 27	Othmarschen	1	-	1	-	-	-	-
PT 13	Typhimurium	1	-	-	-	1	-	-
PT 21	Enteritidis	1	-	-	-	1	-	-
	Toplam	59	13	12	14	14	4	2

Tablo 20. PFGE Tiplerinin (PT) 53 Hayvan Örneği Üzerine Dağılımı*

PFGE Tipi	Serotip	Toplam	İzolasyon sayısı
-----------	---------	--------	------------------

(PT)	Serotip	Sayı	İzolasyon sayısı		
			Sığır	Koyun	Tavuk
PT 19	Montevideo	18	3	-	-
PT 20			-	1	-
PT 22			1	-	-
PT 24			2	-	-
PT 25			1	1	-
PT 28			2	-	-
PT 31			6	-	1
PT 12			Telaviv	8	1
PT 33	2	-			-
PT 34	3	-			-
PT 37	-	1			-
PT 38	1	-			-
PT 3	Kentucky	7	5	1	-
PT 10			1	-	-
PT 13	Typhimurium	3	1	1	-
PT 14			-	1	-
PT 30	subsp. <i>diarizonae</i>	3	-	2	1
PT 1	Caracas	2	-	1	-
PT 2			-	1	-
PT 38	Chester	2	1	-	-
PT 17			-	1	-
PT 11	Newport	2	-	1	-
PT 39			1	-	-
PT 18	Poona	2	-	2	-
PT 38	Sandiego	1	1	-	-
PT 42	Anatum	1	-	1	-
PT 6	Enteritidis	1	-	1	-
PT 41	Hadar	1	-	1	-
PT 25	subsp. <i>salmatae</i>	1	1	-	-
PT 43	Reading	1	-	1	-
Toplam		53	33	18	2

*: Bir küçükbaş dışkı örneğinden izole edilen MET S1- 655 tekrar serotiplendirmeye yollanmıştır.

Tablo 21. PFGE Tiplerinin (PT) 50 Adet Klinik İnsan Cinsiyetlerine Göre Dağılımı

PFGE Tipi (PT)	Serotip	Toplam Sayı	Kadın	Erkek
PT 15	Paratyphi B	32	17	11
PT 16			2	2
PT 4	Enteritidis	2	-	1
PT 5			-	1
PT 23	Typhi	2	-	1
PT 26			1	-
PT 13	Typhimurium	7	1	1
PT 35			2	3
PT 10	Kentucky	5	4	1
PT 29	Othmarschen	2	1	1
	Total	50	28	22

4.6. Antimikrobiyal dirençlilik analiz sonuçları

4.6.1. Disk difüzyon yöntemi ile *Salmonella* izolatlarının incelenmesi

Farklı kaynaklardan elde edilen izolatların fenotipik antimikrobiyal duyarlılık testleri ilk olarak disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Ekler 17 ve 20). *Salmonella* Infantis, en az bir antimikrobiyal ajana dirençlilik gösterdiği için dikkat çekmiştir. Her Infantis serovarı nalidiksik asit ve tetrasikline, ve çoğu da streptomisin ve sulfikzazola dirençli bulunmuştur. İzole edilen tüm gıda kaynaklı serovarlar, amikasin, gentamisin, siprofloksasin, amoksisillin-klavulanik asit, sefoksitin, seftriakzon, seftiofur, imipenem ve ertapenem duyarlılardır. Reading, Othmarschen ve Mikawasima serovarları tüm 19 antimikrobiyal ajana duyarlı bulunmuştur (Tablo 22).

Tablo 22. Disk difüzyon sonuçlarına göre gıda kaynaklı *Salmonella* izolatlarının antimikrobiyal dirençlilik profilleri *

Kaynak (<i>Salmonella</i> pozitif örnek)	Serovar (İzolat sayısı)	Antimikrobiyal dirençlilik profili
Peynir(Taze) (4)	Telaviv (4)	-
Peynir (Urfa) (2)	Hadar (1)	S, N, Amp, T, Kf
	Telaviv (1)	-
Tavuk eti (14)	Infantis (6)	K, S, N, T, Sf
	Infantis (5)	S, N, T, Sf
	Infantis (1)	K, S, N, Amp, T, Sf
	Infantis (1)	K, S, N, Amp, T, Kf,
	Infantis	Sf, Sxt, C
	Infantis (1)	S, N, T
Dana kıyması (n=13)	Anatum (5)	-
	Anatum (1)	S, Sf
	Kentucky (1)	Sf
	Montevideo (1)	-
	Newport (1)	-
	Reading (1)	-
	subsp. <i>salamae</i> (1)	-
	Telaviv (1)	-
Ciğer (n=14)	Enteritidis (1)	-
	Infantis (1)	S, N, T, Sf
	Kentucky (1)	-
	Montevideo (4)	-
	Montevideo (1)	Sf
	Typhimurium (1)	Amp, T
	Newport (1)	-
	Reading (1)	-
	Telaviv (2)	-
	Telaviv (1)	S
Koyun kıyması (n=12)	Anatum (3)	Sf
	Anatum (2)	-
	Montevideo (1)	-
	Othmarschen (1)	-
	Reading (1)	-
	subsp. <i>salamae</i> (1)	Sf
	Telaviv (2)	-
	Telaviv (1)	Sf

* Ak: Amikasin, CN: Gentamisin, K:Kanamisin, S: Streptomisin, Amp: Amfisillin, Eft: Seftiofur, Fox: Sefokzitin, Cro: Seftriakzon, Kf: Sefalotin, Amc: Amoksisillin-klavulanik asit, Etp: Ertapenem, İpm: İmipenem, C: Kloramfenikol, N: Nalidiksik asit, Cip: Siprofloksasin, T: Tetrasiklin, Sxt: Trimetoprim-sulfametoksazol, Sf: Sulfizoksazol

Gıda kaynaklı 6 adet izolatta rastalanan KSNTSf (kanamisin, streptomisin, nalidiksik asit, tetrasiklin, ve sulfizoksazol) ÇİD (çoklu ilaç dirençlilik) profili gıda izolatlarında en çok rastlanan ÇİD profili olmuştur, bunu 6 sayıda izolatta tespit edilen SNTSf profili izlemiştir (Ekler 17-19).

Bu iki ÇİD profili de sadece Infantis serotipli izolatlarda tespit edilmiştir. Tüm Infantis izolatlarında NT dirençliliği gözlenlenmiştir. Almanya'da yapılan benzer bir çalışmada, yine gıda materyallerinden izole edilen *Salmonella*'da antimikrobiyal duyarlılık testleri yapılmış ve streptomisin (%93.7), sulfametakzozol (%92.5), ve tetrasiklin (%80.9) antimikrobiyallerinin bu izolatlarda etkisiz olduğu bulunmuştur (Miko ve ark., 2005). Ve başka bir çalışmada, ABD'de tavuk, hindi, domuz eti, ve kırmızı etten izole edilen örneklerde tetrasiklin (%80.0), streptomisin (%73.0) ve sulfametokzazol (%60.0) dirençliliği gözlemlenmiştir (White ve ark., 2001). Aynı antimikrobiyaller bizim çalışmamızda da gıda kaynaklı *Salmonella* izolatlarında benzer etkiler göstermiştir.

Hayvanlardan izole edilen *Salmonella* izolatlarındaki antimikrobiyal dirençlilik dağılımı, gıda kaynaklı izolatlara göre daha geniştir. Her ne kadar, gentamisin, siprofloksasin, imipenem ve sulfametokzazol-trimetoprim yine *Salmonella* izolatlarında etkili olsa da, beta-laktam grubu antimikrobiyal ajanlara karşı dirençlilik profili gıda kaynaklı izolatlara göre farklılık göstermiş, farklı olarak ertapenem, sefokzisin gibi antimikrobiyallere dirençlilik bulunduğu tespit edilmiştir. Tüm Typhimurium izolatları (3/3) amfisillin ve tetrasikline dirençlilik göstermiştir. Bunun dışında, Enteritidis, Sandiego, Paratyphi B gibi serovarlar, *Salmonella enterica* subsp. *salamae* ve *diarizonae* da araştırılan 19 antimikrobiyal ajana duyarlı olduğu bulunmuştur (Tablo 23).

Tablo 23. Disk difüzyon sonuçlarına göre hayvan kaynaklı *Salmonella* izolatlarının antimikrobiyal dirençlilik profilleri *

Kaynak (<i>Salmonella</i> pozitif örnek)	Serovar (İzolat sayısı)	Antimikrobiyal dirençlilik profili
Büyükbaş (33)	Typhimurium (1)	Ak, S, N, Amp, T, Kf
	Kentucky (6)	-
	Montevideo (9)	-
	Montevideo (2)	Sf
	Montevideo (1)	T, Kf
	Montevideo (1)	Fox, Kf, Etp
	Montevideo (1)	Fox, Kf
	Newport (1)	Sf
	Paratyphi B (1)	-
	Santiago (1)	-
	subsp. <i>salamae</i> (2)	-
	Telaviv (5)	-
	Telaviv (1)	Fox, Kf, Etp
	Telaviv (1)	Sf
	Tavuk (2)	Montevideo (1)
subsp. <i>diarizonae</i> (1)		-
Küçükbaş (18)	Anatum (1)	Ak, S
	Caracas (1)	-
	Caracas (1)	Sf
	Casablanca**	S, Amp, Amc, Kf, Cro, Eft
	Enteritidis (1)	-
	Hadar (1)	S, N, Amp, Amc, T, Fox, Kf, Etp
	Kentucky (1)	K, S
	Montevideo (2)	-
	Newport (1)	-
	Poona (2)	-
	Reading (1)	Sf
	Saintpaul (1)	Amc, Fox, Etp, Kf
	subsp. <i>diarizonae</i> (2)	-
	Telaviv (1)	-
	Typhimurium (1)	S, N, Amp, Amc, T, Sf, C
Typhimurium (1)	Amp, T, Kf	

* Ak: Amikasin, CN: Gentamisin, K: Kanamisin, S: Streptomisin, Amp: Amfisillin, Eft: Seftiofur, Fox: Sefokzitin, Cro: Seftriakzon, Kf: Sefalotin, Amc: Amoksisillin-klavulanik asit, Etp: Ertapenem, İpm: İmipenem, C: Kloramfenikol, N: Nalidiksit asit, Cip: Siprofloksasin, T: Tetrasiklin, Sxt: Trimetoprim-sulfametoksazol, Sf: Sulfizoksazol

** PFGE ve MLST çalışmalarında fark edilen sorunlar nedeniyle yeniden serotiplendirmeye gönderilmiş ve *Salmonella* spp. e ait olmadığı görülmüştür. Diğer çalışmalarda bu nedenle listeden çıkarılmıştır.

Hayvan kaynaklı izolatlarda, gıda kaynaklılardaki gibi, öne çıkan ve çoğu izolatta rastlanılan antimikrobiyal dirençlilik profil sayısı çok azdır. FoxKfEtp profili, büyük baş hayvan dışkılarından izole edilen Montevideo ve Telaviv serovarlarında görülmüştür. FoxKf dirençlilik profiline ise, Montevideo, Telaviv, Hadar ve Saintpaul da rastlanılmıştır. Urfa peynirinden ve koyun dışkısından izole edilen Hadar serovarları aynı antimikrobiyallere dirençlilik göstermişlerdir; SNAmpTKf. Bu ilaçlara ilaveten hayvandan izole edilen Hadar serovarında amoksisilin-klavulanik asit, sefoksisin, ve ertapenem de dirençlilik gözlemlenmiştir.

Genelde, geniş-spektrumlu sefolosporinlere karşı dirençlilik (örneğin; seftiofur ve seftriakzon) *Salmonella*'da son zamanlarda bir artış vardır ve seftriakzon gibi ilaçların ciddi salmonelloziz hastalığının çocuklarda tedavi amaçlı kullanılmasından dolayı bu konu kamu sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir (Rabsch ve ark., 2002). Seftiofur A.B.D.'de veterinerlik amaçlı kullanımlarda tek izne sahip olan geniş-spektrumlu sefolosporindir (Bradford ve ark., 1999). Yalnız, seftiofur-dirençli organizmalar aynı zamanda seftriakzon gibi benzer gruplara dirençli olabilmektedir. Bu grup antimikrobiyal ajanların hayvanlarda kullanımı son zamanlarda araştırma konusu olmuş, ve seftriakzon dirençliliğini geliştirilmesinde ve yayılmasında önemli bir potansiyele sahip olabileceği düşünülmektedir (Alcaine ve ark., 2005).

Klinik insan izolatlarının antimikrobiyal dirençlilik profillerinde, gentamisin, siprofloksazin, seftriakzon, seftiofur, ertapenem ve imipenem dirençliliklerine rastlanılmazken, üç adet *Salmonella* Enteritidis izolatu en az bir antimikrobiyal ajana dirençlilik göstermiştir (Tablo 24).

Tablo 24. Disk difüzyon sonuçlarına göre klinik insan vakalarından izole edilen *Salmonella* izolatlarının antimikrobiyal dirençlilik profilleri *

Kaynak (<i>Salmonella</i> pozitif örnek)	Serovar (İzolat sayısı)	Antimikrobiyal dirençlilik profili	
Erkek (23)	Enteritidis (2)	-	
	Kentucky (1)	Sf	
	Othmarschen (1)	Sf	
	Paratyphi B (9)	Sf	
	Paratyphi B (1)	-	
	Paratyphi B (1)	Fox, Sf	
	Paratyphi B (1)	Fox, Kf, Sf	
	Paratyphi B (1)	Amp, T	
	Paratyphi B (1)	S, Sf	
	Typhi (1)	Sf	
	Typhimurium (1)	Sf	
	Typhimurium (1)	-	
	Typhimurium (1)	N	
	Kadın (29)	Kentucky (3)	Sf
		Kentucky (1)	-
Othmarschen (1)		-	
Paratyphi B (8)		-	
Paratyphi B (8)		Sf	
Paratyphi B (1)		S, Sf	
Paratyphi B (1)		K, S, Sf, Sxt, C	
Paratyphi B (1)		N, Sf	
Paratyphi B (1)		Ak, K, S, Sf, Sxt, C	
Typhi (1)		Sf	
Typhimurium (1)		Sf	
Typhimurium (1)		Amp, T	

* Ak: Amikasin, CN: Gentamisin, K: Kanamisin, S: Streptomisin, Amp: Amfisillin, Eft: Seftiofur, Fox: Sefokzitin, Cro: Seftriakzon, Kf: Sefalotin, Amc: Amoksisillin-klavulanik asit, Etp: Ertapenem, İpm: İmipenem, C: Kloramfenikol, N: Nalidiksit asit, Cip: Siprofloksasin, T: Tetrasiklin, Sxt: Trimetoprim-sulfametoksazol, Sf: Sulfizoksazol

4.6.2 Çoklu ilaç dirençliliği (ÇİD) gösteren izolatların dağılımı

Çoklu ilaç dirençlilikleri (ÇİD) incelendiğinde, farklı kaynaklardan (gıda, hayvan ve klinik insan) bulunan farklı serovarların ve antimikrobiyal ajanların öncülük ettiği görülmüştür (Tablo 25 ve Ek 18). Gıdalardan izole edilen Infantis serovarlarının hepsi ÇİD göstermiş; bu

antimikrobiyal ajanlar da genellikle streptomisin, nalidiksik asit, tetrasiklin ve sulfizokzasol olmuştur. Hayvanlardan izole edilen izolatlarda ise Montevideo ve Typhimurium serovarları dikkat çekmektedir. Montevideo serovarlarında sefalotin dirençliliği çoğunlukla görülürken, Typhimurium serovarlarında tetrasiklin ve amfisillin dirençliliği daha baskındır. Klinik insan vakalarından izole edilen Paratyphi B izolatlarının ÇİD profilleri ise değişiklik göstermekte, ama çoğunda sulfizokzasol dirençliliği bulunmaktadır. Hem gıdadan hem de hayvandan izole edilen 2 Hadar izolatında ise ortak olarak streptomisin, nalidiksik asit, amfisillin, tetrasiklin ve sefalotin dirençliliği göze çarpmaktadır.

linik insan) bulunan *Salmonella* izolatları

İzolat kodu	Serovar	İzolatin kaynağı	Antimikrobiyal ajanlar
MET S1-579	Anatum	Gıda	K, S, Sf
MET S1-654	Anatum	Hayvan	Ak, Sf
MET S1-655	Casablanca	Hayvan	S, Amp, Amc, Kf, CRO, Eft
MET S1-163	Hadar	Gıda	S, N, Amp, T, Kf
MET S1-703	Hadar	Hayvan	S, N, Amp, Amc, T, Fox, Kf, Etp
MET S1-050	Infantis	Gıda	K, S, N, Amp, T, Sf
MET S1-056	Infantis	Gıda	K, S, N, Amp, T, Sf, Kf, Sxt, C
MET S1-088	Infantis	Gıda	K, S, N, T, Sf
MET S1-092	Infantis	Gıda	S, N, T, Sf
MET S1-142	Infantis	Gıda	S, N, T, Sf
MET S1-150	Infantis	Gıda	S, N, T, Sf
MET S1-329	Infantis	Gıda	S, N, T, Sf
MET S1-345	Infantis	Gıda	K, S, N, T, Sf
MET S1-351	Infantis	Gıda	S, N, T, Sf
MET S1-492	Infantis	Gıda	S, N, T
MET S1-498	Infantis	Gıda	K, S, N, T, Sf
MET S1-510	Infantis	Gıda	K, S, N, T, Sf
MET S1-597	Infantis	Gıda	S, N, T, Sf
MET S1-606	Infantis	Gıda	S, N, T, Sf
MET S1-542	Kentucky	Hayvan	K, S
MET S1-706	Montevideo	Hayvan	T, Kf
MET S1-707	Montevideo	Hayvan	Fox, Kf, Etp
MET S1-708	Montevideo	Hayvan	Fox, Kf
MET S1-625	Newport	Gıda	Amp, T,
MET S1-198	Paratyphi B	Klinik İnsan	Fox, Kf, Sf
MET S1-204	Paratyphi B	Klinik İnsan	K, S, Sf, Sxt, C
MET S1-211	Paratyphi B	Klinik İnsan	Amp, T
MET S1-218	Paratyphi B	Klinik İnsan	Ak, K, S, Sf, Sxt, C
MET S1-235	Paratyphi B	Klinik İnsan	S, Sf
MET S1-704	Saintpaul	Hayvan	Amc, Fox, Kf, Etp
MET S1-030	Salford	Gıda	Sf, Sxt
MET S1-223	Typhimurium	Klinik İnsan	Amp, T
MET S1-653	Typhimurium	Hayvan	Ak, S, N, Amp, T, Kf
MET S1-657	Typhimurium	Hayvan	S, N, Amp, Amc, T, Sf, C
MET S1-663	Typhimurium	Hayvan	Amp, T, Kf
MET S1-103	Virchow	Gıda	K, S, N, T, Sf

* Ak: Amikasin, CN: Gentamisin, K: Kanamisin, S: Streptomisin, Amp: Amfisillin, Eft: Seftiofur, Fox: Sefokzitin, Cro: Seftriakzon, Kf: Sefalotin, Amc: Amoksisillin-klavulanik asit, Etp: Ertapenem, İpm: İmipenem, C: Kloramfenikol, N: Nalidiksit asit, Cip: Siprofloksasin, T: Tetrasiklin, Sxt: Trimetoprim-sulfametoksazol, Sf: Sulfizoksazol

** İki veya ikiden fazla antimikrobiyal ajana dirençlilik gösteren izolatlar ÇİD (MDR) olarak kabul edilmiştir.

4.6.3 Minimal inhibisyon konsantre (MİK) yöntemi ile antimikrobiyal dirençliliklerin belirlenmesi

Proje değerlendirme panelistlerinin önerisi üzerine projeye eklenen MİK yöntemi için, ilk olarak sıvı besiyer dilüsyonu tekniği ile çalışılmıştır. Proje bütçesine dahil olmayan Sensititre cihazının (Trek Diagnostic Systems) eksikliğinden dolayı sonuçları okumada sorun yaşanmıştır (Ek 22b-22c). Ayrıca sipariş edilen antimikrobiyal tozların çoğunun ışığa ve neme duyarlı olması, çok düşük konsantrasyonlarda çalışıyor olması sonuçların doğruluğunu etkilemiştir. Bu nedenle önce makro dilüsyon tekniğinden ziyade, mikro dilüsyon tekniği ile, hazır 96 kuyucuklu plakalarda çalışılmaya karar verilmiştir (Ek 22d). Ancak sipariş edilen ilk numunelerle yapılan testlerin disk difüzyon sonuçları ile uyuşmayınca, firma ile görüşülmüş, ve firmanın istediğimiz antimikrobiyal ajanları içeren plakaları göndermediği sonucuna varılmıştır. Firma bazı nedenlerden dolayı istenilen hazır 96 kuyucuklu plakaları 6 ay içinde temin edememiştir. Bu firma bu tür plakaları sağlayan tek firma olduğu için MİK değerlerini belirle için mikro dilüsyon yerine farklı alternatifler aranmıştır. Bu durumda konunun uzmanlarına ulaşılmaya çalışılmış ve Hacettepe Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakterioloji Birim Sorumlusu Prof. Dr. Yakut Akyön Yılmaz'e ulaşılmış ve konu hakkında değerli görüşleri alınmıştır. İkili görüşmeler sonucu E-test yapılmaya karar verilmiştir.

E-testi, toplum sağlığı açısından antimikrobiyal ajanların önem sırasına (4.6.4) ve görülme sıklıklarına bağlı olarak seçilen antibiyotikler üzerinde uygulanmıştır. Bu nedenle ertapenem (Tip 1), amoksisillin-klavulanik asit (Tip 1), trimetoprim-sulfametoksazol (Tip 2), amikasin (Tip 2), amfisillin (Tip 2) ve tetrasiklin (Tip 3) antibiyotikleri, disk difüzyonu ile dirençli bulunmuş *Salmonella* izolatlarında çalışılmıştır. Çalışma sonucunda, tetrasiklin, amoksisillin-klavulanik asit ve amfillin sonuçları disk difüzyon tekniğiyle elde edilen sonuçlarla uyumlu bulunmuştur. Disk difüzyon ile dirençli bulunan izolatların MİK değerleri yine dirençlilik alanındadır (Tablo 26). Trimetoprim-sulfametoksazol sonuçlarında gıdadan izole edilen *Salmonella* izolatında MİK değeri 4/76 mg/L standart dirençlilik konsantrasyonundan fazla olduğu için, yine benzer bir şekilde disk difüzyon sonuçları ile uyumludur, ama insan vakalarından elde edilen izolatlarda benzer sonuçlar elde edilmemiştir. Aynı şekilde, ertapenem ve amikasin sonuçlarında da dirençli izolat bulunmamıştır. Bu nedenle, ileriki çalışmalarda mikro seyreltme tekniği ile çalışılmasına karar verilmiştir, izolatların MİK değerleri yeniden disk difüzyon sonuçları ile karşılaştırılacaktır.

Tablo 25. *Salmonella* izolatlarının seçilen antimikrobiyal ajanlara ilişkin E-test metodu ile belirlenen MİK değerleri

İzolot kodu	Kaynak	Ert	Amc	Sxt	Ak	Amp	T
MET S1-50	Gıda, tavuk eti	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 256 mg/L	≥ 128 mg/L
MET S1-56	Gıda, tavuk eti	Duyarlı	Duyarlı	≥ 32/128 mg/L	Duyarlı	≥ 256 mg/L	≥ 192 mg/L
MET S1-88	Gıda, tavuk eti	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 64 mg/L
MET S1-92	Gıda, tavuk eti	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 32 mg/L
MET S1-103	Gıda, tavuk eti	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 64 mg/L
MET S1-142	Gıda, tavuk eti	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 128 mg/L
MET S1-150	Gıda, sakatat	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 192 mg/L
MET S1-163	Gıda, Urfa peyniri	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 256 mg/L	≥ 32 mg/L
MET S1-204	Klinik insan, yaş:45	Duyarlı	Duyarlı	≥ 0.032/0.6 mg/L	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
MET S1-211	Klinik insan, yaş:34	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 256 mg/L	≥ 32 mg/L
MET S1-218	Klinik insan, yaş: 57	Duyarlı	Duyarlı	0.064/1.2 mg/L	≥ 2 mg/L	Duyarlı	Duyarlı
MET S1-223	Klinik insan, yaş: 2	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 256 mg/L	≥ 48 mg/L
MET S1-329	Gıda, tavuk eti	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 192 mg/L
MET S1-345	Gıda, tavuk eti	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 96 mg/L
MET S1-351	Gıda, tavuk eti	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 128 mg/L
MET S1-492	Gıda, tavuk eti	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 192 mg/L
MET S1-498	Gıda, tavuk eti	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 128 mg/L
MET S1-510	Gıda, tavuk eti	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 192 mg/L
MET S1-597	Gıda, tavuk eti	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 128 mg/L
MET S1-606	Gıda, tavuk eti	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 128 mg/L
MET S1-625	Gıda, sakatat	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 256 mg/L	≥ 24 mg/L
MET S1-653	Hayvan, dana	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 1 mg/L	≥ 256 mg/L	≥ 24 mg/L
MET S1-654	Hayvan, koyun	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 1 mg/L	Duyarlı	Duyarlı
MET S1-657	Hayvan, koyun	Duyarlı	≥ 48/24 mg/L	Duyarlı	Duyarlı	≥ 256 mg/L	≥ 16 mg/L
MET S1-663	Hayvan, koyun	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 256 mg/L	≥ 32 mg/L
MET S1-703	Hayvan, koyun	≥ 0.016 mg/L	≥ 64/32 mg/L	Duyarlı	Duyarlı	≥ 256 mg/L	≥ -
MET S1-704	Hayvan, koyun	≥ 0.032 mg/L	≥ 48/24 mg/L	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
MET S1-706	Hayvan, siğir	≥ 0.006 mg/L	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	≥ 0.75 mg/L

MET S1-707	Hayvan, sığır	≥ 0.047 mg/L	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
------------	------------------	---------------------------	---------	---------	---------	---------	---------

* Ak: Amikasin(Direçlilik sınırı; MIK≥ 64 mg/L), Amp: Amfisillin(Direçlilik sınırı; MIK≥ 32mg/L), Amc: Amoksisillin-klavulanik asit (Direçlilik sınırı; MIK≥ 32/16 mg/L) Etp: Ertapenem(Direçlilik sınırı; MIK≥ 2 mg/L), T: Tetrasiklin(Direçlilik sınırı; MIK≥ 16 mg/L), Sxt: Trimethoprim-sulfametokzasol (Direçlilik sınırı; MIK≥ 4/76 mg/L)

4.6.4 Fenotipik antimikrobiyal sonuçlarının insan sağlığı açısından incelenmesi

İnsanlardaki kullanımının önemine göre kategorize etmiştir. 1. Kategori ilaçlar, ya insanlarda hayati öneme sahip hastalıkların, ya gıda kaynaklı hastalıkların tedavisinde kullanılmakta ya da nadir bir gruba (örneğin; fluorokuinolonlar, glikopeptitler) dâhillerdir. 2. Kategori ilaçlar, potansiyel öneme sahip insan hastalıklarının tedavisinde kullanılmakta olan ama alternatifleri bulunan (örneğin; amfisillin, eritromisin) ilaçlardır. 3. Kategori ilaçlar ise, genelde insan tedavisinde çok az ya da hiç kullanılmayan, ya da insan enfeksiyonlarında ilk tercih edilmeyen (örneğin; iyonoforlar) ilaçlardır.

Bizim çalışmamızdaki fenotipik olarak dirençli bulunan antimikrobiyal ilaçların kategorilere göre sınıflandırılması aşağıdaki tablolar 26, 27 ve 28'de verilmektedir. 1. Kategoriye ait antimikrobiallere gıda-kaynaklı ve klinik insanlardan izole edilmiş *Salmonella* izolatlarında görülmezken, amoksisillin-klavulanik asit, ertapenem, ve seftiofur dirençliliği nedeniyle hayvanlardan izole edilen bazı *Salmonella*'lar 1. Kategoriye ait antimikrobiallere dirençlilik göstermiştir (Tablo 26).

2. kategoriye ait antimikrobiallerden, amikasin ve sefokzidine dirençlilik gıda kaynaklı izolatlarda görülmezken, hayvan-kaynaklı izolatların sırasıyla %11 ve %17'sinde dirençlilik bulunmuştur. Ayrıca, sırasıyla bir ve iki klinik-insan kaynaklı izolat amikasin ve sefokzidine dirençli olarak kaydedilmiştir. Amfisillin dirençliliği her gruptan izole edilmiş izolatta görülmüştür, ama gentamisin dirençliliğine de hiçbirinde rastlanılmamıştır. Kanamisin, nalidiksik asit, ve streptomisin dirençliliği diğer antimikrobiallere göre daha çok tespit edilmiştir. Gıda-kaynaklı izolatlardan tavuk etinde izole edilenlerin çoğu, kanamisine (%52), nalidiksit asit (%100), ve streptomisine (%86) dirençlilik göstermişlerdir. Sefalotin dirençliliği ise hayvan kaynaklı izolatlarda yoğun olarak görülürken, diğer gruplarda rastlanılmamıştır. (Tablo 27)

3. kategori antimikrobiallerin görülme sıklığı, diğer kategorideki antimikrobiallere göre her kaynaktan elde edilen izolatlarda daha çoktur. Sulfonamid dirençliliği her grup *Salmonella* izolatında yüksek oranda görülmüştür ve tetrasiklin, gıda-kaynaklı izolatlarda çok etkili olamamıştır (Tablolar 26, 27 ve 28).

Tablo 26. Gıda kaynaklarından izole edilen *Salmonella* izolatlarının antimikrobiyal kategorilerine göre dağılımları

Kategori	Antimikrobiyaller	Toplam	Tavuk eti	Koyun kıyması	Dana kıyması	Çiğer	Peynir
I	Amc	-	-	-	-	-	-
	Eft	-	-	-	-	-	-
	Cro	-	-	-	-	-	-
	Cip	-	-	-	-	-	-
	Imp	-	-	-	-	-	-
	Ert	-	-	-	-	-	-
II	Ak	-	-	-	-	-	-
	Fox	-	-	-	-	-	-
	Amp	4	2	-	-	1	1
	Cn	-	-	-	-	-	-
	K	8	8	-	-	-	-
	N	20	21	-	-	1	1
	S	17	14	-	-	2	1
	Sxt	1	1	-	-	-	-
	Kf	2	1	-	-	-	1
III	C	1	1	-	-	-	-
	Sf	20	13	4	1	2	-
	T	17	14	-	-	2	1
Tüm antibiyotiklere duyarlı izolat		36	-	8	12	11	5
TOPLAM İZOLAT		59	14	12	13	14	6

* Ak: Amikasin, CN: Gentamisin, K: Kanamisin, S: Streptomisin, Amp: Amfisilin, Eft: Seftiofur, Fox: Sefokzitin, Cro: Seftriakzon, Kf: Sefalotin, Amc: Amoksisillin-klavulanik asit, Etp: Ertapenem, Imp: Imipenem, C: Kloramfenikol, N: Nalidiksit asit, Cip: Siprofloksasin, T: Tetrasiklin, Sxt: Trimetoprim-sulfametoksazol, Sf: Sulfizoksazol

Tablo 27. Hayvan kaynaklarından izole edilen *Salmonella* izolatlarının antimikrobiyal kategorilerine göre dağılımları

Kategori	Antimikrobiyaller	Toplam	Büyükbaş	Tavuk	Küçükbaş
I	Amc	4	-	-	4
	Eft	1	-	-	1
	Cro	-	-	-	-
	Cip	-	-	-	-
	Imp	-	-	-	-
	Ert	4	2	-	2
II	Ak	2	1	-	1
	Fox	3	2	-	1
	Amp	5	1	-	4
	Cn	-	-	-	-
	K	-	-	-	-
	N	3	2	-	1
	S	4	1	-	3
	Sxt	-	-	-	-
	Kf	7	3	-	4

III	C	1	-	-	1
	Sf	10	4	1	5
	T	3	2	-	1
Tüm antibiyotiklere duyarlı izolat		36	25	-	11
TOPLAM İZOLAT		54	33	1	20

* Ak: Amikasin, CN: Gentamisin, K: Kanamisin, S: Streptomisin, Amp: Amfisillin, Eft: Seftiofur, Fox: Sefokzitin, Cro: Seftriakzon, Kf: Sefalotin, Amc: Amoksisillin-klavulanik asit, Etp: Ertapenem, İpm: İmipenem, C: Kloramfenikol, N: Nalidiksit asit, Cip: Siprofloksasin, T: Tetrasiklin, Sxt: Trimetoprim-sulfametoksazol, Sf: Sulfizoksazol

Tablo 28. Klinik insan kaynaklarından izole edilen *Salmonella* izolatlarının antimikrobiyal kategorilerine göre dağılımları

Kategori	Antimikrobiyaller	Toplam	Yaş 0-10	Yaş 10-20	Yaş 20-30	Yaş 30-50	Yaş ≥50
I	Amc	-	-	-	-	-	-
	Eft	-	-	-	-	-	-
	Cro	-	-	-	-	-	-
	Cip	-	-	-	-	-	-
	İmp	-	-	-	-	-	-
	Ert	-	-	-	-	-	-
II	Ak	1	-	-	-	-	1
	Fox	2	-	-	1	1	-
	Amp	2	1	-	-	1	-
	Cn	-	-	-	-	-	-
	K	2	-	-	-	1	1
	N	1	-	-	1	-	-
	S	3	-	-	1	1	1
	Sxt	2	-	-	-	1	1
	Kf	1	-	-	-	1	-
III	C	2	-	-	-	1	1
	Sf	33	1	-	3	19	10

T	2	1	-	-	1	-
Tüm antibiyotiklere duyarlı izolat	14	-	3	2	2	7
TOPLAM İZOLAT	50	2	3	7	21	17

* Ak: Amikasin, CN: Gentamisin, K: Kanamisin, S: Streptomisin, Amp: Amfisillin, Eft: Seftiofur, Fox: Sefokzitin, Cro: Seftriakzon, Kf: Sefalotin, Amc: Amoksisillin-klavulanik asit, Etp: Ertapenem, Ipm: Imipenem, C: Kloramfenikol, N: Nalidiksit asit, Cip: Siprofloksasin, T: Tetrasiklin, Sxt: Trimetoprim-sulfametoksazol, Sf: Sulfizoksazol

4.6.5 Gıda-kaynaklı izolatlarda antimikrobiyal dirençliliğin genetik olarak incelenmesi

36 fenotipik olarak dirençli bulunan gıda kaynaklı *Salmonella* izolatı arasında %61'i aminoglikozit dirençlilik genine, bunların %86'sının da *aadA1* genine sahip olduğu bulunmuştur. Fenotipik olarak aminoglikozit dirençli izolatın hiçbirinde *aadA2* ya da *aacC2* genine rastlanılmıştır. Bu genler streptomisin ve kanamisin ile ilişkilidir. *strA* (%8) ve *strB* (%3) genine sahip izolatlar diğerlerine oranla daha azdır (Tablo 30).

Tablo 29. Gıdalardan izole edilen dirençli *Salmonella* izolatlarının antimikrobiyal dirençlilik genlerinin dağılımı

Dirençlilik geni	Toplam n= 36 (%)	Tavuk eti n=21 (%)	Koyun kıyma n=5 (%)	Dana kıyma n=2 (%)	Ciğer n=5 (%)	Peynir n=1 (%)
<i>aadA1</i>	14	13	-	-	1	-
<i>aadA2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>strA</i>	3	3	-	-	-	-
<i>strB</i>	1	-	-	-	-	1
<i>aacC2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>aphA1-iab</i>	9	9	-	-	-	-
<i>tetA</i>	17	14	-	-	2	1
<i>tetB</i>	-	-	-	-	-	-
<i>tetG</i>	-	-	-	-	-	-
<i>bla_{TEM-1}</i>	4	2	-	-	1	1
<i>bla_{PS13E-1}</i>	-	-	-	-	-	-
<i>bla_{CMY-2}</i>	-	-	-	-	-	-
<i>ampC</i>	-	-	-	-	-	-
<i>sul1</i>	15	13	-	-	2	-
<i>sul2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>dhfrI</i>	-	-	-	-	-	-
<i>dhfrXII</i>	-	-	-	-	-	-

<i>cat1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>cat2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>flo</i>	-	-	-	-	-	-
<i>cmIA</i>	1	1	-	-	-	-
TOPLAM	64	55	-	-	5	3

Bunun dışında *apha_{1-1ab}* geni ile kanamisin dirençliliği arasında kuvvetli bir bağ (%100) bulunmuştur. 23 fenotipik streptomisin dirençli izolatın, 14 tanesinde (%83) *aadA1* geni vardır. Farklı olarak, 3 Infantis izolatının hem *strA* hem de *aadA1* genine sahip olduğu görülürken, *strB* genine sadece Hadar serovarında rastlanılmıştır (Tablo 29).

Tetrasiklin dirençliliği, gıda-kaynaklı *Salmonella* izolatlarında *tetA* geni ile ilişkilendirilmiştir. Her fenotipik olarak dirençli bulunan izolat, *tetA* genine sahip iken, *tetB* ya da *tetG* geni hiç bulunmamıştır (Ek 21).

4 amfisillin dirençliliğine sahip izolatta *bla_{TEM-1}* geni bulunmuştur ama diğer araştırılan genlere; *bla_{PS13E-1}*, *bla_{CMY-2}* or *ampC*, hiç rastlanılmamıştır.

Sulfonamid dirençliliği fenotipik testlerde çoğunlukla görülürken (n=20), bunların 15 tanesinin *sul1* genine sahip olduğu bulunmuştur. 2 tane trimetoprim dirençli izolat (Salford ve Infantis) var iken, araştırılan genler (*dhfrI* and *dhfrXII*) bu izolatlarda bulunamamıştır.

Disk difüzyon sonuçlarına göre bir adet Infantis serovarı kloramfenikole dirençli bulunmuş, genetik çalışmalarda da bu serovarin *cmIA* genine sahip olduğu görülmüştür.

4.6.6 Hayvan-kaynaklı izolatlarda antimikrobiyal dirençliliğin genetik olarak incelenmesi

Aminoglikozit dirençliliği, gıda-kaynaklı izolatlarla karşılaştırıldığında hayvan-kaynaklı izolatlarda daha az bulunmuştur, araştırılan 54 adet izolat arasından, 7 tane fenotipik olarak keşfedilmiş aminoglikozit-dirençli izolat bulunmaktadır. Gıda-kaynaklı izolatlardan yine farklı olarak, hiç *aadA1* geni bulunmamıştır, tam tersine bir izolatta (Typhimurium) *aadA2* geni görülmüştür. 4 adet *strB* geni, streptomisin dirençli izolatlarda bulunmuştur; bu izolatlar 2 Typhimurium, 1 Casablanca ve 1 Hadar serovarından oluşmaktadır (Tablo 31).

5 adet fenotipik olarak tetrasikline dirençli izolat olsa da sadece 2 tanesinde (Typhimurium ve Hadar) *tetA* geni görülmüştür. Gıda-kaynaklı izolatlardaki gibi, *tetB* ve *tetG* genine rastlanılmamıştır.

Beta-laktam grubu antimikrobiyal ajanlara dirençlilik hayvan-kaynaklı gıdalarda çoğunlukla görülmüş ve bu izolatların sadece altı tanesinin *bla_{TEM-1}* ve *bla_{PS13E-1}* genine sahip olduğu bulunmuştur.

Tablo 30. Hayvanlardan izole edilen dirençli *Salmonella* izolatlarının antimikrobiyal dirençlilik genlerinin dağılımı

Dirençlilik geni	Toplam n= 18	Büyükbaş n= 8	Tavuk n=1	Küçükbaş n=9
<i>aadA1</i>	-	-	-	-
<i>aadA2</i>	1	-	-	1
<i>strA</i>	-	-	-	-
<i>strB</i>	4	1	-	3
<i>aacC2</i>	-	-	-	-
<i>apha_{1-iaB}</i>	1	-	-	1
<i>tetA</i>	2	1	-	1
<i>tetB</i>	-	-	-	-
<i>tetG</i>	-	-	-	-
<i>bla_{TEM-1}</i>	5	2	-	3
<i>bla_{PS13E-1}</i>	1	-	-	1
<i>bla_{CMY-2}</i>	-	-	-	-
<i>ampC</i>	-	-	-	-
<i>sul1</i>	1	-	-	1
<i>sul2</i>	-	-	-	-
<i>dhfrI</i>	-	-	-	-
<i>dhfrXII</i>	-	-	-	-
<i>cat1</i>	-	-	-	-
<i>cat2</i>	-	-	-	-
<i>Flo</i>	-	-	-	-
<i>cmlA</i>	-	-	-	-
TOPLAM	15	4	-	11

9 adet sulfonamid dirençli izolatın sadece bir tanesinin *sul1* genine sahip olduğu görülürken, gıdalardan izole edilen *Salmonella* izolatlarındaki gibi diğer genler bulunamamıştır. Bir adet kloramfenikol dirençli izolat olmasına rağmen, araştırılan 4 gen bu izolatta görülmemiştir.

4.6.7 Klinik insan vakalarından izole edilen izolatlarda antimikrobiyal dirençliliğin genetik olarak incelenmesi

İnsan vakalarından elde edilen *Salmonella* izolatlarında bulunan antimikrobiyal gen sayısı ve dağılımı diğer gruplara göre çok azdır (Tablo 31). Fenotipik olarak bulunan toplam 36 dirençli izolatın çoğu sulfonamitlere karşıdır, ama bu izolatların %67'si Paratyphi B'dir. 33 adet sulfonamite dirençli izolat olmasına rağmen sadece 3 tanesinde *sul1* geni bulunmuştur.

Tablo 31 Klinik insan vakalarından izole edilen dirençli *Salmonella* izolatlarının antimikrobiyal dirençlilik genlerinin dağılımı

Dirençlilik geni	Toplam n= 36 (%)	Yaş 0-10 n= 2 (%)	Yaş 20-30 n=4 (%)	Yaş 30-50 n= 20 (%)	Yaş ≥50 n= 10 (%)
<i>aadA1</i>	-	-	-	-	-
<i>aadA2</i>	-	-	-	-	-
<i>strA</i>	-	-	-	-	-
<i>strB</i>	-	-	-	-	-
<i>aacC2</i>	-	-	-	-	-
<i>apha_{1-iab}</i>	1	-	1	-	1
<i>tetA</i>	1	-	-	1	-
<i>tetB</i>	-	-	-	-	-
<i>tetG</i>	-	-	-	-	-
<i>bla_{TEM-1}</i>	4	1	1	2	-
<i>bla_{PS13E-1}</i>	-	-	-	-	-
<i>bla_{CMY-2}</i>	-	-	-	-	-
<i>ampC</i>	-	-	-	-	-
<i>sul1</i>	3	1	-	2	-
<i>sul2</i>	-	-	-	-	-
<i>dhfrI</i>	-	-	-	-	-
<i>dhfrXII</i>	-	-	-	-	-
<i>cat1</i>	-	-	-	-	-
<i>cat2</i>	-	-	-	-	-
<i>Flo</i>	-	-	-	-	-
<i>cmIA</i>	-	-	-	-	-
TOPLAM	9	2	2	5	1

Beta-laktam grubu ilaçlara (amfisillin, sefokzitin, ve sefalotin) dirençlilik gösteren izolatların *bla_{TEM-1}* genine sahip olduğu görülmüştür. 4 adet aminoglikosit dirençli izolatın, bir tanesi *apha_{1-iab}* genine sahiptir. Araştırılan kloramfenikol grubu genlere sahip bir izolat bulunmazken, aslında fenotipik olarak dirençli bulunan iki izolat vardır.

4.6.8 *Salmonella* izolatlarının fenotipik ve genetik antimikrobiyal profillerin uyumu

Elde edilen fenotipik ve genetik antimikrobiyal sonuçlarının uyumunu görmek için Kappa istatistik değerleri ölçülmüştür (Tablo 32). Aminoglikozit, beta-laktam ve tetrasiklin gruplarının fenotipik ve genetik sonuçları arasında iyi bir uyum bulunmuştur ($\kappa \geq 0.9$). Bu sonuçlar, fenotipte dirençliliğe neden olan genlerin çoğunun bu çalışmada araştırılan genler dizisinde bulunduğunu göstermektedir. Ama, kloramfenikol ve sulfonamit/trimetoprim grupları için aynı sonuç bulunamamış, zayıf bir uyum görülmüştür ($\kappa \leq 0.4$). Bunun nedeni ise çok az izolatta *cmIA* ve *sul1* genlerinin bulunmasıdır. Ayrıca dört adet trimetoprime dirençli izolat olmasına rağmen, araştırılan *dhfrI* ve *dhfrXII* genlerine sahip izolata hiç birine çalışmamızda rastlanılmamıştır.

Tablo 32. Genetik ve fenotipik antimikrobiyal dirençlilik profillerinin uyumu

Antimikrobiyal grup	Gıda (Kappa ¹)	Hayvan(Kappa)	İnsan (Kappa)	Toplam(Kappa)
Aminoglikozit genotip ²	16 (0.96)	4 (0.73)	2 (0.79)	22 (0.90)
Aminoglikozit fenotip	17	6	3	26
β -laktam genotip	5 (1.00)	6 (0.67)	4 (1.00)	15 (0.89)
β -laktam fenotip	5	9	4	18
Tetrasiklin genotip	17 (1.00)	2 (0.49)	1 (0.65)	26 (0.90)
Tetrasiklin fenotip	17	5	2	30
Sulfonamit genotip	15 (0.80)	1 (0.11)	3 (0.00)	18 (0.31)
Sulfonamit fenotip	20	9	36	65
Trimetoprim genotip	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Trimetoprim fenotip	1	0	2	4
Kloramfenikol genotip	1 (1.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.39)
Kloramfenikol fenotip	1	1	2	4
Kuinolon genotip ³	-	-	-	-
Kuinolon fenotip	16	3	2	28

¹ Cohen'in kappa katsayısı iki değerleyici arasındaki karşılaştırmalı uyuşmanın güvenilirliğini ölçen bir istatistik yöntemidir, 0 değerine yaklaştıkça uyum olmadığı sonucuna varılırken, değer 1 e yaklaştıkça değerler için tam bir uyum vardır.

² Dirençlilik fenotipi; streptomisin, kanamisin ya da amikasinine karşı, ve araştırılan genler *deaadA1/2*, *strA/B*, or *aphA_{1-1ab}*'dir.

³ Kuinolone dirençliliğin genetik olarak araştırılması çalışma kapsamında değildir.

Çalışmamızda araştırılan dirençlilik genleri seçilirken dikkate alınan unsurlarından biri literatürdeki en çok araştırılması bir diğeri de, fenotipik olarak ilişkilerinin kanıtlanmış

olmasıdır. Ayrıca bu genler FDA'ye bağlı bir program olan, Ulusal Antimikrobiyal Dirençlilik İzleme Sistemi'nin (National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS)) *Salmonella*'da çoğunlukla bulunan antimikrobiyal dirençlilik genleri listesinden temin edilmiştir. Ama bizim araştırmamız sonucunda, bu genlerin bazıları, örneğin *aacC2*, *tetB*, *tetG*, *bla_{CMY-2}*, *ampC*, *sul2*, *dhfrI*, *dhfrXII*, *cat1*, *cat2*, ve *flo* genlerine sahip hiç bir izolat bulunmamıştır. A.B.D. 'de 2004 yılında insanlar ve sığırlardan izole edilen *Salmonella*'da antimikrobiyal dirençlilik profilleri farklılıkları üzerine yapılan bir araştırmada, izolatların %50'sinde *bla_{CMY-2}* veya *ampC* genleri bulunurken, bizim çalışmamızda bu genler araştırılmasına rağmen bulunamamıştır. Ayrıca bahsedilen çalışmada, izolatların %56'sı *flo* genine sahip, ve çoğu aminoglikozit dirençliliği *strA* ve *strB* geni ile alakalı bulunurken (Soyer ve ark., 2013), Türkiye'de gerçekleştirdiğimiz çalışmamız, Amerika'da bulunan genetik profille uyum sağlamamıştır. Başka bir çalışmada ise A.B.D'den ve Çin Halk Cumhuriyetindeki perakende satılan etlerden izole edilen *Salmonella* izolatlarının antimikrobiyal dirençlilikleri karşılaştırılmış ve genlerin varlığının coğrafik olarak değiştiği vurgulanmıştır. Örneğin, Amerika izolatları beta-laktam dirençlilik gösterenlerin çoğu *bla_{CMY-2}* genine sahipken, Çin izolatlarında bu gene rastlanılmamış, bu gen yerine çoğunlukla *bla_{TEM-1}* geni görülmüştür. Ayrıca benzer şekilde Çin'den izole edilen *Salmonella* izolatlarında kloramfenikol dirençliliği bulunsa bile *flo* geni bulunmamıştır (Chen ve ark., 2004). Danimarka'da gerçekleştirilen farklı bir çalışmada da, *Salmonella* Typhimurium DT104'deki beta-laktam dirençliliği *pse-1* geni ile alakalandırılmıştır (Sandvang ve ark., 2006). Bu çalışmalar göstermektedir ki, *Salmonella* izolatlarındaki antimikrobiyal dirençlilik genlerinin varlığı ve çeşitliliği coğrafik olarak değişiklik gösterebilmektedir ve araştırdığımız bazı genlerin bulunmamasının nedeni bununla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda, antimikrobiyal dirençlilik genleri tifoidal olmayan *Salmonella* izolatları için seçilmiştir ve bu da klinik insan vakalarından izole edilmiş *Salmonella* izolatlarında gördüğümüz düşük fenotipik-genetik uyumun nedeni olabilir. Çünkü insanlardan elde ettiğimiz çoğu izolat Paratyphi B serovarına sahiptir. Ve sonuç olarak sulfonamid dirençliliği disk difüzyon sonuçlarında çok yoğun olarak görülürken, tifoidal olmayan *Salmonella*'lara özgü genler *sul1/2* bu izolatlarda çok nadir bulunmuştur.

Fenotipik sonuçlarda, 41 adet ÇİD (çoklu ilaç dirençliliği) ne sahip *Salmonella* izolatı vardır, ama moleküler karakterizasyon sonuçlarında görülmüştür ki, bunların %68'si yine ÇİD genotipine sahiptir (Ek 15). Projemizin sonuçları antimikrobiyal dirençliliğin ve gen varlığının izolat kaynağına, serovara ve coğrafik koşullara göre değişebileceğini göstermiştir. Bu konuda ileride daha kapsamlı bir çalışma yapılması, sadece antimikrobiyal dirençlilik üzerine araştırma yapılması gerekmektedir.

5. SONUÇLAR

192 gıda örneğinin 59'unda (% 30.1) *Salmonella* saptanmıştır. *Salmonella* prevalansı gıda tipine göre büyük değişiklik göstermekle birlikte en yüksek prevalans tavuk eti ve sığır sakatatı örneklerinde tespit edilmiştir. Her iki gıda tipinde, toplamda 24 örnekten 14 tanesinde (% 58.3) *Salmonella* tespit edilmiştir. Baskın serovarlar Infantis (n: 15), Telaviv (n: 13) ve Anatum (n: 11) olarak belirlenmiştir. Toplanan 355 hayvan dışkı örneğinin 53 adedinde (% 14.9) *Salmonella* tespit edilmiştir. Hayvan tipine göre sığır dışkı örneklerinde *Salmonella* yüzdesi en fazla olup % 31.4 hayvan dışkı örneğinde *Salmonella* varlığına saptanmıştır. 15 adet izolatu sığır dışkısından elde edilmiş serovar Montevideo (n: 18), hayvan dışkı örneklerinde en fazla tespit edilen serovardır. Klinik insan vakalarından elde edilen izolatlar içinde Paratyphi B, elde edilen izolatların (n: 50) 32 tanesinde görülmüştür (% 64.0).

MLST analizi, hayvan örnekleri için serotiplendirmeden daha ayırıcı alt tiplendirme sağlamıştır. MLST analizi sonucu gıda izolatlarında 10 Sekans Tipi (ST), hayvan izolatlarında 15 ST ve insan klinik vakalarından elde edilen izolatlarda ise 6 farklı ST bulunmuştur. Yapılan MLST analizleri sonucunda, University of Warwick Achtman araştırma grubu tarafından işletilen MLST databankasında sekans bilgileri mevcut olmayan, 4 yeni sekans tipi (ST 1807, ST 1822, ST 1831, ST 1832) ortaya çıkarılmıştır; bu türlerin Türkiye'ye özgü ST'leri olabileceği düşünülmektedir.

PFGE analizinin, tüm *Salmonella* kaynakları için serotiplendirme ve MLST analizinden daha ayırıcı bir güce sahip olduğu bulunmuştur. Gıda izolatlarında 18 PFGE izi (PT) bulunurken, hayvan ve klinik insan vakalarından sırasıyla farklı 27 ve 10 PT elde edilmiştir. Serovar Kentucky'de kaydedilen PT10 ve Typhimurium'daki PT13, hayvan dışkı, insan klinik vakalarından ve de gıda örneklerinden, başka bir deyişle projemizde çalışılan üç kaynaktan da izole edilmiştir. MLST tarafında ayırtılamamış olan birden fazla izolat içeren serotipler Caracas, Chester, Enteritidis, Infantis, Montevideo, Othmarshen, Paratyphi B, Telaviv, Typhi ve Typhimurium, ve alt tür subsp. *salamae* PFGE yöntemiyle en az 2 farklı PFGE izine ayrılmıştır. Serovar Anatum ise sadece antimikrobiyal dirençlilik testi ile farklı profillere ayırtılabilmektedir.

Antimikrobiyal dirençliliği belirlemek için, fenotipik ve genetik metodlar uygulanmıştır. Disk difüzyon sonuçlarına göre, izolasyon kaynağına göre (gıda, hayvan ve insan), dirençlilik profillerinin değiştiği gözlemlenmiştir. Örneğin, gıda-kaynaklı *Salmonella* izolatlarında çoğunlukla aminoglikozit, tetrasiklin ve kuinolonlara karşı dirençlilik bulunurken, hayvan-kaynaklı izolatlarda farklı beta-laktam grubu antimikrobiyal ilaçlara dirençlilik göze

çarpmaktadır. İnsanlardan elde edilen *Salmonella* izolatlarında çoğunlukla sulfonamitlere karşı dirençlilik görülmüştür. Gıdalardaki dirençlilik profilleri detaylı olarak incelendiğinde, çokluilaç dirençlilik profili gösteren çoğu izolatin tavuk kaynaklı olduğu ve Infantis serovarına ait olduğu dikkat çekmektedir. Bunun dışında farklı kaynaklardan (peynir/gıda ve koyun/hayvan) izole edilen *Salmonella* Hadar'ın aynı antimikrobiallere (streptomisin, nalidiksik asit, amfisillin, tetrasiklin and sefalotin) dirençlilik gösterdiği görülmüştür. Ama Hadar izolatlarından farklı olarak Typhimurium izolatlarında, insandan ve hayvandan izole edilenler farklı sonuçlar vermiştir. Örneğin, insanlardan izole edilen Typhimurium izolatlarında çokluilaç dirençliliği hiç görülmezken, hayvanlardan izole edilen 3 aynı serovara ait izolatta amfisillin, tetrasiklin and sefalotin dirençliliği birlikte görülmüştür.

Antimikrobiyal dirençlilik profillerinin, genetik analizleri sonucunda da, dirençlilik genlerin kaynaklara göre değiştiği görülmüştür. Örneğin aminoglikozit dirençliliği gıda-kaynaklı *Salmonella* izolatlarında genellikle *aadA1* geni ile ilişkiliyken, hayvan-kaynaklı izolatlarda *strA/B* genleri ile alakalı olduğu tespit edilmiştir. Tetrasiklin dirençliliği her grup izolatlarda *tetA* geni ile ilişki olduğu görülürken, *tetB* ve *tetG* genlerine hiç rastlanılmamıştır. Sulfonamit dirençliliği gıda ve hayvan kaynaklı *Salmonella* izolatlarında *sul1* geni ile oluştuğu görülürken, insan kaynaklı izolatlarda fenotipik olarak çok fazla sulfonamit dirençliliği gözlemlense de, araştırılan hiç bir gen tespit edilememiştir. Bunun nedeni de, tifo olmayan *Salmonella* izolatları için seçilen genlerin çoğu Paratyphi B serovarına sahip insan izolatlarında bulunmamasıdır. Tüm izolatlarda, *aacC2*, *tetB*, *tetG*, *bla_{CMY-2}*, *ampC*, *sul2*, *dhfrI*, *dhfrXII*, *cat1*, *cat2*, ve *flo* genlerine rastlanılmamıştır. Sonuç olarak, dirençlilik genlerinin farklı kaynak, serovara göre ayrıca farklı coğrafyalarda değişebileceği görülmüştür.

Çalışmamız, Türkiye'den izole edilen *Salmonella* izolatlarını fenotipik ve genetik araştırmalar sonucunda, Türkiye'ye özgü sekans tiplerini ve Türkiye'deki *Salmonella* çeşitliliğini hem alt-tiplendirme hem de antimikrobiyal metodlarla sunması açısından önemli bir çalışma olmuştur. Elde edilen sonuçlar, Türkiye'ye özgü ulusal ve kullanıcı-girişli bir databankasından ulaşılabilen ve bu da çalışmanın devamlılığı ve kalıcılığı için olumlu bir gelişme sunmaktadır.

Çalışma süresince, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Veterinerlik Fakültesi'nin yanında, Cornell Üniversitesi ile de işbirliği olumlu ve yararlı bir şekilde yürütülmüş, çoklu-işbirlikli bir çalışma ortaya konmuştur.

Elde edilen sonuçların iki makale halinde yayınlanması planlanmaktadır.

Çalışmamız sonrasında tespit ettiğimiz sonuçlar neticesinde ileride yapılabilecek çalışmalar aşağıdaki gibidir:

1. Bu proje ile Şanlıurfa yöresinden izole edilen *Salmonella* izolatlarının fenotipik ve genetik antimikrobiyal profiller bulunmuştur. Yalnız, bulunan genlerin hangi özgün antimikrobiyal ajanlara etkili olabileceği bilinmemektedir. Bu nedenle, *Salmonella* bünyesindeki dirençlilik genlerin fenotipik yapısına etkisi araştırılması gelecek çalışmalar için önemli olacaktır.
2. Araştırmamız dahilinde, nadir görülen serovarlar tespit edilmiş, ama bunların patojenik etkisi literatürde bulunamamıştır. Çalışmamızda görülen, Othmarschen, Poona, Caracas, Sandiego vb. serovların patojenik etkisinin incelenmesi Klinik ve Veteriner Mikrobiyoloji açısından değerli bir çalışma olacaktır.
3. Türkiye'ye özgü olabilecek sekans tipleri, MLST analizi ile bulunmuş ve ST'lere sahip izolatların incelenmesi *Salmonella* evrimi ve çeşitliliği konusunda ışık tutabileceğinden dolayı, araştırılması gerekmektedir.
4. Tavuklardan izole edilen *Salmonella* izolatlarının çoğu çokluilaç dirençliliği profili sergilemiş ve bu nedenle de dikkatleri üzerine çekmiştir. İleride tavukçuluk sektörü ile iletişime geçerek, bu soruna çare bulunması ve nedeninin araştırılması toplum sağlığı açısından önem arz etmektedir.

6. REFERANSLAR

Aarestrup, F. M., Hendriksen, R. S., Lockett, J., Gay, K., Teates, K., McDermott, P. F.,... Gerner-Smidt, P. 2007. "International spread of multidrug-resistant *Salmonella* schwarzengrund in food products", *Emerging Infectious Diseases*, 13(5).

Achtman, M., Wain, J., Weill, F.X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M.G., Hale, J.L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L.H., Brisse, S. ve S. *enterica* MLST Study Group. 2012. "Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*." *PLoS Pathog.* 8, e1002776.

Akkaya, L., Atabay, H. İ., Gök, V., Yaman, H. 2012. "Prevalence of *Salmonella* in edible offal in Afyonkarahisar province, Turkey", *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 18(4), 613–616.

Alcaine, S. D., Y. Soyer, Y., L. D. Warnick, L. D., W. L. Su, W. L., S. Sukhnanand, S., J. Richards, J., E. D. Fortes, E. D., P. McDonough, P., T. P. Root, T. P., N. B. Dumas, N. B., Y. Grohn, Y. veand M. Wiedmann, M. 2006. "Multilocus Sequence Typing Supports the Hypothesis that Cow- and Human-Associated *Salmonella* Isolates Represent Distinct and Overlapping Populations", *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(12),: 7575-7585.

Alcaine, S. D., Sukhnanand, S. S., Warnick, L. D., Su, W. -L., McGann, P., McDonough, P. Wiedmann, M. 2005. "Ceftiofur-resistant *Salmonella* strains isolated from dairy farms represent multiple widely distributed subtypes that evolved by independent horizontal gene transfer", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49(10), 4061-4067.

Anonymous Swedish Travel and Tourist Data Base, TDB. Resurs AB, Sweden, 1997–2003. www.resursab.se/

Barrett, T. J., Lior, H., Green, J. H., Khakhria, R., Wells, J. G., Bell, B. P., Greene, K. D., Lewis, J. ve Griffin, P. M.1994. "Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing", *J. Clin. Microbiol.*, 32(12), 3013-3017.

Bradford, P. A., Petersen, P. J., Fingerman, I. M., White, D. G. 1999. "Characterization of expanded-spectrum cephalosporin resistance in *E. coli* isolates associated with bovine calf diarrhoeal disease", *J. Antimicrob. Chemother.*, 44(5), 607-610.

Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe R. ve Swaminathan, B. 2000. “*Salmonella* nomenclature - Guest commentary”, *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2465-2467.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2005. “Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—10 sites, United States, 2004”, *MMWR* 54,352–356.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2010. “Surveillance for foodborne disease outbreaks- United States, 2007”, *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 973-979.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2014. “Highlights of 2013 FoodNet trend data”, *CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States*.

Chen, P. L., Lee, H. C., Lee, N. Y., Wu, C. J., Lin, S. H., Shih, H. I., & Chang, C. M. 2012. “Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia in elderly patients: an increased risk for endovascular infections, osteomyelitis and mortality”, *Epidemiology and Infection*, 140(11), 2037–44.

Chen, S., Zhao, S., White, D.G., Schroeder, C. M., Lu, R., Yang, H., McDermott, P.F., Ayers, S., ve Meng, J. 2004. “Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail markets”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(1), 1-7.

Ciftci, E., Guriz, H., Derya Aysev, A., Ince, E., Erdem, B. ve Dogru, U. 2004. “*Salmonella* bacteraemia in Turkish children:n: 37 cases seen in a university hospital between 1993 and 2002”, *Ann. Trop. Paediatr.*, 24(1), 75-80.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2002. “Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved atandard—second edition, 22, ISBN 1-56238-461-9.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2013. ”Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement, 33, ISBN 1-56238-865-7.

Çetinkaya, F., Cibik, R., Soyutemiz, G.E., Ozakın, C., Kayalı, R., Levent, B. 2008. “*Shigella* and *Salmonella* contamination in various foodstuffs in Turkey”, *Food Control*, 19, 1059–1063

Davis, M. A., Besser, T. E., Eckmann, K., MacDonald, K., Green, D., Hancock, D. D., Baker, K. N., Warnick, L. D., Soyer, Y., Wiedmann, M. ve Call, D. R. 2007. “Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium, Pacific Northwest, United States”, *Emerg. Infect. Dis.*, 13(10), 1583-6.

EFSA (European Food Safety Authority). 2010. "The community summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008", EFSA Journal, 8(7), 1658-1919.

EFSA (European Food Safety Authority). 2013. "The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic indicator bacteria from humans, animals and food in 2011", EFSA Journal, 11, 3196.

EFSA (European Food Safety Authority). 2014. "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012", EFSA Journal, 12, 3547.

Erdem, B., Ercis, S., Haşçelik, G., Gur, D. ve Aysev, A. D. 2005a. "Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* group C strains isolated from humans in Turkey, 2000-2002", Int. J. Antimicrob. Agents., 26(1), 33-37.

Erdem, B., Ercis, S., Haşçelik, G., Gur, D., Gedikoglu, S., Aysev, A. D., Sumerkan, B., Tatman-Otkun, M. ve Tuncer, I. 2005b. "Antimicrobial resistance patterns and serotype distribution among *Salmonella enterica* strains in Turkey, 2000-2002", Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 24(3), 220-225.

Erdem, B., Haşçelik, G., Gedikocğlu, S., Gür, D., Ercis, S., Sümerkan, B., Aysev, A. D., Tuncer, I., Tuğrul, M., Tatman, Otkun M., Tünger, A., Akgün, Y., Acar, N., Köksal, I., Gültekin, M., Söyletir, G., Elhan, A. 2004. "*Salmonella enterica* serotypes and *Salmonella* infections: a multicenter study covering ten provinces in Turkey", Mikrobiyol. Bul., 38(3), 173-186.

Erkmen, O., ve Faruk Bozoglu, T. 1995. "Behaviour of *Salmonella typhimurium* in feta cheese during its manufacture and ripening", LWT - Food Science and Technology, 28(3), 259-263.

Felício, T. 2011. "Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses, Part B: Analysis of factors associated with *Salmonella* contamination of broiler carcasses", 9.

Frana, T. S., Carlson, S. A., Griffith, R. W. 2001. "Relative distribution and conservation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *Salmonella enterica* serotype typhimurium phage type DT104", Appl. Environ. Microbiol., 67(1), 445-448.

Gebreyes, W.A., Altier, C. 2002. "Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine", Journal of Clinical Microbiology, 40(8), 2813-2822.

Genç, O. 2002. "Kars yöresinde evcil hayvanlardan *Salmonellaların* izolasyonu, identifikasyonu ve serotiplendirilmesi", Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 8(1), 23–30.

Gerner-Smidt, P. 2006. "PulseNet USA—a 10-year status", Foodborne Pathog. Dis., 3, 9–19

Grimont, P. ve Weil, F. 2007. "Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars", Paris: World Health Organization Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute.

Gülmez, D. 2013. "Morfoloji, kültür ve biyokimyasal özellikler", Salmonella, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, İstanbul.

Hayaloglu, A. A., ve Kirbag, S. 2007. "Microbial quality and presence of moulds in Kufllu cheese", International Journal of Food Microbiology, 115(3), 376–80.

Hoelzer, K., Soyer, Y., Rodriguez-Rivera, L. D., Cummings, K. J., McDonough, P. L., Schoonmaker-Bopp, D. J., Root T. P., Dumas, N. B., Warnick, L.D., Gröhn, Y. T., Wiedmann, M., Baker, K. N. K., Besser, T. E., Hancock, D. D., ve Davis, M. A. 2010. "Prevalence of multidrug resistance is higher among bovine than human *Salmonella* Newport, Typhimurium and 4,5,12:i:- isolates, but differs by serotype and geographic region in the US", Applied and Environmental Microbiology, (accepted AEM00377-10 Version 2).

Hosoglu, S., Loeb, M., Geyik, M. F., Ucmak H. ve Jayaratne, P. 2003. "Molecular epidemiology of invasive *Salmonella typhi* in southeast Turkey", Clin. Microbiol. Infect., 9(7), 727-730.

INFOSAN Information Note No. 4/2009 – PulseNet International.

Jiménez, M., Martínez-Urtaza, J., ve Chaidez, C. 2011. "Geographical and temporal dissemination of *Salmonellae* isolated from domestic animal hosts in the Culiacan Valley, Mexico", Microbial Ecology, 61(4), 811–820.

Jolley, K. A. ve Maiden, M. C. J. 2010. "BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level", BMC Bioinformatics, 11, 595.

Kagambèga, A., Lienemann, T., Aulu, L., Traoré, A. S., Barro, N., Siitonen, A., ve Haukka, K. 2013. "Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* from the feces of cattle,

poultry, swine and hedgehogs in Burkina Faso and their comparison to human *Salmonella* isolates”, BMC Microbiology, 13, 253.

Kasper, S., Fretz, R., Kornschöber, C., Allerberger, F. ve Schmid, D. 2009. “Imported *Salmonella* Enteritidis cases: a multiphage outbreak among Austrian vacationers in Turkey, 2008”, Wien Klin. Wochenschr., 121(3-4), 144-148.

Kim, J. S., G. G. Lee, J. S. Park, Y. H. Jung, H. S. Kwak, S. B. Kim, Y. S. Nam and S. T. Kwon. 2007. “A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus*”, J. Food. Prot., 70(7), 1656-1662.

Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., ve Drosinos, E. H. 2010. “Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels”, Food Control, 21(6), 805–815.

Kuplulu, O. 1995. “Sığır karkaslarında *Salmonella* kontaminasyonu ve serotip dağılımı”, Ankara University.

Lieftucht, A. ve Reacher, M. 1999. “Case control study of *Salmonella* paratyphi B infection associated with travel to Alanya, Turkey”, Eurosurveillance, 3(44), <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=1307>

Loneragan, G. H., Thomson, D. U., McCarthy, R. M., Webb, H. E., Daniels, A. E., Edrington, T. S., ... Brashears, M. M. 2012. “*Salmonella* diversity and burden in cows on and culled from dairy farms in the Texas High Plains”, Foodborne Pathogens and Disease, 9(6), 549–555.

Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J.,...2010. “The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis”, Clin. Infect. Dis., 50(6), 882-889.

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F. , Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin P. M. ve Tauxe, R. V. 1999. “Food-related illness and death in the United States”, Emerging Infectious Diseases, 5, 607-625.

Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., Helmuth, R. 2005. “Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany”, J. Antimicrob. Chemother., 56(6), 1025-1033.

Molla, W., Molla, B., Alemayehu, D., Muckle, A., Cole, L., ve Wilkie, E. 2006. “Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars in apparently healthy slaughtered sheep and goats of central Ethiopia”, Tropical Animal Health and Production, 38(6), 455–62.

Olive, D. M., ve Bean, P. 1999. "Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms", J. Clin. Microbiol., 37, 1661–1669.

Pérez-Pérez, F. J. ve Hanson, N. D. 2002. "Detection of plasmid-Mediated ampC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR", J. Clin. Microbiol., 40(6), 2153-2162.

Rabsch, W., Andrews, H. L., Kingsley, R. A., Prager, R., Tschape, H., Adams, L. G. ve Baumler, A. J. 2002. "*Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants", Infect. Immun., 70(5), 2249-2255.

Rahn, K., De Grandis, S. A., Clarke, R. C., McEwen, S. A. Galán, J. E., Ginocchio, C., Curtiss III, R., Gyles, C. L., "Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*", Molecular and Cellular Probes, 6(4), 271–279.

Randall, L. P., Cooles, S. W., Osborn, M. K., Piddock, L. J. V. ve Woodward, M. J. 2004. "Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK", Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 53, 208–216.

Ribot, E. M., Fair, M. A., Gautom, R., Cameron, D. N., Hunter, S. B., Swaminathan, B., Barrett, T. J. 2006. "Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet", Foodborne Pathog. Dis., 3(1), 59-67.

Robinson, S. 2013. "*Salmonella* could be beef industry's new biggest challenge", The Midwest Center for Investigative Reporting.

Rozas, J. 2009. "DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP", Methods in Molecular Biology Series, 537, 337-350.

Samuel, J. L., O'Boyle, D. A., Mathers, W. J., ve Frost, A. J. 1980. "The contamination with *Salmonella* of bovine livers in an abattoir", Australian Veterinary Journal, 56(11), 526–528.

Sandvang, D., Aarestrup M. F., & Jensen, L.G. 2006. "Characterization of integrons and antimicrobial resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104", FEMS Microbiol. Letters., 160(1), 37-41.

Sırıken, B. ve Türk, H. 2013. "Kanatlı etleri ve Salmonellozis", Animal Health, Production and Hygiene.

- Souza Sant'Ana, A. de, Zweifel, C., ve Stephan, R. 2012. "Spices and herbs as source of *Salmonella*-related foodborne diseases", *Food Research International*, 45(2), 765–769.
- Soyer, Y., Alcaine, S. D., Schoonmaker-Bopp, D. J., Root, T. P., Warnick, L. D., McDonough, P. L., Dumas, N. B., Grohn Y. T. ve Wiedmann, M. 2010. "Pulsed-field gel electrophoresis diversity of human and bovine clinical *Salmonella* isolates", *Foodborne Pathog. Dis.*, 7(6), 707-717.
- Soyer, Y., Richards, J., Hoelzer, K., Warnick, L. D., Fortes, E., McDonough, P. ve Wiedmann, M. 2013. "Antimicrobial drug resistance patterns among cattle- and human-associated *Salmonella* strains", *Journal of Food Protection*, 76, 1676–1688.
- Stobbee, M. 2013. "Ground beef recall: 16 people sick from *Salmonella* in 5 states", *Huffington Post*.
- Swaminathan, B., Barrett, T. J., Hunter, S. B.,...2001. "PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States", *Emerg. Infect. Dis.*, 7, 382–389.
- Tansel, O., Ekuklu, G., Otkun, M. T., Akata, F. ve Tugrul, M. 2003. "A food-borne outbreak caused by *Salmonella* enteritidis", *Yonsei Med. J.*, 44(2), 198-202.
- Tekinşen, K., ve Özdemir, Z. 2006. "Prevalence of foodborne pathogens in Turkish Van otlu (Herb) cheese", *Food Control*, 17(9), 707–711.
- Uesugi, A. R., Danyluk, M. D., Mandrell, R. E., ve Harris, L. J. 2007. "Isolation of *Salmonella* enteritidis phage type 30 from a single almond orchard over a 5-year period", *Journal of Food Protection*, 70(8), 1784–1789.
- Ulutürk, O. 1993. "Ankara piyasasında tüketime sunulan sakatatın *Salmonella* kontaminasyonu yönünden incelenmesi", *Ankara Üniversitesi*.
- Us, E., Erdem, B., Tekeli, A., Dolapci, I., Bayramova, M., Saran, B. ve Sahin, F. 2009. "Molecular investigation of *Salmonella* choleraesuis and *Salmonella* hadar strains isolated from humans in Turkey", *Jpn. J. Infect. Dis.*, 62(5), 362-7.
- Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesus, J., Platt, D. J. ve Olsen, J. E. 2000. "Host adapted serotypes of *Salmonella* enterica", *Epidemiology and Infection*, 125(2), 229-255.

van Belkum, A. 1998. "Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I macrorestriction fragments: a multicenter study" , Br. Med. Bull., 54, 31–38.

van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N. K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse S., ve Struelens, M. 2007. "Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology", Clin. Microbiol. Infect., 13(3), 1-46.

Vázquez-Garcidueñas, M. S., Romero-Pérez, N. L., Figueroa-Aguilar, G. A., Jaime-Sánchez, J. L., ve Vázquez-Marrufo, G. 2014. "Investigation of a food-borne *Salmonella* Oranienburg outbreak in a Mexican prison", Journal of Infection in Developing Countries, 8(2), 143–53.

Vella, L., ve Cuschieri, P. 1995. "*Salmonella* excretion in adult cattle on the Maltese island of Gozo", Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics), 14(3), 777–787.

Vieira, A. R. 2009. "A resource to link human and non-human sources of *Salmonella*", http://www.who.int/gfn/activities/CDB_poster_Sept09.pdf

White, D.G., Zhao, S., Sudler, R., Ayers, S., Friedman, S., Chen, S., McDermott, P. F., McDermott, S., Wagner, D. D., Meng, J. 2001. "The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats", N. Engl. J. Med., 18, 345(16), 1147-54.

Wiedmann, M. 2002. "Subtyping of bacterial foodborne pathogens", Nutrition Reviews, 60(7 Pt 1), 201–8, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12144198>

Yıldız Deniz, G. ve Ulukanlı, Z. 2012. "Ağrı ili merkezinde hazır olarak satışa sunulan kıyma örneklerinin *Salmonella* spp. yönünden incelenmesi", Gümüşhane University Journal of Health Sciences, 1(2), 2.