

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**KANATLILARDA SALMONELLA TÜRLERİNİN
İZOLASYONU, SEROTİPLENDİRİLMESİ VE ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI**

**AYŞEGÜL KUTU
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN**

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-17009 nolu proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim DalıProgramı çerçevesinde tarafından
hazırlanan “.....” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora/Yüksek
Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Üye (Tez Danışmanı):
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez konusunun seçimi ve çalışmaların yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a, çalışmalarımnda desteklerini gördüğüm Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Araştırma Görevlileri'ne, ayrıca tezimin her aşamasında manevi desteğini esirgemeyen aileme ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| KABUL ONAY | i |
| TEŞEKKÜR | ii |
| İÇİNDEKİLER..... | iii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | viii |
| TABLolar DİZİNİ | ix |
| RESİMLER DİZİNİ | x |
| ÖZET | x |
| ABSTRACT | xi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Salmonella Türlerinin Tarihçesi | 3 |
| 2.2. Salmonella'ların Etiyolojisi | 3 |
| 2.3. Morfoloji ve Kültürel Özellikleri | 6 |
| 2.4. Antijenik Özellikleri | 7 |
| 2.5. Salmonellaların Toksin, Faj ve Direnç Özellikleri | 9 |
| 2.6. Salmonella İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi | 10 |
| 2.7. Salmonella İnfeksiyonlarının Kanatlılarda Klinik Bulguları | 11 |
| 2.7.1. Kanatlı Tifosu | 12 |
| 2.7.2. Paratifo İnfeksiyonları | 13 |
| 2.8. Kanatlılarda Salmonella Patogenezi | 13 |
| 2.8.1. Salmonellanın Makrofaj ve Dentritik Hücrelerde Yaşayabilmesi | 15 |
| 2.8.2. Salmonellanın Patojenite Unsurları | 16 |
| 2.9. Salmonellaların Virulans Faktörleri | 17 |
| 2.9.1. Plazmidler..... | 17 |
| 2.9.2. Toksinler | 18 |
| 2.9.3. Fimbria | 18 |
| 2.9.4. Flagella | 19 |
| 2.9.5. Diğer Virulans Faktörleri | 19 |
| 2.10. Mikrobiyolojik Tanı | 20 |
| 2.10.1. Salmonella İzolasyon ve İdentifikasyonu | 20 |
| 2.10.2. Konakçı Spesifik Salmonella İnfeksiyonlarının Konvansiyonel Yöntemlerle Teşhisi | 20 |

| | |
|--|----|
| 2.10.3. Paratifo İnfeksiyonlarının Konvansiyonel Yöntemlerle Teşhisi | 22 |
| 2.10.3.1. Ön Zenginleştirme | 22 |
| 2.10.3.2. Selektif Zenginleştirme..... | 23 |
| 2.10.3.3. Selektif (ayırıcı) Besiyerine Ekim | 23 |
| 2.10.3.4. Şüpheli Kolonilerin İdentifikasyonu | 24 |
| 2.10.4. Serolojik Testler | 25 |
| 2.10.5. Kanatlı Salmonella İnfeksiyonlarının Moleküler Teşhisi | 25 |
| 2.11. Salmonella Türleri ve Antimikrobiyal Dirençlilik | 29 |
| 2.11.1. İlaç Rezistans Mekanizması | 30 |
| 2.11.2.Salmonella Türlerinde Antimikrobiyal Gruplara Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları | 31 |
| 2.11.2.1. Aminoglikozidler | 31 |
| 2.11.2.2. β – Laktamlar | 31 |
| 2.11.2.3. Fenikoller | 32 |
| 2.11.2.4. Kinolonlar ve Florokinolonlar | 32 |
| 2.11.2.5. Tetrasiklin | 32 |
| 2.11.2.6. Sülfonamidler ve Trimetoprim | 33 |
| 2.11.3. <i>Salmonella</i> Türlerinde Antimikrobiyal Direncin Geçişi | 33 |
| 2.12. Salmonella Koruma ve Kontrol | 34 |
| 2.12.1.Salmonella İnfeksiyonlarına Karşı Aşılama ve Korunmanın İmmun Mekanizması | 35 |
| 2.12.2. Salmonella İnfeksiyonlarına Karşı Aşılama | 37 |
| 2.12.2.1 Canlı Attenüe Aşılar | 37 |
| 2.12.2.2. İnaktif Aşılar | 39 |
| 2.12.2.3. Subunit Aşılar | 39 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 40 |
| 3.1.Gereç | 40 |
| 3.1.1. İzolasyon Örnekleri | 40 |
| 3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Ayraçlar, Solusyonlar ve Antibiyotik Diskleri | 42 |
| 3.1.2.1. Besiyerleri | 42 |
| 3.1.2.1.1. İzolasyon Besiyerleri | 42 |
| 3.1.2.1.1.1. Kanlı Agar Base (Merck® 1.10886) | 42 |
| 3.1.2.1.1.2. Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS) (AEB910303/4 Biomerieux®) | 42 |
| 3.1.2.1.1.3. Rappaport-Vassiliadis Soy Broth (RVS Broth) (1.07700.0500 Merck®)..... | 42 |
| 3.1.2.1.1.4. Selenit- F Broth (42099 Biomerieux®)..... | 43 |
| 3.1.2.1.1.5. Mueller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth (MKTTn) | 43 |

| | |
|--|----|
| 3.1.2.1.1.6. Xylose Laktoz Tergitol 4 Agar (XLT 4) (AEB523420 Biomerieux®)..... | 44 |
| 3.1.2.1.2. İdentifikasyon besiyerleri | 45 |
| 3.1.2.1.2.1. Lassen'in 3'lü tüp besiyerleri | 45 |
| 3.1.2.1.2.2. Triple Sugar/ Iron Agar (TSI agar)..... | 46 |
| 3.1.2.1.3. Antibiyogram Besiyeri | 46 |
| 3.1.2.1.3.1. Mueller-Hinton Agar (Merck® 1.05437)..... | 46 |
| 3.1.2.1.4. Antibiyotik Diskleri | 47 |
| 3.1.2.2. Ayıraçlar | 47 |
| 3.1.2.2.1. İndol ayıracağı | 47 |
| 3.1.2.3. Solusyonlar | 47 |
| 3.1.2.3.1. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer | 47 |
| 3.1.2.3.2. Gel LoadingBuffer (6X) | 48 |
| 3.1.2.3.3. Tris (1M) | 48 |
| 3.1.2.3.4. TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA)..... | 48 |
| 3.1.2.4. Boyalar | 48 |
| 3.1.2.5. API 20E test kitinde kullanılan reaktifler | 48 |
| 3.1.3. PCR | 49 |
| 3.1.3.1. Kullanılan Cihazlar | 49 |
| 3.1.3.2. MgCl ₂ , Taq DNA Polimeraz, 10XTaq Buffer, dNTP Set | 49 |
| 3.1.3.3. AccuStart™ II PCR SuperMix (Quanta Biosciences®)..... | 49 |
| 3.1.3.4. Primerler | 59 |
| 3.1.4. Elektroforez | 50 |
| 3.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı | 50 |
| 3.1.4.2. Marker | 50 |
| 3.1.4.3. Ethidium Bromid | 50 |
| 3.2. Yöntem | 50 |
| 3.2.1. Fenotipik İdentifikasyon..... | 50 |
| 3.2.1.1. Kanatlı İç Organlarından <i>Salmonella Gallinarum/Salmonella Pullorum</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu | 50 |
| 3.2.1.2. Kanatlı Paratifo İnfeksiyonlarının İzolasyon ve İdentifikasyonu..... | 51 |
| 3.2.1.3. API 20E ile İdentifikasyon | 51 |
| 3.2.2. Genotipik İdentifikasyon | 52 |
| 3.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu..... | 52 |
| 3.2.2.2. PCR | 53 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.2.2.1. 16S rRNA Spesifik PCR | 53 |
| 3.2.2.2.2. <i>Salmonella</i> Enteritidis/ <i>Salmonella</i> Typhimurium multipleks PCR | 54 |
| 3.2.2.2.3. <i>Salmonella</i> Gallinarum Varlığının Araştırılması | 56 |
| 3.2.2.2.4. <i>Salmonella</i> Pullorum Varlığının Araştırılması | 57 |
| 3.2.2.3. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi | 59 |
| 3.2.2.4. Jelde Yürütme | 59 |
| 3.2.2.5. Görüntüleme ve Değerlendirme | 59 |
| 3.2.3. Antibiyogram | 59 |
| 4. BULGULAR | 61 |
| 4.2. Genotipik Bulgular | 63 |
| 4.3. Antibiyogram Bulguları | 69 |
| 5. TARTIŞMA..... | 73 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 81 |
| KAYNAKLAR..... | 82 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 101 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------------|--|
| °C | : Santigrat Derece |
| ABD | : Amerika Birleşik Devletleri |
| BGN | : Novobiosin içeren Brilliant Green Agar |
| CDC | : Centers for Disease Control and Prevention |
| DNA | : Deoksiribonükleik Asit |
| EFSA | : European Food Safety Authority |
| EIA | : Enzyme Immuno Assay |
| ELISA | : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| ISO | : International Standards Organization |
| HACCP | : Hazard Analyses Critical Control Points |
| PCR | : Polimeraze Chain Reaction |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1. Salmonella türlerinin ve alttürlerinin klasifikasyonu..... | 4 |
| Şekil 2. İnaktif ve Canlı Salmonella aşıları kullanıldığında oluşan immun yanıt..... | 38 |

TABLolar DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Tablo 1. CDC’de kullanılan Salmonella Nomenklatürü | 6 |
| Tablo 2. Salmonella türlerinin kültürel ve biyokimyasal özellikleri | 7 |
| Tablo 3. Kanatlılarda hastalık yapan Salmonellaların özellikleri..... | 9 |
| Tablo 4. SPI ’ların gen kümeleri ve fonksiyonları..... | 17 |
| Tablo 5. <i>Salmonella</i> identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal özellikler..... | 24 |
| Tablo 6. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun avantaj ve dezavantajları..... | 28 |
| Tablo 7. Kümeslerden alınan örneklerin çiftliklere dağılımı..... | 41 |
| Tablo 8. API 20E test kitinde kullanılan reaktifler | 48 |
| Tablo 9. PCR işleminde kullanılacak primerler..... | 49 |
| Tablo 10. API 20E test kiti için değerlendirme kriterleri | 52 |
| Tablo 11. 16S rRNA geni için mastermiks hazırlanma oranları..... | 54 |
| Tablo 12. 16S rRNA geni için PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı | 54 |
| Tablo 13. <i>S. Enteritidis</i> ve <i>S. Typhimurium</i> serotiplerine spesifik multipleks PCR için mastermiks hazırlanma oranları..... | 55 |
| Tablo 14. <i>S. Enteritidis</i> ve <i>S. Typhimurium</i> serotiplerine spesifik multipleks PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı | 56 |
| Tablo 15. <i>S. Gallinarum</i> varlığının araştırılması için yapılan PCR mastermiks hazırlanma oranları..... | 56 |
| <i>S. Gallinarum</i> varlığının araştırılması için yapılan PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı..... | 57 |
| Tablo 17. <i>S. Pullorum</i> varlığının araştırılması için yapılan PCR mastermiks hazırlanma oranları | 58 |
| Tablo 18. <i>S. Pullorum</i> varlığının araştırılması için yapılan PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı | 58 |
| Tablo 19. Salmonella izolatlarının API 20E sonuçları | 61 |
| Tablo 20. <i>Salmonella enterica</i> (<i>S. enterica</i>) 16S rRNA cins spesifik PCR sonuçlar | 63 |
| Tablo 21. <i>Salmonella enterica</i> tür spesifik multipleks PCR sonuçları..... | 66 |
| Tablo 22. Salmonella izolatlarının antibiyogram sonuçları..... | 71 |

RESİMLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Resim 1. API 20E 6704552 profili. | 63 |
| Resim 2. API 20E 6704752 profili..... | 63 |
| Resim 3. <i>Salmonella enterica</i> 16S rRNA geni taşıyan cins spesifik PCR görüntüsü..... | 65 |
| Resim 4: <i>S. Enteritidis</i> ve <i>S. Typhimurium</i> pozitif örneklere ait PCR görüntüsü | 69 |

ÖZET

KANATLILARDA SALMONELLA TÜRLERİNİN İZOLASYONU, SEROTİPLENDİRİLMESİ VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

Kutu A. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2017.

Araştırmamız, Ege Bölgesinin batısında kanatlı yetiştiriciliği yapan Salmonella şüphesi bulunan kümeslerden 01 Eylül- 20 Aralık 2016 tarihleri arasında 253 adet tavuk örneği toplanarak gerçekleştirilmiştir. Hastalık şüphesi görülen tavukların nekropsi işlemi kanatlı teşhis ünitesinde gerçekleştirildikten sonra, tavuklardan tekniğine uygun şekilde alınan organ numuneleri Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Teşhis ve Analiz Laboratuvarına soğuk zincirde getirilmiştir. Kümeslerden alınan tavuk örneklerine yapılan nekropsi sonucunda karaciğer, dalak, kalp ve sekum organlarından Salmonella etkeni izolasyon ve identifikasyonu yapılmıştır. Çalışmalarımızın sonucunda; 4 (% 9,3) izolatın *S. Enteritidis* ve 39 (% 90,7) izolatın *S. Typhimurium* olarak tiplendirilmiştir. Antibiyogram testi sonucu, *S. Enteritidis* (n=4) izolatlarının, Gentamisin ve Seftriaksona % 100 oranında, Kanamisin ve Tetrasikline % 50 oranında duyarlı; Sefotaksime % 75 oranında orta derece duyarlı ve Ampisilin ile Penisiline ise % 100 oranında dirençli oldukları saptanmıştır. *S. Typhimurium* (n=39) izolatlarının ise, Seftriaksona % 92, Gentamisine % 82, Kanamisin ve Sefotaksime % 61, Tetrasikline % 51 oranlarında duyarlı; Ampisilin % 97 ve Penisiline ise % 100 oranında dirençli oldukları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kanatlı, *Salmonella* sp., Serotiplendirme, PCR, İdentifikasyon.

ABSTRACT

ISOLATION, SEROTYPING AND INVESTIGATION OF ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITIES OF SALMONELLA SPECIES IN POULTRY

Kutu A. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Department of Microbiology, Master Thesis, Aydın, 2017.

In this study, 253 chicken samples were collected from *Salmonella* sp. suspected poultry farms in the western part of the Aegean Region from 01 September to 20 December 2016. After the necropsy process of the suspected chickens was carried out in the poultry diagnostic unit, the samples of the organs from the chickens were transferred in the cold chain to the Diagnostic and Analysis Laboratory of the Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Adnan Menderes University. As a result of the necropsy conducted on the chicken samples taken from the farms, *Salmonella* sp. isolation and identification were done from the liver, spleen, heart and caecum organs. As a result of our studies; 4 (9.3%) isolates were found as *S. Enteritidis* and 39 (90.7%) isolates were found as *S. Typhimurium*. As a result of the antibiogram test, *S. Enteritidis* (n = 4) isolates were susceptible to Gentamycin and Seftriaxson in the ratio of 100%, susceptible to Kanamycin and Tetracycline in the ratio of 50%, intermediate susceptible to Cefotaxime in the ratio of 75%, and resistant to Ampicillin and Penicillin in the ratio of 100%. *S. Typhimurium* (n=39) isolates were susceptible to Seftriaxson in the ratio of 92%, Gentamycin in the ratio of 82%, Kanamycin and Cefotaxime in the ratio of 61%, Tetracycline in the ratio of 51% and resistant to Ampicillin in the ratio of 97%, Penicillin in the ratio of 100%.

Keywords: Poultry, *Salmonella* sp., Serotyping, PCR, Identification.