T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TAVUKLAR İÇİN CANLI SALMONELLOZİS AŞISI GELİŞTİRİLMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Suzan Reyhan KARAKOÇ

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

KONYA-2014

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TAVUKLAR İÇİN CANLI SALMONELLOZİS AŞISI GELİŞTİRİLMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Suzan Reyhan KARAKOÇ

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

Bu araştırma TAGEM tarafından HSYGAD/12/A06/P03/10 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2014

ÖNSÖZ

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kanatlı sektörünün en önemli sorunlarından birisi enfeksiyöz hastalıklardır. Bunlar arasında, salmonellozis önemli bir yer tutmaktadır. Enfekte kümes hayvanları, hastalığın rezervuarı olarak gıda zinciri ile doğrudan hastalığın insanlara taşınmasından sorumlu tutulmaktadır. Tavuk kümeslerinde ve tavuk ürünlerinde Salmonella insidensini azaltmak için, kombine ve sürekli uygulanan katı kontrol önlemlerine ihtiyaç vardır. Salmonella'lar, koruyucu ve tedavi edici amaçla yaygın kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazanarak, bu özelliği insan ve diğer hayvan orjinli suşlara da aktarabilmektedirler. Bu nedenle etkenin kontrolünde etkili aşıların geliştirilmesi, tavukçuluk sektörü ve devlet kurumları için bir ihtiyaç olmuştur. Geçmişten günümüze, Salmonella serovarlarına karşı birçok aşı geliştirme çalışması mevcut olup, daha etkili ve daha güvenilir aşı geliştirme çalışmaları halen devam etmektedir.

Bu çalışmada, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD Kültür Kolleksiyonunda bulunan, 20 yıldır sürekli pasajlarla zayıflatılmış, bir adet *S.* Pullorum ve üç adet *S.* Enteritidis olmak üzere dört farklı saha suşundan canlı aşı hazırlanarak, yumurtacı tavuklar üzerine etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Tez çalışmam sırasında desteklerinden dolayı danışman hocam, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman ERGANİŞ başta olmak üzere, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri; Prof. Dr. U. Sait UÇAN, Prof. Dr. H. Hüseyin HADİMLİ, Tez İzleme Komitesi Üyesi Prof. Dr. Sibel YAVRU, Yrd. Doç. Dr. Zafer SAYIN, Araş. Gör. Aslı SAKMANOĞLU, laboratuar çalışmalarım sırasında bana verdikleri destek ve yardımlarından dolayı Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'nde görevli çalışma arkadaşlarım Vet. Hekim Emin ÇIBIK, Vet. Hekim B. Selim TOKGÖZ, Su Ürünleri Mühendisi Hakan İNCE, Biyolog Murat ÖZMEN, Teknisyen Koray ŞENGÜL, Laboratuar görevlimiz Mine SARIASLAN ve diğer personel arkadaşlarıma, ayrıca çalışmam süresince bana destek olan, annem Selma KARAKOÇ ve babam Halil KARAKOÇ başta olmak üzere ailemin tüm fertlerine teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Tarımsal Araştırmalar ve Politakalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından HSYGAD/12/A06/P03/10 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tanım	1
1.2. Tarihçe	2
1.3. Etiyoloji	3
1.3.1. Klasifikasyon ve Nomenklatür	3
1.3.2. Morfoloji	3
1.3.3. Üreme İhtiyaçları	4
1.3.4. Biyokimyasal Özellikler	4
1.3.5. Antijenik Yapı	4
1.3.6. Toksinler	6
1.4. Epidemiyoloji	6
1.4.1. Konakçı	6
1.4.2. Bulaşma	7
1.5. Klinik Bulgular	8
1.6. Patolojik Bulgular	9
1.7. Patogenez	9
1.8.Teşhis	10
1.8.1. Etken İzolasyonu	10
1.8.2. İdentifikasyon	11
1.8.3. Serolojik Testler	13
1.9. Antibiyotik Duyarlılık	15
1.10. Bağışıklık ve Aşılama	16
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Besiyerleri ve Çözeltiler	28
2.2. Aşı Suşları	29
2.3. Deneme Hayvanları	30
2.4. Eprüvasyon Suşları	30
2.5. RAPD PZR Primerleri	30
2.6. Etik Kurul Kararı	31
2.7. Antibiyotik Duyarlılık Testi	31
2.8. Aşı Suşlarının Patojenite Kontrolü	31

2.9. Eprüvasyon Suşunun Seçimi……..... 32
2.10. Bakteriyolojik Kontroller 32
2.11. Serolojik Testler..... 33
2.11.1. Çabuk Serum Aglutinasyon Tsti (RST).. 33
2.11.2. Enzim Linked Immunosorbent Assay **(**ELISA)..... 34
2.12. Aşıların Hazırlanması..... 35
2.12.1. SÜVF33 No'lu (*S*. Pullorum) Aşının Hazırlanması ……... 35
2.12.2. SÜVF34 No'lu (*S*. Enteritidis Aşının Hazırlanması ...…… 35
2.12.3. SÜVF35 No'lu (*S*. Enteritidis Aşının Hazırlanması ...…… 35
2.12.4. SÜVF88 No'lu (*S*. Enteritidis) Aşının Hazırlanması ...…….. 35
2.13. Deneysel Dizayn..... 35
2.13.1. Bir Kez Aşılanan Gruplar 36
2.13.2. İki Kez Aşılanan Gruplar 37
2.14. Randomly Amplified Polymorphic DNA **(**RAPD PZR) Analizi 38
2.14.1. DNA İzolasyonu …..... 38
2.14.2. DNA Absorbans Tayini 39
2.14.3. RAPD PZR ile DNA Amplifikasyonu..... 39
2.14.4. Jel Görüntüleme ve Değerlendirme..... 39
2.15. İstatistiksel Analiz 40
3. BULGULAR..... 41
3.1. Aşı Suşlarının Biyokimyasal Karekterleri..... 41
3.2. Aşı suşlarının Serotiplendirmesi..... 42
3.3. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları ……..... 42
3.4. Deneme Hayvanlarının Muayenesi …… 43
3.5. Aşı Suşlarının Patojenitelerinin Değerlendirilmesi 43
3.6. Epruvasyon Suşunun Seçimi ……..... 43
3.7. Aşıların İmmünojenitesinin Değerlendirilmesi..... 44
3.7.1. Bir Kez Aşılanan Grupların ELISA Sonuçları 44
3.7.2. İki Kez aşılanan Grupların ELISA Sonuçları 47
3.8. Reizolasyon Sonuçları..... 49
3.8.1. Bir Kez Aşılanan Grupların Reizolasyon Sonuçları …..... 49
3.8.2. İki Kez Aşılanan Grupların Reizolasyon Sonuçları ……..... 51
3.9. RAPD PZR Sonuçları..... 54
4. TARTIŞMA ……..……..... 60
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER ……..... 71

6. ÖZET……..……..... 73
7. SUMMARY ……..... 74
8. KAYNAKLAR ……..……..... 75
9. EKLER 82
EK. A: Etik Kurul Kararı……..…… 82
EK. B: Şekiller……... 83
10. ÖZGEÇMİŞ ……..……. 86

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Ana Bilim Dalı
ADH	Arjinin dihidrolaz
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
ARDRA	Amplified ribosomal DNA restriction analysis
AVKE	Adana Veteriner Kontrol enstitüsü
BGA	Brilliant Green Agar
Bp	Base Pair
CLSI	The Clinical and Laboratory Standards Institute
DCA	Deoxycholate/citrate agar
DIASALM	Diagnostic Semi-Solid Salmonella Medium
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfatlar
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EVKMAE	Etlik Veteriner Kontrol ve Merkez Araştırma Enstitüsü
H	Flagellar antijen
H_2S	Hidrojen Sülfür
IFNγ	İnterferon-gama
Ig	İmmünglobulin
IL	Interleukin
İV	İntravenöz
KCN	Potasyum Siyanid
LDC	Lizin dekarboksilaz
LPS	Lipopolisakkarid
$MgCI_2$	Magnezyum klorür
MHA	Mueller-Hinton Agar
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
MR	Metil Red
MSRV	Modifiye Semi-Solid Rappoport Vassiliadis
ng	Nanogram
nm	Nanometre
O	Somatik antijen
ODC	Ornithin dekarboksilaz
OIE	World Organization For Animal Heath
OMP	Outer membrane protein, dış membran proteini
ONPG	O–Nitrophenyl–Beta–D–Galaktopyranside
PBS	Phosfate Buffer Solution
PZR	Polymerase Chain Reaction, Polimeraz zincir reaksiyonu
PFGE	Pulsed – Field Gel Electrophoresis
PTS	Paratifoid salmonella
PZR	Polymerase Chain Reaction, Polimeraz zincir reaksiyonu
R	Antibiyotik-Rezistans
R	Rough
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA'
REP	Repetitive element palindromic

RES	Retiküloendotelial sistem
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Rpm	Round per minute
RST	Rapid serum/slide agglutination
RVS	Rappaport Vasiliadis
S	Duyarlı
S	Smooth
Spp	Species (pulural)
SÜVF	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
SÜVFEK	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu
Taq	*Thermus aquaticus*
TNFα	Tümör nekroz faktör alfa
TPS	Tamponlanmış Peptonlu Su
TSA	Triptic Soy Agar
Vi	Yüzey antijeni
VP	Voges-Proskauer
XLD	Xylose-Lysine-Desoxycholate
XLT-4	Xylose-Lysine-Tergitol-4
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

1.1. Tanım

Salmonellozis, *Enterobacteriaceae* familyasına ait Salmonella cinsinde yer alan bazı türlerin oluşturduğu enfeksiyonlardır. Salmonella cinsi, ilk defa, Amerikalı Veteriner Bakteriyolog Daniel E. Salmon tarafından, 1885 yılında rapor edilmiş ve isimlendirilmiştir (Gast 2003).

Kanatlılarda Salmonella enfeksiyonlarına neden olan serotipler, konakçı-bağımlı ve konakçı-bağımsız olmak üzere iki kategoride değerlendirilir. Birinci kategoride, iki hareketsiz serotip, *S.* Pullorum (*Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum) ve *S.* Gallinarum (*Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum) yer alır. Her iki serotip de genellikle kanatlı türlerine özgüdür. Pullorum hastalığı, *S.* Pullorum'un sebep olduğu, tavuk ve civcivlerin akut sistemik bir hastalığıdır. Tavuk tifosu ise *S.* Gallinarum tarafından oluşturulan, genellikle yetişkin kanatlıları etkileyen akut veya kronik, septisemik bir hastalıktır. Bu hastalıkların her ikisi de tavukçuluk sektörü'nde ciddi ekonomik kayıplardan sorumludur. Geçmişten günümüze birçok ülkede, bu hastalıklara karşı yaygın test çalışmaları ile eradikasyon programları uygulanmaya devam edilmektedir (Shivaprasad 2003, Barrow ve Freitas 2011).

İkinci kategoride; paratifoid Salmonella (PTS) etkeni olan çeşitli hareketli Salmonella serotipleri (*S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *S.* Heidelberg, *S.* Kentucky, *S.* Newport, *S.* Montevideo, *S.* Anatum, *S.* Bredeney *S.* Hadar, *S.* Infantis .....) yer almaktadır. Hemen hemen bütün yabani ve evcil hayvanlarda bulunmaktadır. Paratifo enfeksiyonları, kanatlılarda çok yaygın olmasına rağmen, çok genç, hassas kuşlar dışında nadiren akut sistemik hastalıklara neden olmaktadır . PTS etkenleri ile enfekte kümes hayvanları, etkenin gıda zinciri ile insanlara taşınmasında en önemli rezervuardır (Gast 2003, Arda 2006).

Tavukçuluk sektöründe, gelişmiş bütün koruma ve kontrol (biyogüvenlik) önlemleri, Salmonella enfeksiyonlarının sınırlarını daraltmış olmasına karşın, işletmelerin en sık karşılaştığı problemlerden birisi olmaya devam etmektedir (Çarlı 1990, Bekar ve ark 1993, Orhan ve Güler 1993, Tavukçuoğlu 1993, Gökçen ve

Erganiş 1996, Gülyaz ve Taştan 1996, Kalender ve Muz 1999, EFSA 2004, Yazıcıoğlu 2005, Arda 2006, Kılınç ve Aydın 2006, Türkyılmaz ve ark 2007). Bunun en önemli sebepleri arasında Salmonella'ların hücre içi yerleşmeleri ve horizontal bulaşma dışında vertikal (yumurta ile) yolla da bulaşabilmeleridir (Arda 2006).

1.2. Tarihçe

S. Pullorum etkeninin neden olduğu pullorum hastalığı, 20. yüzyılın başlarında ticari kanatlıların en önemli hastalıklarından birisi olarak bildirilmiştir. Hastalık ilk olarak 1900 yılında Rettger tarafından "genç civcivlerin septisemisi" olarak tanımlanmıştır. Daha sonra hastalık etkenini *Bacterium pullorum* olarak isimlendirmiş, hastalığı da "genç civcivlerin ölümcül septisemisi" veya "beyaz ishal" adını vermiştir. Bunu takip eden yıllarda, pullorum hastalığı tavukların yumurta yoluyla bulaşan bir hastalığı olarak dünya çapında tanımlanmıştır. Jones tarafından 1913 yılında pullorum hastalığı taşıyıcılarını tespit etmek için, makroskobik tüp aglütinasyon testi geliştirilmiştir. *S.* Gallinarum'un neden olduğu tavuk tifosu hastalığı, ilk olarak 1888 yılında İngiltere'de damızlık kümeslerde meydana gelen bir salgında Klein ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Tavuk tifosu hastalığının dünya çapında bir yayılımı olmuş ve hemen hemen tüm tavuk üretimi yapılan bölgelerde tespit edilmiştir (Poppe 2000).

Tüm dünyada 1950-60'lı yıllara kadar, tavuk ve hindi sürülerinde yüksek mortaliteyle seyrederek, büyük ekonomik kayıplara yol açan tavuk tifosu ve pullorum hastalığı; gelişmiş ülkelerde uygulanan tarama ve kontrol programları sayesinde, yaygınlığı oldukça düşük oranlara indirilmiş, son yıllara kadar hastalıkların olmadığı veya yok denecek seviyelerde olduğu Kanada, Amerika ve birkaç Avrupa Ülkesi tarafından da rapor edilmiştir. Son dönemlerde, hastalığın bulunmadığını bildiren bazı ülkeler de dahil (İngiltere, Fransa, Almanya, İtalya, Danimarka, Amerika), genelllikle ticari olmayan yetiştiriciliklerde tavuk tifosu ve pullorum hastalığı çıkışları bildirilmiştir. Doğu Avrupa, Asya, Afrika ve Orta-Güney Amerika ülkelerinde de hastalık çıkışlarının devam ettiği bildirilmektedir (Poppe 2000, Shivaprasad 2003, Barrow ve Freitas 2011).

S. Enteritidis ilk kez Gaertner (1888) tarafından izole edilmiştir (Le Minor 1984, Gast 2003). İnsanlardan ve hayvanlardan izole edilen konakçı spesifik

olmayan Salmonella serovarlarında 1940'lardan bu yana hızlı bir artış olmuş, yıllar içinde öne çıkan serovar *S*. Typhimurium iken son yıllarda yerini *S*. Enteritidis'e bırakmıştır (Poppe 2000, Gast 2003).

1.3. Etiyoloji

1.3.1. Klasifikasyon ve Nomenklatür

Enterobacteriaceae familyasında yer alan Salmonella cinsinde iki tür bulunmaktadır. Bu türlerden biri *Salmonella bongori*, seyrek olarak görülen 20 adet serotipi içerir. İkinci tür *Salmonella enterica* ise 6 alt türe (I= *Salmonella enterica* subspecies *enterica*, II= *Salmonella enterica* subspecies s*alamae*, IIIa= *Salmonella enterica* subspecies *arizonae*, IIIb= *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae*, IV= *Salmonella enterica* subspecies *houtenae*, VI= *Salmonella enterica* subspecies *indica*) ayrılmaktadır. Serotiplerin yazım kuralları ise; italik ve ilk harf büyük olarak yazılan cins isminden sonra serotip kelimesi veya kısaltması "ser" sonra da serotipin adının italik olmayan ve ilk harf büyük olacak şekilde yazılması veya serotip kelimesine yer vermeden kısaca yazılması şeklindedir (*Salmonella* serotip (ser) Typhimurium veya *S*. Typhimurium). Alttür I'e ait serotipler adlandırılmaları ile tanımlanırken, alttür II, III, IV, VI ve *S. bongori*'ye ait serotipler antijenik formülleri ile tanımlanmaktadır (*Salmonella* serotip (ser.) Typhimurium, *Salmonella* II 50:b:z6, *Salmonella* IIIb 60:k:z), *Salmonella* ser. Marina (IV 48:g,z51:2)) (Brenner 1984, Brenner ve ark 2000, OIE 2010, 2012).

1.3.2. Morfoloji

Salmonella'lar; Gram negatif, kısa, uçları hafif yuvarlak, 2-5 μm boyunda, 0,7-1,5 μm eninde, sporsuz, kapsülsüz çubuklardır. Paratifoid suşların çoğu, peritrik flagellaları vasıtasıyla hareketli olmasına karşın, *S*. Gallinarum ve *S*. Pullorum flagellasız olduklarından, hareketsizdir (Le Minor 1984, Bekar 2003).

Salmonella kolonileri yaklaşık 2–4 mm çapında, küçük, yuvarlak şekilli, S (smooth) ve parlak özellik gösterirler (Gast 2003). *S*. Pullorum ve *S*. Gallinarum'un kolonileri 3-4 mm veya daha büyük çapa sahiptir (Shivaprasad 2003).

1.3.3. Üreme İhtiyaçları

Salmonella'lar fakültatif anaerobiktirler. En iyi 37 °C'da üremelerine karşın, üreme ısısı sınırları 5°C ile 45°C arasında değişebilmektedir. pH 4-9,0 aralığında üreyebilirken, optimum üreme pH'ları 7,0'dır. Uygun olmayan pH koşullarında üreyen etkenler flagella ve fimbriya gibi bazı özelliklerini kaybederler. Salmonella'ların besin ihtiyaçları oldukça basittir ve üremelerini destekleyen karbon ve nitrojen ihtiva eden çoğu besiyerinde üreyebilirler (Bekar 2003, Gast 2003).

1.3.4. Biyokimyasal Özellikler

Salmonella cinsi bakterilerde oksidaz testi negatif, katalaz testi pozitiftir. İndol oluşturmazlar. Voges-Proskauer (VP) testi negatif, metil red (MR), simmons sitrat, Lizin (LDC) ve ornithin dekarboksilaz (ODC) testleri pozitif olup, arjinin dihidrolaz (ADH) testinde değişkenlik vardır. Genellikle H_2S oluştururlar, üreyi hidrolize etmezler. Potasyum siyanid (KCN) besi yerinde üreme ve malonatın kullanımı değişkenlik gösterir. Nitratları indirgerler. L-arabinoz, maltoz, D-mannitol, D-mannoz, L-ramnoz, D-sorbitol, trehaloz ve D-ksiloz'u genellikle fermente ederler. Bütün Salmonella'lar glukozu fermente eder ve bazıları istisna olmak üzere gaz ve asit oluştururlar (*S.* Typhi, *S.* Gallinarum yalnız asit yapar). D-mannitol ve sorbitolden gaz da oluştururlar. Laktoz, sakkaroz, inositol ve amigdalini genellikle fermente etmezler. Fenilalanin ve triptofan deaminaz enzimlerine sahip değildirler. Salmonella'ların büyük çoğunluğu jelatini eritmez. *S.* Gallinarum dulsitolü fermente ederken *S.* Pullorum edemez. Aynı zamanda *S.* Pullorum, genellikle, maltozu da fermente edemez. Bu mikroorganizmalar arasındaki en büyük farklılık, *S.* Pullorum kültürlerinin ornitini hızlı bir sekilde dekarboksile etmesine karşın, *S.* Gallinarum kültürlerinin edememesidir (Arda ve ark 1990, Bekar 2003, Shivaprasad 2003).

1.3.5. Antijenik Yapı

Salmonella'larda 3 tür antijen önem kazanmıştır; "O" somatik antijen, "H" flagellar antijen ve çoğunluğu Typhi serovarında yer alan "Vi" yüzey antijenidir (Bekar 2003, İzgür 2006).

Kauffmann, White ve Le Minör tarafından somatik ve flageller antijenlere dayandırılarak Salmonella'ların klasifikasyonunu sağlayan serotiplendirme sistemi geliştirilmiştir (Grimont ve ark 2000). Salmonella'ların antijenik klasifikasyonu

mevcut spesifik antijenik komponentlerinin belirlenmesi ile yapılmaktadır. Salmonella'lar "O" antijenleri ile serogruplara, "H" antijenleriyle de serovarlara ayrılır (Bekar 2003, İzgür 2006) .

"O" somatik antijenleri, bakterilerin hücre duvarındaki lipopolisakkarit katmanın polisakkarit kısmını oluşturur ve bakterinin virülensi ile ilişkilidir (Scanlan 1988). Salmonella'lar en az bir, genellikle birden çok sayıda "O" antijenine sahiptir. Somatik "O" antijenik yapısı, Salmonella'ların 60'dan fazla serogruba ayrılmasını sağlayan değişik faktörler içermektedir. Bu faktörler; 1, 2, 3, 4, 5, …. gibi sayılarla ifade edilmekte ve ortak antijenik faktörleri içeren Salmonella'lar aynı grup içerisinde toplanarak grup adları alfabetik harflerle (A, B, C_1, C_2, C_3, C_4, D_1 .…O67) isimlendirilmektedir. Şimdiye kadar 67 grup ortaya konulmuş olup, harfler yeterli gelmediği için harf + rakamla belirtilmiştir. Örneğin "O" somatik antijenin 9 ve 12 faktörlerini ortak içeren *S.* Typhi, *S.* Enteritidis, *S.* Pullorum ve *S.* Gallinarum bu gruplandırmada D_1 serogrubunda yer almışlardır (Bekar 2003, İzgür 2006).

Flagellar antijenler (H) protein yapısındadır. 60^{o}C'ın üzerinde ısıtılmakla, alkol, asit ve proteolitik fermentlerin etkisi ile tahrip olurlar. Formole dirençlidirler. "H" antijenleri birbirlerinden ayrı yapı ve karakterde değişik komponentlerden oluşmaktadır. Flagella antijenleri spesifik faz (Faz-1) ve grup faz (Faz-2)'ı olmak üzere iki grup altında incelenir. Faz-1 antijenleri Salmonella'larda çok az tür arasında ortaklık gösterir, özgüldür ve değişmezler. Faz-2 antijenleri ise birçok Salmonella'da bulunabildiğinden, "nonspesifik Faz" olarak da adlandırılmaktadır. Faz-1 antijenleri; a, b, c, ….z'ye kadar küçük harflerle veya rakamla, z1, z2,…… olarak gösterilmiştir. Faz-2 antijenleri ise sayılarla (1, 2, 3, …) ve bazen harflerle gösterilirler (n, x gibi antijenler hem birinci hem de ikinci safhada bulunurlar). Salmonella'ların "H" antijen grubundan sadece bir çeşit Faz antijen faktörlerini içerenler monofazik; hem Faz-1 ve hem de Faz-2 antijenlerini birlikte taşıyanlar ise difazik bakteriler olarak adlandırılmaktadır (Bekar 2003, İzgür 2006).

Salmonella cinsi bakterilerilerde; Vi-antijeni ve M-antijeni olmak üzere iki adet kapsül vardır. O-antijeni, S formundaki bütün Salmonella serotiplerinde bulunduğu halde Vi-antijeni; *S.* Typhi, *S.* Paratyphi C ve bazı *S.* Dublin suşlarında bulunur. Vi-antijeni, O-antijeni gibi bakterinin gövdesinde, ancak daha yüzeysel kısımlardadır. Bu nedenle Vi-antijenini içeren bakteriler homolog O serumlarıyla

aglutine olmazlar. Vi serumlarıyla aglutine olurlar. Vi-antijeni organizmadan yeni izole edilen *S.* Typhi suşlarında hemen her zaman bulunur. Fakat Vi-antijenini içermeyen suşlar da bulunabilir. Vi-antijeninin oluşumu bakteri suşlarından ziyade bakterinin ürediği besiyerine ve ısı derecesine bağlıdır. Salmonella'ların yüzeysel antijenlerinden polisakkarit yapısında M antijeni nadir olarak, mukoid koloni oluşturan Salmonella serotiplerinde bulunur (Rycroft 2000, Bekar 2003).

1.3.6. Toksinler

Salmonella'ların patogenezinde rol oynayan toksinler; endotoksinler, enterotoksinler ve sitotoksinler olmak üzere üç ayrı kategoride yer almaktadır. Konakçının bağırsak mukozasında yıkıma neden olan endotoksinler Salmonella'ların hücre duvarı lipopolisakkaridinin (LPS) lipit A kısmı ile bağlantılıdır. Bakteri hücresinin lize olması durumunda açığa çıkan endotoksin, kan dolaşımına karışarak ateşe neden olabilir. Salmonella enterotoksinleri epitel hücrelerde salgısal cevabı uyararak, bağırsak epitellerinden aşırı sıvı salınımına neden olmakta ve hayvanlarda elektrolit kaybı şekillenmektedir. Isıya dayanıklı Salmonella sitotoksini, protein sentezini inhibe ederek, intestinal epitel hücrelerinde yapısal hasarlara neden olmaktadır (Rycroft 2000, Gast 2003).

1.4. Epidemiyoloji

1.4.1. Konakçı

Tavuklar *S.* Pullorum ve *S.* Gallinarum'un doğal konakçılarıdır. Bununla birlikte; hindiler, beç tavuğu, bıldırcınlar, sülünler, güvercinler, serçeler ve papağanlarda bu etkenlere duyarlıdırlar. Ayrıca, pullorum enfeksiyonlarının kanaryalarda ve şakrak kuşunda, tavuk tifosunun da devekuşlarında ve tavus kuşlarında görüldüğü bildirilmiştir. Ördek, kaz ve güvercinlerin *S.* Gallinarum'a karşı duyarlılıkları değişkenlik göstermesine rağmen, genellikle etkene karşı direnç göstermektedirler. Ördeklerde deneysel olarak *S.* Pullorum ve *S.* Gallinarum enfeksiyonu oluşturulamamıştır (Arda ve ark 1990, Shivaprasad 2003). *S.* Pullorum; şempanze, tavşan, kobay, çinçilla, domuz, kedi, tilki, köpek, mink, yabani rat ve sığır gibi memelilerde doğal veya deneysel enfeksiyon oluşturabilirken, insanda nadiren bu etkene ait enfeksiyon saptanmıştır. Tavuk hatlarında pullorum hastalığına karşı duyarlılıkda önemli farklılıklar görülmektedir. Hafif ırklar özellikle leghornlar, ağır

ırklara (newhamshire vs.) göre daha dirençlidirler. Gençler erginlerden, dişiler erkeklerden daha fazla duyarlıdır. Dişiler, erkeklere göre daha büyük oranda taşıyıcı olarak kalmaktadırlar. Pullorum hastalığı genellikle gençlerde görülmekte ve 2-3 haftalık yaşta ölümlere yol açmaktadır. Erginlerde, özellikle kahverengi yumurtacılarda akut enfeksiyonlar nadiren gelişmektedir. Kanatlı tifosu ise ergin hastalığı olarak kabul edilmesine karşın, civcivlerde de yüksek mortaliteye yol açmaktadır. (Arda ve ark 1990, Shivaprasad 2003).

Kanatlılarda paratifo enfeksiyonuna neden olan serotiplerin spesifik konakçıları yoktur. Hem insanlarda hem de hayvanlarda enfeksiyonlara neden olurlar (Gast 2003, Arda 2006).

1.4.2. Bulaşma

Salmonellozis etkenleri vücuda, en fazla sindirim ve daha az olarak da solunum sisteminden ve deriden girerek hastalık oluştururlar. Etken, enfekte hayvanların gaitası, burun akıntıları, salyaları ve vertikal bulaşık yumurtaları ile dışarı çıkarak diğer kanatlıları ve çevreyi kontamine ederler. Salmonella'lar, vücut dışında ve uygun çevresel koşullarda, gaita içinde, altlıklarda ve sularda aylarca canlı kalabilir ve çoğalabilirler. Enfeksiyonun çıkış ve yayılışında; etkenle bulaşık cansız aracılar (yem, su, altlık, folluk, yem çuvallar, violler, yumurta artığı kabuklar, kümes tozları vs.) ve canlı aracılar (insanlar, evcil hayvanlar, yabani kuşlar, kemirgenler, böcekler, portör ve asemptomatik enfekte hayvanlar vs.) önemli rol oynamaktadır (Arda 2006).

Horizontal bulaşma sadece kanatlının kendi jenerasyonunu etkilememekte, özellikle *S.* Gallinarum ve *S.* Pullorum enfeksiyonlarında, yumurta kontaminasyonu ile bir sonraki nesillerinde enfekte olmasına neden olmaktadır. Etkenin ovuma yerleşerek ovulasyon öncesi ovullerde lokalize olması vertikal bulaşmanın başlangıcını oluşturur. Yumurta sarısındaki maternal antikor seviyesi, yumurta yoluyla etkenin taşınmasını etkilemektedir (Shivaprasad 2003). *S.* Pullorum ve *S.* Gallinarum vertikal yolla bulaşan başlıca serovarlar olup, diğer serovarlar da (*S.*Typhimurium, *S.* Enteritidis vb.) vertikal enfeksiyona yol açabilmektedir. Salmonella'ların horizontal veya vertikal biçimde yumurtaya geçebilmeleri, halk sağlığı açısından yumurtaları ön plana çıkartmaktadır (Poppe 2000).

1.5. Klinik Bulgular

Salmonella enfeksiyonlarında klinik bulgular konakçının yaşı, enfeksiyonun dozu, enfeksiyonun yolu, serovarın invazyon kapasitesine, tavuğun ırkına göre değişiklik göstermektedir (Arda ve ark 1990, Poppe 2000).

Kanatlılarda paratifo enfeksiyonlarının klinik bulguları yalnızca çok genç yaştaki kanatlılarda gözlemlenebilirken, ergin olanlarda intestinal kolonizasyon, sistemik yayılım gerçekleşse bile herhangi bir hastalık belirtisi veya ölüm görülmemektedir. Salmonella'ların yumurtayı enfekte etmesi yüksek oranda embriyonik ölümlere yol açmakta ve yumurtadan yeni çıkan civcivlerde klinik belirtiler görülmeksizin hızlı bir şekilde ölümler görülebilmektedir. Civciv yaşamının ilk iki haftalık döneminde mortalite ve morbidite yüksek olmasına rağmen, bu dönem sonrası gelişme geriliği dışında klinik bulgulara nadiren rastlanmaktadır. Genç kanatlılarda görülen paratifo enfeksiyonların belirtileri, akut septisemiye neden olan diğer bakteri enfeksiyonları ile diğer kanatlı Salmonella enfeksiyonlarına (pullorum hastalığı ve kanatlı tifosu) büyük bir benzerlik göstermektedir. Paratifo enfeksiyonlarında genellikle gözlemlenen klinik belirtiler; iştahsızlık ve bunun sonucu zayıflık, körlük, halsizlik, karışmış tüyler, titreme, ısı kaynağına yakın bir arada toplanma, diyare, dehidrasyon ve topallıktır (Gast 2003).

Tavuk tifosu, pullorum hastalığına göre daha çok yetişmekte olan ve yetişkin tavuklarda önem kazanan bir hastalıktır. Kuluçkalanma sırasında, *S.* Gallinarum veya *S.* Pullorum ile enfekte yumurtalarda kabuk altı veya kuluçka çıkışından kısa bir süre sonra ölümler gözlenebilir. Civcivlerde gelişme geriliği ve kloakanın etrafının beyaz dışkı ile kirlendiği görülür, hemen sonrasında ölümler gerçekleşir. Bazı vakalarda ise, yaşamlarının ikinci veya üçüncü haftasında mortalite pik seviyeye ulaşır. Pullorum hastalığında, akciğerlerin tutulumu sonucu güç soluk alma görülebilir. Hayatta kalanlarda gelişme geriliği gözlenir, taşıyıcı olarak kalırlar ve hastalığın bulaşma kaynağını oluştururlar (Arda ve ark 1990, Shivaprasad 2003). Akut kanatlı tifosunda, yem tüketiminde ani azalma, halsizlik ve tüylerde karışıklık gözlenebilir. Hastalığın ciddiyetine bağlı olarak, hem pullorum hem de tifo enfeksiyonlarında yumurta verimi, fertilite ve çıkım oranında azalma meydana gelebilir. Enfeksiyonun başlamasından sonra ölümler 4 gün içinde veya 5-10 gün arasında ortaya çıkabilir. Erginlerdeki en önemli semptomlar sırasıyla iştahsızlık, diyare, depresyon ve

dehidrasyondur. *S.* Pullorum'un oluşturduğu hastalıkta mortalite oranları % 0-100 olmasına karşılık, kanatlı tifosunda % 10-93 arasındadır (Shivaprasad 2003).

1.6. Patolojik Bulgular

Paratifoid Salmonella (PTS) enfeksiyonlarında; ergin kanatlılarda şiddetli sistemik tabloya rastlanmaz. Yumurtadan yeni çıkmış kümes hayvanlarında, şiddetli seyreden paratifo enfeksiyonlarında, hızlı gelişen septisemi hiçbir lezyona rastlanmaksızın yüksek oranda mortaliteye neden olabilir. Hastalık süreci uzadığında, ince bağırsak mukozasında fokal nekrotik lezyonlarla birlikte ağır enterit tablosu görülebilir. Genellikle dalak ve karaciğerlerde, bazen de böbreklerde büyüme ve kanamalar, sekumda kazeöz eksudat gözlenebilir. Fibrinoprulent perihepatitis ve perikarditis en çok bildirilen bulgulardandır. *S.* Enteritidis ile doğal enfekte yumurtacı sürülerde yumurtalık ve yumurta kanallarında fokal veya yaygın heterofil infiltrasyonları ile hafif inflamasyonlar görülebilir. Emilmemiş ve pıhtılaşmış sarı keseye rastlanabilir. Bazen panoftalmi, hipopiyon, purulent artritis, hava keselerinde yangı, tiflitis ve omfalitis gibi diğer lezyonlar da görülebilir (Arda ve ark 1990, Poppe 2000).

Pullorum ve tifo enfeksiyonlarında; civcivlerde, perakut vakalarda, hiçbir lezyon görülmeksizin ani ölümler meydana gelebilir. Tavuk tifosunda post-mortem muayenede; karaciğer, dalak ve böbreklerde büyüme, karaciğerde bronz bir renk değişimi, beyazımsı nekrotik odaklar, bağırsaklarda kanlı içerik, rektumda sarı sulu dışkı, kataral enterit, kalpte büyüme, kanama ve küçük beyaz odaklar, akciğerlerde kanamalar gözlenir (Poppe 2000). Pullorum hastalığında post-mortem muayenede, tavuklar zayıflamış ve anemiktir. Karaciğer soluk renkte, şişmiş, birçok küçük beyaz odaklar ve peteşiyal kanamalar görülebilir. Kursak ve bağırsaklar boştur. Sekum boş veya peynirimsi içerikle doludur. Sarı kese emilmemiştir. Hidroperikard, kalpte ve taşlıkta tümör benzeri beyaz nodüler lezyonlar gözlenebilir (Poppe 2000, Shivaprasad 2003).

1.7. Patogenez

Tavuk ve civcivlerde PTS enfeksiyonlarının ortaya çıkışı genellikle üç aşamadan oluşmaktadır. Oral yolla giriş yapan paratifoid Salmonella'lar önce bağırsaklarda kolonize olmakta ve dışkı ile saçılım gerçekleşmektedir. İkinci

aşamada, gastrointestinal organlardan sonra dalak ve karaciğer makrofaj-fagosit sisteminde çoğalmaları ile çeşitli iç dokularda kolonizasyon gerçekleşmektedir. Üçüncü aşamada ise bakteriyemi sonucu bazen yüksek mortalite ortaya çıkabilir (Poppe 2000, Gast 2003).

Salmonella'lar, intestinal epitel hücrelerin tamamına yerleşebilse de, özellikle sekum ve ileosekal bölgeye affiniteleri vardır. Bir günlük civcivlerin *S.* Enteritidis ile oral inokulasyonundan sonra, villilerin uçlarındaki epitel hücrelerde etken tespit edilmiştir. İntestinal epitel hücrelerin Salmonella ile invazyonu, intestinal içeriğin akışkanlığını ve elektrolit dengesini değiştirerek, hücrelerin ölümüne ve şiddetli ishal gibi bozukluklara yol açmaktadır. Salmonella'lar özellikle karaciğer ve dalak olmak üzere iç organlarda canlılıklarını koruma ve çoğalabilme yeteneğindedirler. Yumurtacı ırklarda etkenin lokalizasyonu; seksüel olgunlaşmanın başlangıcında, reprodüktif kanalda özellikle, ovaryum ve ovidukda olmaktadır (Poppe 2000, Gast 2003).

Civcivlerde oral uygulanan Salmonella'ların dozu ile mortalite insidensi ve intestinal kolonizasyon arasında sıkı bir korelasyon vardır. Tavukların doğal PTS enfeksiyonların da, mortalitenin 3-7 günlük yaşlarda pik seviyeye ulaştığı, intestinal kolonizasyon ve iç organ invazyon sıklığı kuluçkadan yeni çıkmış civcivlerde büyük yaştaki tavuklara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. *S.* Enteritidis suşunun oral yolla verildiği civcivlerde, etkenin iç oganlarda persiste kalma oranı yaşla ilişkili olarak azalmaktadır (Poppe 2000, Gast 2003).

1.8. Teşhis

1.8.1. Etken İzolasyonu

Salmonella'ların izolasyonunda öncelikli olarak dalak, karaciğer ve sekum gibi iç organlar tercih edilebileceği gibi, bunlara ek olarak akciğer, kalp ve pankreas da tercih edilebilir. Eğer lezyonlar reprodüktif organlarda bulunuyorsa, bu organlar ve over folikülleri marazi madde olarak kullanılabilir. Bunların yanında yumurta ve kümes içi materyaller (dışkı, altlık, kümes tozu) izolasyon için kullanılmaktadır (Shivaprasad 2003, OIE 2010, 2012). *Salmonella* spp.'ler kanatlılarda sürekli bağırsaklarda kolonize olduklarından, kloakal sıvaplar ve etkenin aralıklarla dışarı

atılması nedeniyle sürme sıvaplar, altlık örnekleri izolasyon amacıyla kullanılmaktadır (Gast ve Beard 1990, OIE 2010, 2012).

Salmonella'ların izolasyonlarında, enfekte kanatlıların iç organlarından zenginleştirme besi yerlerine gerek duyulmaksızın selektif olmayan ve selektif agarlara (Kanlı agar, MacConkey agar v.b.) direkt olarak ekim yapılabilirse de, geliştirilen standart metotlar 3 farklı özellikte besi yeri kullanılarak gerçekleştirilir:

Ön zenginleştirme besiyerleri; etken sayısının az olabileceği örneklerde (aseptomatik hayvanların dışkıları, çevresel örnekler, hayvan yemi) veya etkenin zarar gördüğü durumlarda gereklidir. Bu tür besi yerleri, dışkıdan yapılan izolasyonlarda, diğer organizmaların da üremesini arttıracağından tavsiye edilmemektedir. Bu amaçla, Nutrient broth, tamponlanmış peptonlu su (TPS) gibi besiyerleri kullanılır.

Selektif zenginleştirme besiyerleri; diğer bakterileri inhibe ederken, Salmonella üremesine izin verirler. Sıvı ya da yarı katı (hareketli Salmonella serotipleri için) halde olabilirler. Örnek olarak; Selenit F, Tetratihionate, Rappaport-Vassiliadis (RVS) brothlar ve diagnostic Salmonella (DIASALM), modifiye semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) gibi yarı katı agarlar kullanılır.

Selektif besi yerleri; Diğer organizmaların üremesini inhibe ederken, Salmonella'ların biyokimyasal özellikleri ile ayırt edilmesini sağlarlar. Deoxycholate/citrate agar (DCA), Brillant green agar (BGA), Xylose-lysine-deoxycholate agar (XLD), Rambach agar (Bekar 2003, OIE 2010, 2012) ve Xylose-Lysine-Tergitol-4 (XLT4) agar *Salmonella* spp. izolasyonunda da hassas sonuçlar elde edilen besi yerleridir (Miller 1991).

1.8.2. İdentifikasyon

İzole edilen suşun identifikasyonu biyokimyasal, serolojik veya moleküler testlerle yapılabilir (OIE 2010, 2012).

Klasik identifikasyon metotlarında, saf kültürden Gram boyama, hareket muayenesi ve bazı biyokimyasal testler yapılır. Bunlar; dekstroz, laktoz, sukroz, mannitol, maltoz, dulsitol, malonat, gelatin, üre, sitrat, ornithine dekarboksilaz,

Metil–Red ve Voges–Proskauer, potasyum siyanid (KCN), O–nitrophenyl-beta-D–galaktopyranside (ONPG), indol, hidrojen sulfid testleridir (Bekar 2003).

Son yıllarda, bakteriyel identifikasyon amacı ile, API (Biomerieux), Enterotube (Becton-Dickinson), Minitek (BBL Microbiology), Crystal ID (Bacto Laboratories), MicroID (Remel), RapID (Rapid), Biolog (Biolog Systems) ve Vitek (Biomerieux Diagnostics) gibi çeşitli minyatürize ticari tanı sistemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler, önceleri enterik bakterileri identifiye etmek için tasarlanmışken daha sonraları fermentatif olmayan bakteriler, Gram pozitifler, anaeroblar ve mayaların identifikasyon ve antibiyogramlarını yapabilecek şekilde geliştirilmiştir. Bu sistemler laboratuarların çok sayıda kültür işlenmesi gereken çalışmalarında ve araştırma çalışmalarında kullanılabilmektedir (Aras 2011). Bu identifikasyon sistemlerinin, doğruluk düzeyleri çeşitli çalışmalarla değerlendirilmiş ve önemli derecede yüksek performans gösterdikleri bildirilmiştir **(**O'Hara ve ark 1993, O'Hara ve ark 1997, Shetty ve ark 1998, Hansen ve ark 2002, Jin ve ark 2011).

Salmonella'ların biyokimyasal özelliklerini gösteren izolatların serotiplendirilmesinde; öncelikle "O" grubu antiserumların karışımı kabul edilen Salmonella polivalan antiserumu ile aglutinasyon testi yapılır, test sonucu pozitif ise, incelenen etkenin *Salmonella* spp. olduğu kabul edilerek, "O" spesifik grup antiserumları (A, B, C, D,…..) ile bu etken tekrar aglütinasyona tabi tutulur. Flagellar "H" antijenine sahip hareketli Salmonella etkenlerinde, bu testlere ilaveten Faz-1 ve Faz-2'ye ait antiserumlar da kullanılarak izole edilen etken serotip düzeyinde identifiye edilir (İzgür 2006).

Geleneksel teşhis yöntemlerinin yanısıra Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) gibi moleküler temelli testler de Salmonella identifikasyonunda doğrulama amaçlı kullanılmaktadır (OIE 2010, 2012).

Bakterilerin tiplendirilmesinde kullanılan fenotipik yöntemlerin başlıcaları biyotiplendirme, serotiplendirme, bakteriyofaj tiplendirme, bakteriyosin tiplendirme ve antibiyotik duyarlılık profilidir. Fenotipik yöntemler, iş yükü fazla, uzun zaman alan, çoğunlukla değişken sonuç veren yöntemlerdir. Bu durum araştırmacıları, ayırım gücü daha yüksek olan genotiplendirme yöntemlerini kullanmaya

yöneltmiştir. Bu konuda ilk çalışmalar plazmit profilinin belirlenmesi iken bu yöntem yerini kromozomal DNA üzerinde yoğunlaşan; moleküler tiplendirme yöntemlerinde altın standart kabul edilen Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) başta olmak üzere, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Repetitive element palindromic (REP), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), Amplified fragment length polymorphism (AFLP) gibi yeni moleküler yöntemlere bırakmıştır (Durmaz 2001, Arda 2011b).

RAPD yöntemi son zamanlarda Salmonella suşlarında moleküler genotipik benzerlik veya farklılıkların ortaya konulması için kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem, PZR ile Guanin + Sitozin içeriği yüksek olan ve spesifik bir gen bölgesini değil de genomik DNA üzerinde birçok gen bölgesine komplementer 10-15 bazlık kısa primerler kullanılarak genomik DNA'nın çoğaltılması ve agaroz jel elektroforezinde yürütülerek bantların görüntülenmesi temeline dayanır. Oluşan bantların sayı ve dizilişlerindeki benzerlik ve farklılıklara bakılarak, çeşitli Salmonella serotiplerinin birbirinden ayrılmasında veya serotipler içindeki suşların alt tiplere ayrılmasında kullanılmaktadır. Yöntemin tekrarlanabilirliği ile ilgili bazı görüşler öne sürülmüş, ancak yöntemin uygun primerler kullanıldığında, amplifikasyon ve saptama basamaklarının her zaman aynı koşullar altında yapıldığında hızlı, tekrarlanabilir ve ayırım gücü yüksek bir yöntem olduğu ortaya konulmuştur (Erdem ve ark 2007).

Lin ve ark. (1996), Betancor ve ark (2004), Morshed ve Peighambari (2010) çeşitli primerlerle (23L, OPB-17, OPA-4, P1254, OPB-6, OPB-15, MK22) uyguladıkları RAPD PZR analizinin *S.* Enteritidis*'* in alt tiplendirmesinde etkili bir metot olduğunu bildirmişlerdir.

1.8.3. Serolojik Testler

Salmonella enfeksiyonlarına karşı oluşan antikor cevabı tespit etmek amacıyla birçok serolojik testten faydalanılmaktadır. Bunlar; çabuk kan aglutinasyon testi, çabuk serum/lam aglutinasyon testi (RST), tüp aglutinasyon testi, mikro-aglutinasyon testi ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) tekniğidir

(OIE 2010, 2012). En yaygın kullanımda olanlar ise RST ve ELISA teknikleridir (Barrow 2000, Gast 2003).

S. Enteritidis enfeksiyonlarının serolojik olarak teşhisinde klasik aglutinasyon testleri sıkça uygulanmaktadır. RST'de *S.* Pullorum'dan hazırlanan antijenler kullanılmaktadır. Bu antijenlerle yapılan testlerde *S.* Enteritidis'e karşı gelişen antikorların saptanması; *S.* Enteritidis, *S.* Gallinarum ve *S.* Pullorum'un ortak O antijenlerinin (1, 9, 12) kross reaksiyonuna dayanmaktadır. Esas reaksiyona katılan bu serotiplerde ortak bulunan O=12 antijenidir (Gast 2003).

Salmonella' nın teşhisinde bakteriyolojik metoda göre serolojik metodun en büyük avantajı; etken aralıklarla atılırken, serum immunglobulin G (IgG) konsantrasyonlarının genellikle kalıcı olmasıdır. Dezavantajı, serum IgG konsantrasyonu enfeksiyondan hemen sonra (artan olmasına rağmen) düşük olurken, bakteriyel atılım maksimumda olabilir. Ayrıca, genel olarak invaziv olmayan serovarlar serolojik olarak tespit edilemeyebilir. Bu nedenle, serolojik testler esas olarak kümes hayvanlarında; *S.* Enteritidis, *S.* Pullorum, *S.* Gallinarum serovarları ve bütün türlerde *S.* Typhimurium gibi invaziv serovarlar için uygulanabilir (Barrow 1992).

ELISA tekniği, tavuk sürülerinin taranması için çok uygun bir yöntem olup, aynı zamanda oldukça duyarlı ve hızlı bir test olarak kabul görmektedir (Hassan ve ark 1990, Gast ve Beard 1990, Poppe 2000, Barrow 2000). Aglutinasyona dayalı testlerde öncelikli olarak IgM saptanırken, ELISA'da kullanılan konjugata bağlı olarak daha çok IgG saptanmaktadır (Diker 2005). *S.* Enteritis'e spesifik IgG (IgY) tespitinde, indirek ELISA ve kompetitif sandviç ELISA olmak üzere başlıca iki temel sistem vardır. İndirek ELISA için; LPS, flagella, SEF14 fimbriya, dış membran proteinleri gibi çeşitli antijenler kullanılarak çalışılmıştır (Thorns ve ark 1996, OIE 2010).

Kullanımda olan ELISA'ların çoğu ekstrakte edilmiş yüzey antijenleri veya LPS temellidir. Bu kitler yeterli sensitiviteye sahipken, yanlış pozitif reaksiyonlar görülebilmekte ve Salmonella serotipleri arasında ayırımı sağlayamamaktadır (Nicholas ve Cullen 1991, Barrow 2000). Flagellar antijen kullanılan ELISA'lar ise oldukça yüksek spesifiklik göstermekle beraber (Timoney ve ark 1990, van

Zijderveld ve ark 1992), flagellar antikorların, kanatlılarda LPS spesifik antikorlar kadar uzun süreli kalmaması testin sensivitesini düşürmektedir. Dış membran proteinleri temelli ELISA'lar deneysel enfeksiyonların tespitinde oldukça başarılı kabul edilirken, diğer Salmonella serotipleri ile kros reaksiyon gösterebilmektedir (Kim ve ark 1991).

1.9. Antibiyotiklere Duyarlılık

Kanatlı hayvanlarda Salmonella enfeksiyonlarından gerek korunma ve gerekse tedavide antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bilinçsiz ilaç kullanımı, gelişmeyi artırıcı ve koruyucu amaçla düşük doz antibiyotik uygulaması gibi faktörlere bağlı olarak gelişen antibiyotik dirençli Salmonella suşlarının giderek artması, insanlar ve hayvanlar için önemli bir sağlık sorunudur (Gast 2003, Shivaprasad 2003, Temelli ve ark 2012).

Ülkemizde, kanatlı Salmonella izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirildiği çalışmalarda;

Kalender ve Muz (1999), Salmonella izolatlarının çoğunlukla enrofloksasin, gentamisin, neomisin ve streptomisin'e karşı duyarlı olduğunu saptamışlar ve bütün suşların enrofloksasine duyarlı, penisiline dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Kılınç ve Aydın (2006), Salmonella izolatlarının daha çok norfloksasin, danofloksasin, gentamisin, trimetoprim/sülfametoksazol ve amoksisilin'e karşı duyarlı olduğunu saptarken, eritromisin, penisilin, ampsilin ve neomisin'e karşı bir çoğunun direnç geliştirdiğini bildirmişlerdir.

Türkyılmaz ve ark (2007), Salmonella izolatlarının çoğunlukla danofloksasin, trimetoprim-sulfametoksazol, tetrasiklin ve kanamisin'e duyarlı olduğunu saptarken, penisilin G, eritromisin gentamisin, ampisilin'e dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Oral ve ark (2008), Salmonella izolatlarının çoğunlukla enrofloksasin, kolistin sulfat, oksitetrasiklin, gentamisin, amoksisilin ve doksisilin'e duyarlı olduğunu tespit ederken, linkomisin, spektinomisin, neomisin ve trimetoprim-sulfametoksazol'e dirençli bulmuşlardır.

Temelli ve ark (2012) Salmonella izolatlarının; eritromisin, spiramisin, penisilin G, doksisiklin hidroklorür ve tetrasiklin'e %100 dirençli olduğunu bulurken, izolatların %55'nin antimikrobiyallere çoklu ilaç direnci gösterdiğini bildirmişlerdir.

1.10. Bağışıklık ve Aşılama

Bağışıklık sistemi, her ne kadar birbirinden ayrılmasa da, enfeksiyon ajanlarına karşı koymada; doğal savunma (Doğal bağışıklık, doğal direnç, nonspesifik immünite) ve kazanılan bağışıklık (edinsel, spesifik, özgül bağışıklık) olmak üzere iki önemli mekanizma etkin rol oynar (Erganiş ve İstanbulluoğlu 2002, Arda 2006).

Kazanılan bağışıklık sonradan elde edilen, spesifik ve vücudun humoral ve hücresel savunma sistemlerince oluşturulan bağışıklık şeklidir. Pasif bağışıklık ve aktif bağışıklık olmak üzere iki önemli karakter taşır (Erganiş ve İstanbulluoğlu 2002). Pasif bağışıklık mekanizması (maternal immünite), önceden aşılanarak, bir hastalığa karşı spesifik aktif bağışıklık kazanmış anaçların kanlarında bulunan spesifik antikorlardan (IgM, IgG=IgY, IgA) immunglobulin G'ler (IgG=IgY) yumurta sarısına buradan da embriyo ve civcive geçerek hayatlarının ilk günlerinde civcivi enfeksiyona karşı koruma özelliğine sahiptir. Aktif bağışıklık mekanizması; doğal (enfeksiyon sonrası) ve yapay aktif bağışıklık (biyolojik maddeler-aşı) olmak üzere 2 şekilde gelişir. Her iki bağışıklık durumunda da hem humoral (antikor), hem de hücresel bağışıklık ürünleri sentezlenir (Arda 2006).

Humoral immun cevap; B lenfositlerin antjenle uyarılması sonucu antikor üretmesini sağlayan immun cevap şeklidir. Hücresel immun cevap; T lenfositlerin (yardımcı T, sitotoksik T, baskılayıcı T, bellek T) uyarılması sonucu lenfokinler adı verilen birçok mediatör madde (interlökinler, tümör nekroz faktörü, transfer faktör, inhibisyon faktörü, kemotaksik faktör, immun interferonlar v. b.) sentezlemelerini sağlayan immun cevap şeklidir (Erganiş ve İstanbulluoğlu 2002, Diker 2005).

Fakültatif intraselüler patojenlerde immun cevabın gelişmesi genel olarak aynı mekanizmayla gerçekleşmektedir. Salmonella ile enfekte olan hayvanlarda hızla gelişen humoral immun cevabı etkileyen bir çok faktör vardır. Bunlar; konakçının yaşı, organizmanın dozu, virülensi ve giriş yoludur (Barrow 2005,

Barrow 2007). Virülent ve attenüe Salmonella suşlarına karşı immun cevabın gelişimi ilgili çalışmalar genellikle farelerle gerçekleştirilirken, aksine tavuklarda çok daha az bilgi edinilmiştir (Van Immersel ve ark 2005). Genç hayvanlarda, enfeksiyona karşı cevap zayıf olmakta veya farklı determinantlar için seçici bir cevap gelişmektedir. Tavuk serumlarında enfeksiyondan sonraki 1 hafta içinde antikor cevabı tespit edilebilirken, 10 hafta veya daha fazla kalıcı olabilmektedir (Gast ve Beard 1990, Hassan ve ark 1991, Chart ve ark 1992). İlk belirlenen antikorlar IgM daha sonra IgG ve IgA'dır. IgM ve IgA düzeyleri yavaş yavaş düşerken, IgG düzeyi uzun bir süre devam etmektedir (Hassan ve ark 1991, Chart ve ark 1992). Reenfeksiyon sonucunda, hızlı ve büyüyen antikor cevap görülmektedir (Holt 2000).

Salmonella hücresi içinde veya üzerinde çeşitli antijenik determinantlar bulunmaktadır. Enfeksiyon veya aşılamayı takiben gelişen immun cevap sürecinde bazı antijenler immunodominant olabilmekte ve diğerlerine karşı cevabın başlatılmasını geciktirebilmektedir (Hold 2000). *S.* Enteritidis ile enfekte tavuklarda, başlangıçta anti-flagellum antikor titresi yüksek iken, sonraki aşamada lipopolisakarit (LPS) antikor titresi yüksek bulunmuştur. Genç kanatlılarda, flagella ve LPS antijenlerine karşı antikor cevap zayıf olurken, yetişkin tavuklarda güçlü bir cevap gelişmektedir. Civcivlerde, fimbriyal antjene karşı güçlü bir cevap gelişirken, yetişkin kanatlılarda orta derecede bir cevap gelişmektedir (Thorns ve ark 1996). Hücre duvarı antijenleri ve dış membran proteinlerine karşıda güçlü antikor cevabı tespit edilmiştir (Hassan ve ark 1991, Kim ve ark 1991). Bu determinantlara karşı gelişen antikor cevabın konakçıyı koruyup korumayacağı belirgin değildir (Holt 2000).

Antikor cevabın özgüllüğü farklılıklar göstermektedir. Farklı Salmonella serovarları ile enfekte hayvanlarda LPS için gelişen antikor cevapta çapraz reaksiyon görülmektedir (Barrow 1992, Barrow ve ark 1992). Çünkü, birçok Salmonella serovarının somatik antijeninde 12 antijeni bulunur (Chart ve ark 1990). Birçok Salmonella serovarında flagellum antijenlere karşı bir dereceye kadar çapraz reaksiyon meydana gelişirse de, daha az belirgindir. Belli Salmonella türlerinin antijenik determinantları türe özgüdür ve bu antijenlere karşı oluşan antikorlarda tür spesifiktir (Thorn ve ark 1996, Holt 2000).

Salmonella enfeksiyonu başladığında, öncelikle humoral immun cevabın önemli bölümününü oluşturan mukozal yüzeylerde immun cevap gelişir. Mukozal bağışıklık da IgG ve/veya IgM tepkileri aynı zamanda gözlenebilirse de, baskın olan immunglobulin IgA'dır. IgA hem safra hemde mukozal salgılarda bulunabilir ve hem monomerik hemde polimerik formda olabilir (Smith ve Beal 2008). Tavuklarda bağırsaklar veya safrada; flagella, LPS veya dış membran proteinine (OMP) karşı güçlü mukozal immun cevap, eprüvasyondan 2-3 hafta sonra görülebilir (Holt 1992, Holt 2000).

Salmonella'ya karşı korunmada hem hücresel hem de humoral cevaba ihtiyaç vardır. Fakat, Salmonella'nın tamamen ortadan kalkması için hücresel cevaba da ihtiyaç vardır (Collins 1974, Horacio 2011). Salmonella ile enfekte hayvanlarda, humoral cevabın ortaya çıkması ile birlikte hücresel cevapta tespit edilebilmektedir. Bir çok vakada serum antikor titresi ile hücresel immun cevap arasında iyi bir korelasyon tespit edilmemiştir. Canlı Salmonella aşısı uygulanan hayvanlarda güçlü hücresel immun cevap gelişirken ve iyi koruma sağlarken, serum antikor titresi çok tespit edilememiş veya düşük bulunmuştur. Bakterin aşılar letal eprüvasyona karşı korumada zayıf kalırken, canlı aşılar mükemmel koruma sağlamaktadır. Bu durum hücresel bağışıklığın önemini göstermektedir (Holt 2000).

Kanatlılarda Salmonella enfeksiyonlarının kontrolünde, uzun yıllardan beri bir çok aşı çalışması yapılmıştır (Wilson 1956, Arda ve ark 1969, Barrow ve ark 1991, Cooper ve ark 1992, Hassan ve Curtis III 1994, Solmaz 1998, Meenakshi ve ark 1999, Hahn 2000, Springer ve ark 2000, Methner ve ark 2001, Khan ve ark 2003). Aşıların etkinliği; aşılama ve eprüvasyon sonrasında mortalite, morbidite, intestinal ve sistemik kolonizasyon oranlarına bakılarak değerlendirilir. Yine de, koruma oranı; eprüvasyon suşu, uygulama yolu, enfeksiyon dozu, kanatlının yaşı, türü/hattı gibi etkenlere bağlı olarak değişebilmektedir. Sonuç olarak, aşıların etkinliklerini tam olarak karşılaştırmak zordur (EFSA 2004, Barrow 2005, 2007). Davies ve Breslin (2003), aşı performansının, kemirgen kontrolü veya sanitasyon problemlerine bağlı olarak değişebildiğini, Nakamura ve ark (1994), yem veya su kısıtlaması ve ısı gibi çevresel faktörlerin aşı performansını bozabileceğini bildirmişlerdir.

Ciddi sistemik hastalığa yol açan konakçı spesifik serotiplere (*S*. Gallinarum) karşı uygulanan aşılar oldukça güçlü serotip spesifik koruyucu bağışıklığı uyarmıştır. Bunun aksine konakçı spesifik olmayan serotipler için uygulanan aşılarda başarı oranları farklılıklar göstermiştir. Bu farklılıkta, iki enfeksiyon tipinin farklı epidemiyolojiye ve patojeniteye sahip olması yanında, sistemik ve intestinal enfeksiyonlara karşı gelişen immun cevabın doğasından kaynaklanmaktadır (Barrow 2000, 2005, 2007). Bir çok ülkede pullorum hastalığının ticari kümeslerden çoğunlukla eradike edilmesi ve eradikasyon programının mecburi uygulanması nedeniyle, hastalığın aşı ile kontrolünde ve aşı üretimiyle ilgili az sayıda çalışma yapılmıştır (Gast 2000).

Salmonella'lara karşı aşı geliştirme çalışmalarının başlangıcında, çeşitli metotlar ve farklı adjuvantlar denenmiştir (Solmaz 1998). Salmonella bakterilerinin çeşitli suşlarından, ölü (bakterin) aşı (Wilson 1956, Arda ve ark 1969, Gast ve ark 1992, Solmaz 1998, Miyamoto ve ark 1999, Liu ve ark 2001, Clifton-Hadley ve ark 2002), subünit (dış membran proteinleri, ribozom) aşı (Eisenstein 1975, Bouzouba ve ark 1987, Bouzouba ve ark 1989, Charles ve ark 1993, Solmaz 1998, Meenakshi ve ark 1999, Khan ve ark 2003) ve attenüe canlı aşı (Williams 1956, Harbourne 1957, Cooper ve ark 1990, Barrow ve ark 1991, Cooper ve ark 1992, Hassan ve Curtis III 1994, Hahn 2000, Springer ve ark 2000, Methner ve ark 2001) çalışmaları yapılmıştır.

İnaktif Salmonella aşıları çok farklı başarı oranlarına sahiptir. Otovaksin olarak da yaygın kullanım alanına sahip olmuşlardır. Bu tipte aşılar güçlü antikor cevabı uyarırken, Th1 ve bazı durumlarda Th2 uyarımında yetersiz kalmışlardır (Mastroeni 2000, Barrow 2007). Ayrıca intestinal kolonizasyonu, fekal saçılımı, sistemik dağılımı ve yumurta kontaminasyonunu önlemede kısmi koruma sağlamışlardır. Güçlü adjuvantların kullanımı ile (yağ emülsiyon, Freund's incomplate adjuvant vb.) koruma özellikleri büyük oranda geliştirilmiştir (Mastroeni ve ark 2000, Gast 2003, Barrow 2007).

Deneysel çalışmalarda; tam hücre (bakterin) inaktif aşılar, bazı subunit aşılar ve pasif olarak verilmiş B hücreleri veya antikorlar, yüksek dozda virülent Salmonella'larla eprüvasyona karşı, doğuştan Salmonella'ya dirençli hayvanları koruyabilmektedir. Doğuştan hassas olan hayvanları ise düşük dozlardaki

eprüvasyona veya az virülent Salmonella enfeksiyonlarına karşı koruyabilmektedir. Ortalamanın üstü sayılabilecek yeteneklerine rağmen, canlı olmayan aşılar insanlarda ve hayvanlarda uygulanmış ve hala yaygın olarak kullanılmaktadır (Mastroeni ve ark 2000).

Solmaz (1998), *S.* Gallinarum protein ekstraktı, *S.* Enteritidis bakterin, *S.* Gallinarum-*S.* Enteritidis bivalan ve ticari *S.* Enteritidis bakterin aşılarının etkinliğini araştırdığı çalışmasında, aşıların belli bir oranda koruma sağladığını, çeşitli serolojik testlerle yaptıkları antikor titresi tespitlerinde homojenlik görülmediğini, antikor titresi seviyesinin enfeksiyona karşı koruyuluculuğu belirlemede tek ve doğru kriter olmadığını, aşıların etkinliğinin değerlendirilmesinde eprüvasyonlara karşı koruyuculuğun ön planda olduğunu bildirmiştir.

Woodward ve ark (2002), *S.* Enteritidis (Salenvac) bakterin aşıyı kullanarak, 1 haftalık ve 4 haftalık yaşta yumurtacı tavukları kas içi yolla aşılayıp, 8 haftalık, 17 haftalık, 23 haftalık ve 30 haftalık yaşlarda *S.* Enteritidis PT4 suşu ile intravenöz (İV) yolla eprüve etmişlerdir. Aşılı grubun iç organlarında %12,5 oranında kültür pozitiflik belirlerlerken, aşısız grupta bu oranı %28 olarak tespit etmişlerdir.

Babu ve ark (2004), *S.* Enteritidis'in organlardan temizlenmesinde ölü ve canlı aşıların etkinliğini karşılaştırdıkları çalışmalarında; 2 ve 4 haftalık yaşta 2 kez aşıladıkları tavukları, 6 haftalık yaşta *S.* Enteritidis suşu ile oral yolla eprüve edip, eprüvasyondan 1 hafta sonra gelişen hücresel ve antikor cevabı ve fekal saçılım oranlarını değerlendirmişlerdir. Canlı aşı ile aşılılarda dalak lenfosit proliferasyonunun daha yüksek olduğunu ve bu durumun büyük oranda fekal saçılımı azalttığını bildirmişlerdir. Ölü aşı ile aşılananlarda yüksek düzeyde antikor titresi tespit ederken, canlı aşı ile aşılananlarda kontrol grubuna yakın antikor titresi tespit ettiklerini, *S.* Enteritidis enfeksiyonlarına karşı antikor cevabın bir koruyuculuk sağlamadığını bildirmişlerdir.

Canlı aşıların etkinliği, kapsamlı olarak fareler ve tavuklar üzerinde test edilmiş, avirülent Salmonella aşı suşlarının ölü ve subunit aşılara göre daha immünojen olduğu kanıtlanmış ve bu yönde aşıların geliştirilmesi hız kazanmıştır (Collins 1974, Zhang-Barber ve ark 1999).

Attenüe canlı aşılar, aşılanmış kanatlıda tüm dokulardan temizlenmeden önce koruyucu immun cevabı uyaracak yeterlilikte persistant olmalıdır (Gast 2007). Etkili canlı aşılar kullanıldığında, immünolojik hafızayı da içeren serotip spesifik uzun süreli immünite elde edilmektedir. İmmünize hayvanlarda sekonder enfeksiyon süresince retiküloendotelial sistemde (RES) bakteriyel üremenin kontrolü, TNF-α, IFN-γ ve IL-12 gibi sitokinlerin katılımıyla hem $CD4^+$ hemde $CD8^+$ T hücreleriyle gerçekleştirilir. T hücreleri ve antikorlar, virülent Salmonella' lara karşı tek başlarına yalnızca orta derecede immünite sağlayabilirler (Mastroeni ve ark 2000, Barrow 2007).

İlk canlı Salmonella aşıları spontan mutantlardan veya deneysel olarak kimyasal veya ultraviole mutagenez yoluyla elde edilen suşlarla çalışılmış ve bu aşıların birçoğunun immunojenik ve koruyucu olduğu kanıtlanmıştır (Mastroeni ve ark 2000). *S.* Enteritidis'e karşı profilaktik amaçla, öncelikle *S.* Gallinarum'a karşı geliştirilmiş olan spontan mutant canlı *S.* Gallinarum 9R aşısı kullanılmıştır. Aşının, *S.* Enteritidis ve aynı serogrup üyelerine karşı koruma sağlayabildiği gösterilmiştir (Gast 2003).

Mutant canlı aşılar; moleküler teknoloji ve Salmonella virülens genetiği bilgilerinde son ilerlemeler sayesinde, bakteriyel genom içerisinde çok yönlü, ayırt edilebilir ve geriye dönüşümsüz mutasyonlarla elde edilen aşılardır. Konakçıda Salmonella'nın canlılığını sağlayan bir çok gen identifiye edilmiştir. Bunlar, "House keeping genler" (LPS, OMP gibi bakteriyel yapı komponentlerini veya purin, primidin, histidine, methionin, aromatik aminoasitler gibi esansiyel metobolitleri sentezleyen genler) ve 'True virülens genler' (konakçı savunma mekanizmasına karşı bakteri direncini sağlayan genler) olmak üzere iki çeşittir (Mastroeni ve ark 2000).

Bilinmeyen mutasyonlar veya belirli mutasyonlar ile oluşturulan çeşitli canlı zayıflatılmış Salmonella suşlarının, aşı adayı olarak değerlendirilmesi yönünde çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Çizelge 1.1.) (Sign 2009).

Çizelge 1.1. Salmonellozisin kontrolünde kullanılan attenüe canlı aşı adayları (Sign 2009).

Hücre duvarı lipopolisakarit zincir (Rough suş)	9R (rough) *S.* Gallinarum	Tavuk	12-32 haftalık yaşta uygulama sonrası; *S.* Typhimurium ve *S.* Enteritidis'e karşı çapraz koruma. Adjuvantlar korumayı etkilemekte. Aşılamadan iki ay sonra etkinlikte azalma.
galE mutant	*S.*Typhimurium	Fare	Homolog eprüvasyonda fekal saçılımda önemli derecede azalma. Humoral immun cevap önemsiz.
aroA mutant	*S.*Typhimurium *S.* Enteritidis	Fare Tavuk	Mükemmel bağışıklık fakat uzun süreli taşıma. Oral aşılama IV eprüvasyona karşı koruma . Geçici ishal. Kanda aşı suşunun tespiti. Parenteral inokulasyonda yüksek ateş.
Δcya Δcrp mutant	*S.* Typhimurium	Fare	Aşılama sonrası 4 aya kadar koruma (10^9 cfu .eprüvasyon) Güçlü mukozal, hücresel ve humoral cevap.
PhoP-phoQ- mutant	*S.* Typhimurium	Fare	İmmunojenik bulundu. Virülent forma dönüşme riski oldukça yüksek.
vPla- mutant	*S.* Typhimurium	Fare	İmmunojenik bulundu. Virülent forma dönüşme riski var.
nuoG mutant	SG9NGK- *S.* Gallinarum	Tavuk	% 75 yüksek koruma
aroA-secC- mutant	*S.* Gallinarum	Tavuk	% 100 koruma (homolog eprüvasyon)
dam mutant	F98- *S.* Typhimurium	Tavuk	Oldukça attenüe. *S.* Enteritidis'e karşı çapraz koruma.
dam-phoA- mutants	ZJ111, *S.* Typhimurium	Tavuk	Etkili ve güvenli (homolog eprüvasyon)
dam-aroA- mutants	*S.* Typhimurium	Fare	Etkili ve güvenli (homolog eprüvasyon)

Çeşitli attenüasyon stratejileri canlı Salmonella aşısı üretmek amacıyla denenmiş ve genellikle tavuklar üzerinde oral yolla uygulanmıştır. *S.* Enteritidis mutant aşı denemeleri en fazla oksotrofik mutantlar ile gerçekleştirilmiştir. Bu Salmonella mutantları, memeli dokularında ve kültüre makrofajlarda üreme yeteneklerini kaybetmişlerdir. Çeşitli *Salmonella* Enteritidis aroA mutantları, dışkı ile saçılımı, horizontal bulaşmayı ve yumurta kontaminasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. Bu korumanın 6 aya kadar sürdüğü bildirilmiştir (Cooper ve ark 1994, Gast 2007). Bu tip aşılar birçok hayvan türünde de etkili bulunmuştur (Mastroeni ve ark 2000).

S. Enteritidis aro mutant aşıları civcivlerde ve yetişkin tavuklarda oldukça güvenli bulunmuştur. Kuluçkadan yeni çıkan civcivlerin oral aşılanmasında sekumda yaygın kolonizasyona rağmen, herhangi bir yan etkiye rastlanmadığı ve enfeksiyona karşı 1 gün gibi kısa sürede direncin uyarıldığı ortaya konmuştur. Kas içi aşılama yapmadan, sadece oral aşı uygulanan civcivlere oral ve kas içi yolla virülent suşun eprüvasyonu sonrasında, aşılamanın dalak, karaciğer, ovaryum, sekumda kolonizasyonu ve fekal saçılımı önemli oranda azalttığı bildirilmiştir. Genç tavuklara, oral ve kas içi aşı kombinasyonunun uygulaması sonrasında ise, oral yolla *S.* Enteritidis eprüvasyonuna karşı ovaryumlarda korunmayı arttırdığı bildirilmiştir. Aynı zamanda, aro mutantlarla aşılamanın, saha suşu Salmonella ile enfekte tavuklardan, aşılı tavuklara etkenin geçişini engellediği bildirilmiştir (Cooper ve ark 1990, 1992, 1994).

Barrow ve ark (1991), 24 haftalık yaşta 2 yumurtacı tavuk grubunu, 2 hafta aralıklarla 2 kez, spektinomisin dirençli mutantlar olan *S. gallinarum* 9R ve Rough *aro*A *S.* Enteritidis PT4 suşları ile kas içi ve oral yolla aşılamışlardır. İkinci aşılamalardan 2 hafta sonra tavukları, patojen *S.* Enteritidis PT4 suşuyla oral yolla eprüve etmişlerdir. 9R suşu ile aşılanan grupta, ovaryum ve değişik organlardan eprüvasyon suşunun izolasyon sayısında belirgin azalma olduğunu; aksine Rough *S.* Enteritidis *aro*A ile aşılamanın karaciğer, dalak ve ovaryumlardan izolasyon oranında çok az farklılık oluşturduğunu bildirmişlerdir. Her iki aşı da yumurtalardan izolasyonu azaltmıştır. Ayrıca 9R aşı suşu deneme süresince ovaryumlardan izole edilmiştir. Eprüvasyon öncesi, 9R aşı suşu 473 yumurtadan 1'inde izole edilirken, R (rough) aroA aşı suşu izole edilememiştir.

Cooper ve ark (1994), kuluçkadan yeni çıkmış 2 grup civcivi *aro*A *S.* Enteritidis CVL30 suşu ile 10^5 veya 10^9 cfu dozunda oral yolla aşılamış ve İV yolla 10^8 cfu Nal^R *S.* Enteritidis suşu ile 8 haftalık yaşta eprüve etmişlerdir. Eprüvasyondan 1-4 gün sonra yaptıkları reizolasyon değerlendirmesinde, 2 grubunda dalak, karaciğer, sekumda kolonizasyonu benzer düzeylerde azalttığını bildirmişlerdir. Oral yolla 10^9 cfu dozunda aşılanan ve 8 haftalık yaşta oral yolla 10^9 cfu Nal^R *S.* Enteritidis suşu eprüve edilen diğer bir grupta, eprüvasyon sonrası mevcut antikor düzeyinin belirgin bir artış göstermeden aynı oranda devam ettiğini, kontrol grubunda ise eprüvasyondan 7-10 gün sonra antikor titresinde belirgin bir artış gözlendiğini bildirmişlerdir. Aynı aşı suşu ile yapılan diğer denemede; kuluçkadan yeni çıkmış civcivler 2 grup halinde 10^9 cfu oral yolla aşılanmıştır. Bir gruba 16 haftalık yaşta 10^9 cfu kas içi yolla 2. aşılama yapılırken, diğer grup 2. kez aşılanmamıştır. Grupların ikiside 10^7 cfu Nal^R *S.* Enteritidis suşu ile 23. haftada İV yolla eprüve edilmiştir. Eprüvasyondan 7 gün sonra reizolasyon çalışmalarında, 1 ve 2 kez aşılamanın dalak, karaciğer, sekumda kolonizasyonu benzer oranlarda ve önemli düzeyde azalttığını, 2 kez aşılı gruplarda kas içi uygulanan 2. aşılamanın ovaryumlarda korumayı 1 kez aşılılara göre daha da arttırmış olduğunu bildirmişlerdir.

Hassan ve ark (1997), avirulent canlı Δcya Δcrp *Salmonella* Typhimurium χ3985 mutant suş ile yaptıkları uzun süreli aşı çalışmalarında; 2 haftalık ve 4 haftalık yaşta oral yolla 2 kez aşıladıkları tavukları, *S.* Enteritidis ve *S.* Typhimurium saha suşları ile 12, 24, 36 ve 48 haftalık yaşlarda oral yolla eprüve etmişler ve eprüvasyondan 2 hafta sonra reizolasyon çalışmalarında; aşının, *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium eprüvasyon suşlarının intestinal, viseral, reprodüktif organlarda ve yumurtalarda kolonizasyon, invazyon ve/veya kontaminasyonuna karşı çok yüksek oranda koruma sağladığını bildirmişlerdir.

Cerquetti ve Gherardi (2000a; 2000b), 28°C üreyebilirken, 37°C üreyemeyen, ısıya duyarlı tesadüfi mutant E/1/3 *S*. Enteritidis suşunu, aşı suşu olarak tavuklarda test etmişlerdir. Civcivleri 1, 2, 3 ve 7. günlerde 10^9 cfu oral yolla 4 kez aşılamışlar ve 10^8 cfu *S.* Enteritidis ve Typhimurium suşları ile son aşılamadan 7 gün ve 14 gün sonra oral yolla eprüve etmişlerdir. Eprüvasyonlardan 14 gün sonra, eprüvasyon suşunun karaciğer, dalak ve sekal içerikden izolasyon oranında azalma gördüklerini,

özellikle aşılamadan 14 gün sonra eprüve edilen gruplarda bu oranın arttığını bildirmişlerdir. Aynı aşı suşu ile alternatif olarak uyguladıkları bir diğer aşılama programında; 1 günlük ve 2 haftalık yaşta 4 farklı tavuk grubunu, 10^{10} cfu/ml^{-1} oral-oral, 10^{10} cfu/ml^{-1} oral-10^{8} cfu/ml^{-1} periton içi, 10^{8} cfu/ml^{-1} periton içi- periton içi, 10^{8} cfu/ml^{-1} periton içi-10^{10} cfu/ml^{-1} oral olmak üzere 4 farklı yolla aşılamışlardır. 10^{9} cfu *S.* Enteritidis suşu ile son aşılamadan 14 gün sonra eprüve etmişlerdir. Aşının 4 grupta da fekal saçılımı azalttığını, özellikle oral-oral yolla ve oral-periton içi yolla aşılanan gruplarda dalak ve sekum kolonizasyonunu önemli oranda azalttığını bildirmişlerdir.

Cooper ve ark (1992), 1 günlük yaşta civcivleri, 2 farklı *S.* Enteritidis Aro mutantı ile, oral yolla 10^{9} cfu tek doz veya 21 güne kadar haftalık (1, 7, 14, 21 günlük yaşlarda) tekrarlanan 10^{5} cfu dozlarda aşılamışlar ve 8 haftalık yaşta oral yolla 10^{9} cfu *S.* Enteritidis suşu ile eprüve etmişlerdir. Eprüvasyon öncesi ve sonrasında alınan serumları LPS ELISA ile test etmişlerdir. Aşılanmış gruplarda da eprüvasyon öncesi antikor titresinin düşük olduğunu, 10^{9} cfu dozunda aşılananların bazılarında antikor tespit edilebilirken, 10^{5} cfu dozunda 4 kez aşılananlarda ise eprüvasyon öncesi IgG düzeyinin aşılanmamış kontrol grubu ile aynı olduğunu, antikor tespit edilemediğini veya çok az bulunduğunu bildirmişlerdir.

Gantois ve ark (2006), TAD Salmonella vac E (*S.* Enteritidis) ve TAD Salmonella vac T (*S.* Typhimurium) metobolik drift mutantlardan elde edilen ticari 2 canlı aşının yumurtacı tavuklarda etkinliğini araştırmışlardır. 2 ayrı grubu (n=30), 6 ve 16 haftalık yaşlarda 10^{8} cfu/0,5 ml dozunda oral yolla 2 kez, bir grubu TAD Salmonella vac E ile aşılarken, diğer grubu TAD Salmonella vac T ile aşılamışlardır. Son aşılamadan 2 hafta sonra, 18 haftalık yaşta her 2 gruptan kan alarak, kan serumlarından LPS ELISA ile antikor titrelerine bakmışlardır. 2 grubu da, 24 haftalık yaşta $5x10^{7}$ cfu *S.* Enteritidis suşu ile İV yolla eprüve etmişlerdir. Serolojik analizlerde; Salmonella vac E ile aşılanan grupta düşük düzeyde antikor titresi tespit ettiklerini, %33'nün antikor negatif olduğunu, Salmonella vac T ile aşılanan grubun %50'nin antikor negatif olduğunu ve antikor titrelerinin hetorojen bir dağılım gösterdiğini bildirmişlerdir. Organlardan reizolasyon çalışmalarında; Salmonella vac E ile aşılanan grupta eprüvasyon suşunun izolasyon oranları; karaciğer %4, dalak %42, ovaryum %57 olarak tespit ederken, Salmonella vac T ile aşılanan grupta

izolasyon oranlarını, karaciğer %20, dalak %50, ovaryum %57 olarak tespit etmişlerdir. Kontrol grubunda eprüvasyon suşunun izolasyon oranları; karaciğer %7, dalak ve ovaryum %80 olarak tespit etmişlerdir. Organların bakteriyolojik muayenelerinde, organlarda bakteri sayısını (cfu) tespit etmek amacı ile direkt ekim yapmışlar, direkt ekimde negatif bulduklarını ön zenginleştirme ekimleri ile tekrar muayene etmişlerdir. Organlardan direkt ekim çalışmalarında, dalak ve karaciğerden hiç izolasyon yapamazken, ovaryumlardan ön zenginleştirme sonrası yapılan izolasyonun yarısı kadar izolasyon gerçekleştirebilmişlerdir. Bu aşılama programı ile, gelişen antikor cevapla eprüvasyon suşunun organlardan reizolasyon oranlarının paralellik göstermediğini, eprüvasyon suşunun organlardan temizlenmesinde humoral cevaptan çok hücresel cevabın önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Betancor ve ark (2005), Uruguayda baskın genetik tip olarak tespit ettikleri lokal *S.* Enteritidis suşundan derive ettikleri aroC mutantının aşı olarak etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bu suşla, ticari yumurtacıları 2 grup halinde oral yolla 1 günlük yaşta 1 kez veya 1-15 günlük yaşlarda 2 kez aşılamışlardır. Tavukları 30 günlük yaşta *S.* Enteritidis suşu ile oral yolla eprüve etmişlerdir. Aşının organlarda invazyonu ve fekal saçılımı azalttığını bildirmişlerdir. 2 doz aşılamanın tek doz aşılamaya göre fekal saçılımı daha yüksek oranda azalttığını, bildirmişlerdir. Eprüvasyon öncesi alınan kan serumlarında antikor titresini ELISA ile değerlendirdiklerinde; 2 doz aşılamanın antikor cevabı daha yüksek oranda ortaya çıkardığını ve yüksek düzeyde gelişen antikor cevabın fekal saçılımı azaltmada daha da etkili olduğunu bildirmişlerdir. Kaiser ve ark (2002), genetik olarak antikor cevapta artış sağlayan aşıların, bağırsak içeriğindeki eprüvasyon bakterisinin miktarını önemli oranda azalttığını ve bu tür aşıları önerdiklerini bildirmişlerdir.

Maskell ve ark (1987), aşılamadan hemen sonra (aşı suşunun %28-54 oranlarında hayvanların organlarında hala bulunduğu sürelerde) gerçekleştirilen eprüvasyon uygulamalarını içeren birçok çalışma yapıldığını ve bu şekilde uygulanan aşıların etkinliği değerlendirilirken, doğuştan gelen spesifik olmayan bağışıklığında uyarılacağının dikkate alınması gerektiğini bildirmişlerdir.

EFSA (2004), Salmonella canlı aşılarında istenen ve beklenen özellikleri; sistemik ve bağırsak enfeksiyonlarına karşı yüksek koruma derecesi sağlaması, hem insanlar hemde hayvanlar için yeterli düzeyde attenüe olması, aşı suşlarının

hayvanların gelişimini etkilememesi, yaygın serovarlara karşıda bir dereceye kadar koruma sağlayabilmesi, aşı suşunun antibiyotiklere dirençli olmaması, aşı suşunun identifikasyonu ve izlenmesini kolaylaştıracak markerlara sahip olması şeklinde bildirmiştir.

Bu çalışmada, Selçuk Üniversitesi Mikrobiyoloji ABD kültür koleksiyonundan alınan, sürekli pasajlarla zayıflatılmış, 1 adet *S.* Pullorum ve 3 adet *S.* Enteritidis olmak üzere 4 ayrı Salmonella saha suşundan canlı aşı hazırlanması, çalışmada kullanılan suşların moleküler tiplendirilmesinin yapılması, antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi, hazırlanan aşıların çeşitli formlarda uygulanması ile immünojenik etkinliklerinin ve eprüvasyona karşı koruyuculuklarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma; *S.* Enteritidis'e karşı aşı geliştirilmesiyle ilgili, ülkemizde yapılan ilk canlı aşı değerlendirme çalışmasıdır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Besiyerleri ve Çözeltiler

Bakteri izolasyonunda, aşı hazırlanmasında, antibiyotik duyarlılığı tespitinde; Nutrient Agar (Oxoid, CM003B), Nutrient Broth (Oxoid, CM001B), Rappoport Vasiliadis Soy Broth (RVS Broth) (Merck, 1.07700.0500), Tetrathionate Broth (Merck, 1.05285.0500), Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar (X.L.D) (Oxoid, CM0469B), Brilliant Green Agar (BGA) (Oxoid, CM0263), Tryptic Soy Agar (Oxoid, CM131B), Mueller-Hinton Agar (Merck, 1.05437.0500), Mac Conkey Agar (Merck 1.05465.0500), Kanlı Agar (Merck 1.10886.0500) kullanıldı Üretici firmaların protokolüne uygun olarak hazırlandı. (Bekar 2003, OIE 2010, 2012).

Tetrathionate Broth (Base) (Merck, 1.05285.0500)

Pepton from meat	2,5 gr
Peptone from casein	2,5 gr
Bile salt mixture	1,0 gr
Calcium carbonate	10 gr
Sodium thiosulfate	30 gr
Distile su	1000 ml
Brillant green solüsyonu (%0,1)	10 ml
İodine-Potassium iodide solüsyonu	20 ml

PH: 7,4 – 7,8. Tüplere 10 ml taksim edildi.

Brillant Green Solüsyonu (%0,1)

Brillant green	0,1 g
Steril distile su	100 ml

İodine – Potassium İodine Solüsyonu

İodine	6,0 gr
Potassium iodide	5,0 gr
Steril distile su	20 ml

Mannitol-Hareket Besi yeri

Pepton	5 gr
Neopepton	5 gr
Mannitol	2 gr
Agar	2,5 gr
Potasyum nitrat	1,7 gr
Fenol red (%0,2'lik)	20 ml

Distile su 1000 ml pH: 7,6

Karışım kaynatılıp eritildikten sonra 5–6 ml miktarında tüplere dağıtılarak 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Tamponlanmış Peptonlu Su (Merck, 1.07228.0500)

Pepton	10,0 gr
NaCl	5,0 gr
Na_2HPO_4	5,0 gr
KH_2PO_4	1,5 gr
Distile Su	1000 ml pH: 7,0

225 ml miktarlarda erlenlere konarak 121 °C de 15 dakika sterilize edildi.

Fosfat Tamponlu Çözelti (Phosfate Buffer Solution, PBS)

NaC l	8,0 gr	
KCl	0,2 gr	
Na2HPO4	1,15 gr	
KH2PO4	0,2 gr	pH: 7,2

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp otoklavda 121 ^{o}C'de 15 dakika sterilize edildi.

2.2. Aşı Suşları

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Kolleksiyonu'ndan (SÜVF) temin edilen, sürekli pasajlanarak muhafaza edilmiş, 1

adet *S.* Pullorum ve 3 adet *S.* Enteritidis suşu, aşı suşu olarak kullanıldı (Çizelge 2.1). Suşların, morfolojik, kültürel, biyokimyasal ve serolojik özellikleri kontrol edilerek doğrulandı (Koneman 1979, Bekar 2003).

Çizelge 2.1. Aşı suşları

Suş Adı	**Alttipi**	**Suş orjini**
SÜVF 33	*S.* Pullorum	S.Ü. Vet. Fak. Mikrobiyoloji ABD
SÜVF 34	*S.* Enteritidis	S.Ü. Vet. Fak. Mikrobiyoloji ABD
SÜVF 35	*S.* Enteritidis	S.Ü. Vet. Fak. Mikrobiyoloji ABD
SÜVF 88	*S.* Enteritidis	S.Ü. Vet. Fak. Mikrobiyoloji ABD

2.3. Deneme Hayvanları

Bu çalışma, 8 haftalık yaşta 132 adet kahverengi ticari yumurtacı piliç ve 1 haftalık yaşta 69 adet kahverengi ticari yumurtacı civciv üzerinde gerçekleştirildi. *Ad libitum* yem ve su ile uygun şartlarda bakım ve besleme yapıldı. Hayvanlardan kan serumu ve kloakal sıvap örnekleri alınarak Salmonella yönünden serolojik ve bakteriyolojik kontrolleri yapıldı (OIE 2010, 2012).

2.4. Eprüvasyon Suşları

Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü'nde (AVKE) izole ve identifiye edilen ve Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü'nde (EVKMAE) serotiplendirilen 3 adet *Salmonella* Enteritidis saha suşu; AVKE SE1, AVKE SE2 ve AVKE SE3 eprüvasyon suşu olarak kullanıldı.

2.5. RAPD PZR Primerleri

23L 5'-CCGAAGCTGC
OPB-17 5'-AGGGAACGAG
OPA-4 5'-AATCGGGCTG
OPB-6 5'-TGCTCTGCCC
P1254 5'-CCGCAGCCAA
OPB-15 5'-GGAGGGTGTT

Primerler (Lin ve ark. 2001) Ella Biotech GmbH/ Deutschland firmasına sentezlettirildi. Primerler (100 µM), 20 µM olacak şekilde ¼ oranında sulandırıldı.

2.6. Etik Kurul Kararı

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'nun (SÜVFEK) 24.02.2010 tarih ve 2010/020 sayılı kararı ile araştırmanın, hayvan kullanım etiği açısından "uygun" olduğuna karar verilmiştir.

2.7. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Tüm Salmonella suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi Kirby Bauer disk diffüzyon yöntemine göre yapıldı (Bauer ve ark 1966). Bunun için, suşların 0,5 Mac Farland'a ayarlanan buyyon kültüründen 0,1 ml miktarında alınarak, Mueller Hinton Agara damlatıldı. Baget yardımıyla dairesel hareketlerle yayıldı. Kuruması için 3-4 dakika bekletildikten sonra seçilen antibiyotik diskleri yerleştirilerek 37 °C'de 24 saat inkubasyona bırakıldı. Sonuçlar Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nün geliştirdiği yorum kriterlerine dayanılarak duyarlı (**S**) orta derecede duyarlı (**I**) ve dirençli (**R**) olarak yorumlandı (CLSI 2012).

Test için; amoksisilin- klavulanik asit 30 µg (Oxoid CT0223B), amoksisilin 25 µg (Oxoid CT0161B), ampisilin 10 µg (Oxoid CT0003B), kloramfenikol 30 µg (Oxoid CT0013B), kolistin sülfat 25 µg (Oxoid CT0017B), eritromisin 15 µg (Oxoid CT0020B), gentamisin 10 µg (Oxoid CT0024B), kanamisin 30 µg (Oxoid CT0026B), nalidiksik asit 30 µg (Oxoid CT0031B), nitrofurantoin 300 µg (Oxoid CT0036B), norfloksasin 10 µg (Oxoid CT0434B), piperasilin 100 µg (Oxoid CT0199B), streptomisin 10 µg (Oxoid CT0047B), sulfametaksazol/ trimetoprim 25 µg (Oxoid, CT0052B, 1:19), tetrasiklin 30 µg (Oxoid CT0054B) antibiyotik disklerinden yararlanıldı.

2.8. Aşı Suşlarının Patojenite Kontrolü

SÜVF33, SÜVF34, SÜVF35 ve SÜVF88 no'lu aşı suşları, 10 ml Nutrient broth'a ekilip 37°C 24 saat inkübe edildi. Elde edilen bakteri kültüründen koloni sayım yöntemi ile bakteri konsantrasyonu belirlendi. Daha sonra bakteri süspansiyonları, 1 ve 8 haftalık yaşlarda olan 6'şar adet civciv/piliçlere 1 x 10^9 cfu/ml oranında oral yolla verildi. Hayvanlar, hastalık durumları ve ölüm yönünden 15 gün gözlendi.

2.9. Eprüvasyon Suşunun Seçimi

S. Enteritidis (AVKE SE1, AVKE SE2, AVKE SE3) eprüvasyon suşları 10 ml Nutrient broth'a ekilip 37°C 24 saat inkübe edildi. Elde edilen bakteri kültürlerinden, koloni sayım yöntemi ile bakteri konsantrasyonları $1x10^7$, $1x10^8$, $1x10^9$ cfu/ml olacak şekilde dilüsyonlar hazırlandı. Daha sonra bakteri süspansiyonları, her grup için 1 haftalık yaştaki 5 adet civcive, 1 ml dozunda oral yolla verildi. Hayvanlar, hastalık durumları ve ölüm yönünden 15 gün gözlendi.

2.10. Bakteriyolojik Kontroller

Bakteriyolojik muayene; aşılama öncesi kloakal sıvaplardan, aşılama sonrası kloakal sıvaplardan ve altlıklardan, eprüvasyon sonrasında iç organlardan (karaciğer, dalak, ovaryum, sekum) kalitatif olarak gerçekleştirildi**.**

Salmonella izolasyonu için; tavuklardan alınan kloakal sıvaplar, altlık veya iç organ süspansiyonu, peptonlu su içinde 37 °C'de 16-20 saat inkübe edildi. Peptonlu sudan 0.1 ml alınarak 10 ml Tetrathionat Buyyona ve 10 ml Rappoport Vasiliadis Soy Broth (R.V.S Broth) transfer edilip 41,5 °C de 18-24 saat inkübe edildi. Her iki selektif zenginleştirme sıvısından birer öze dolusu X.L.D agar ve Brilliant Green Agar (BGA) yüzeyine seyreltme metodu ile ekim yapılıp, 37°C de 18-24 saat inkübe edildi. X.L.D agarda siyah merkezli kırmızı veya sadece kırmızı koloniler şeklinde, BGA da pembe koloniler halinde üreme gösteren şüpheli koloniler arandı (GKGM 2007, OIE 2010, 2012). Salmonella şüpheli kolonilerden Nutrient agarda saf kültürler yapılıp, biyokimyasal doğrulama, VITEK® 2 Compact cihazında (BioMerieux, Fransa), VITEK® 2 GN (kolorimetrik) (BioMerieux 21341) kartı kullanılarak gerçekleştirildi. VITEK® 2 GN kartı ile gerçekleştirilen biyokimyasal testler Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. VITEK® 2 GN kartı biyokimyasal testler

Biyokimyasal Testler			
1	Ala-phe-pro-arylamıdase	**2**	Adonıtol
3	L-Pyrrolydonyl-arylamıdase	**4**	L-arabıtol
5	D-cellobıose	**6**	Beta-galaktosıdase
7	H2S	**8**	Glutamil arilamidaz pNA
9	Beta-N-asetil-glikozaminidaz	**10**	Gama glutamil transferaz
11	D-Glikoz	**12**	Beta-glikosidaz
13	Fermantasyon Glikoz	**14**	D- Manitol
15	D- Maltoz	**16**	Beta- Ksilosidaz
17	D- Mannoz	**18**	L-Prolin arilamidaz
19	Beta- Alanin arilamidaz pNA	**20**	Palatinoz
21	Lipaz	**22**	üreaz
23	Tirosin Arilamidaz	**24**	Sakkaroz/sükroz
25	D- sorbitol	**26**	D-trehaloz
27	D- Tagatoz	**28**	Malonat
29	Sitrat (sodyum)	**30**	L- Laktat alkalileşmesi
31	5- Keto-D-glukonat	**32**	Sükkinat alkalileşmesi
33	Alfa- glikosidaz	**34**	Alfa galaktosidaz
35	Beta-N-asetil-	**36**	Glisin arilamidaz
37	Fosfataz	**38**	Lizin dekarboksilaz
39	Ornitin dekarboksilaz	**40**	L- histidin asimilasyonu
41	Dekarboksilaz bazı	**42**	Beta glukuronidaz
43	Kurmarat	**44**	Glu-gli-arg-arilamidaz
45	O/129 direnci	**46**	Ellman
47	L-Malat asimilasyonu	**48**	L- Laktat asimilasyonu

2.11. Serolojik Testler

2.11.1. Çabuk Serum Aglütinasyon Testi (RST)

Deneme hayvanlarının Salmonella yönünden serolojik muayenesi amacıyla, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından hazırlanmış, kristal viyole ile boyalı, *Salmonella* Pullorum (*S.* Pullorum) pleyt aglütinasyon test antijeni kullanıldı. Test eşit miktarda boyalı *S.* Pullorum plate test antijeni ve serum temiz bir lam üzerinde karıştırılarak yapıldı. İki dakika içerisinde belirgin bir aglütinasyonun görülmesi pozitif, homojen bir bulanıklığın görülmesi negatif olarak değerlendirildi (OIE 2010, 2012).

2.11.2. Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Tavukların kan serumlarında antikor titresinin belirlenmesi amacıyla, ticari olarak elde edilen, Lipopolisakkarid (LPS) antijen kaplı, Chicken Salmonella Antibody Test Kiti (LPS Group D) (CK117 BioChek, Hollanda) kullanıldı. Test kit protokolüne uygun olarak aşağıdaki şekilde çalışıldı.

Teste başlamadan önce serum örnekleri 1/100 oranında sulandırıldı.

1. A1 ve B1 kuyucuklarına 100 µl negatif kontrol serumu konuldu.
2. C1 ve D1 kuyucuklarına 100 µl pozitif kontrol serumu konuldu.
3. Sırayla diğer kuyucuklara 100 µl sulandırılmış serum örneklerinden konuldu. Pleytin üzeri kapatıldı ve oda sıcaklığında (22–27 °C) 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Kuyucukların içindeki sıvılar aspire edildi ve 4 kez 300 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı.
6. Tüm kuyucuklara 100 µl konjugat eklendi. Pleytin üstü kapatıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
7. Yıkama işlemi aynı şekilde tekrar edildi.
8. Hazırlanmış olan substrat tüm kuyucuklara 100 µl ilave edildi. Pleytin üstü kapatıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
9. Reaksiyonun durdurulması amacıyla her kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu ilave edildi.
10. Pleyt okuyucusu havada sıfırlandı ve 405 nm'de kontrol ve diğer örneklerin absorbansı kaydedildi.

Pleyt yıkama işlemi KHB ST-36W marka ELISA yıkama ünitesinde ve okuma işlemi *KHB ST-360 marka* ELISA reader cihazında **(**SH Kehua Laboratory System Co., Ltd., Çin**)** gerçekleştirildi.

Bulguların değerlendirilmesi kit protokülüne göre, BioChek software programında gerçekleştirildi. Protokole göre titre 654 ve daha büyük değerler pozitif, 653 ve daha düşük değerler negatif olarak kabul edildi.

2.12. Aşıların Hazırlanması

2.12.1. SÜVF33 No'lu (*S*. Pullorum) Aşının Hazırlanması

SÜVF33 no'lu suş, Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerine ekilip 37°C 48 saat inkube edildi. Kültürler 4000 rpm de 15dk santrifüjle (Eppendorf 5702, Almanya) toplandı ve fosfat tamponlu çözelti (PBS) (pH: 7.2) ile 3 kez yıkandı. Bakteri süspansiyonu koloni sayım yöntemi ile oral yolla uygulanacak gruplar için 10^9 cfu/0,5ml ve kas içi uygulanacak gruplar 10^8 cfu/0,2 ml olacak şekilde ayarlandı.

2.12.2. SÜVF34 No'lu (*S*. Enteritidis) Aşının Hazırlanması

SÜVF34 no'lu suş, Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerine ekilip 37°C 48 saat inkube edildi. Kültürler 4000 rpm de 15dk santrifüjle (Eppendorf 5702, Almanya) toplandı ve fosfat tamponlu çözelti (PBS) (pH: 7.2) ile 3 kez yıkandı. Bakteri süspansiyonu koloni sayım yöntemi ile 10^9 cfu/0,5ml olacak şekilde ayarlandı.

2.12.3. SÜVF35 No'lu (*S*. Enteritidis) Aşının Hazırlanması

SÜVF35 no'lu suş, Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerine ekilip 37°C 48 saat inkube edildi. Kültürler 4000 rpm de 15dk santrifüjle (Eppendorf 5702, Almanya) toplandı ve fosfat tamponlu çözelti (PBS) (pH: 7.2) ile 3 kez yıkandı. Bakteri süspansiyonu koloni sayım yöntemi ile oral yolla uygulanacak gruplar için 10^9 cfu/0,5ml ve kas içi uygulanacak gruplar 10^8 cfu/0,2 ml olacak şekilde ayarlandı.

2.12.4. SÜVF88 No'lu (*S*. Enteritidis) Aşının Hazırlanması

SÜVF88 no'lu suş, Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerine ekilip 37°C 48 saat inkube edildi. Kültürler 4000 rpm de 15dk santrifüjle (Eppendorf 5702, Almanya) toplandı ve fosfat tamponlu çözelti (PBS) (pH: 7.2) ile 3 kez yıkandı. Bakteri süspansiyonu koloni sayım yöntemi ile oral yolla uygulanacak gruplar için 10^9 cfu/0,5ml ve kas içi uygulanacak gruplar 10^8 cfu/0,2 ml olacak şekilde ayarlandı.

2.13. Deneysel Dizayn

Tavuklar, her bir grupta 12 tavuk olacak şekilde 9 gruba ayrıldı. Bir kez aşılanacak gruplar; 1, 2, 3 ve 4 no'lu gruplar 17 haftalık yaşta aşılanırken, iki kez aşılanacak gruplar; 5, 6 ve 7 no'lu gruplar 17 haftalık ve 21 haftalık yaşlarda iki kez aşılandı. Ayrıca, 8 ve 9 no'lu gruplar, sadece eprüvasyon uygulanmak üzere, bir kez

aşılılar için kontrol 1 grubu (n:12) ve iki kez aşılılar için kontrol 2 (n:12) grubu olarak tutuldu. Bir kez aşılanan 1, 2, 3, 4 no'lu gruplar ve 8 no'lu grup (Kontrol 1 grubu) 21 haftalık yaşta eprüvasyon suşu AVKESE1 ile eprüve edildi. İki kez aşılanan 5, 6, 7 no'lu gruplar ve 9 no'lu grup (Kontrol 2 grubu) 25 haftalık yaşta eprüvasyon suşu AVKESE1 ile eprüve edildi.

Eprüvasyonlardan sonra, birer hafta ara ile toplamda 3 haftalık süre içinde tavuklar öldürüldü. Tavukların karkaslarının ventral yüzü alkol ile dezenfekte edilerek, aseptik olarak organlar (dalak, karaciğer, sekum, ovaryum) alındı. Organlardan Salmonella yönünden ayrı ayrı ekimler yapıldı. Organların Salmonella yönünden muayeneleri, peptonlu suda ön zenginleştirme, Rappoport Vasiliadis Soy Broth (R.V.S Broth) ve Tetrathionat Buyyonda selektif zenginleştirme aşamalarından sonra X.L.D agar ve Brilliant Green Agara (BGA) pasajlarla yapıldı. Salmonella şüpheli koloniler alınarak Nutrient agarda saflaştırıldı. VITEK 2 cihazı ile identifiye edildi. Salmonella izolatlarından 1 koloni alınarak 5 ml nutrient broth içerisinde 37 ºC 24 saat inkube edildi. Kültürden1 ml alınarak ependorf tüp içerisinde 1800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak elde edilen kültür peletleri RAPD PZR çalışmalarında DNA ekstraksiyonu için kullanılıncaya kadar -20' de muhafaza edildi.

2.13.1. Bir Kez Aşılanan Gruplar

Bir (1) kez aşılanan gruplar; 1 no'lu grup SÜVF33 (*S.* Pullorum) suşu ile, 2 no'lu grup SÜVF34 (*S.* Enteritidis) suşu ile, 3 no'lu grup SÜVF35 (*S.* Enteritidis) suşu ile, 4 no'lu grup SÜVF88 (*S.* Enteritidis) suşu ile 17 haftalık yaşta 10^9 cfu/0,5ml dozunda oral yolla aşılandı. Aşılamadan 1 gün sonra ve takip eden günlerde 3 gün aralıklarla tavuklardan alınan kloakal sıvaplardan ekimler yapıldı. Sıvapların Salmonella yönünden muayeneleri, peptonlu suda ön zenginleştirme, Rappoport Vasiliadis Soy Broth (R.V.S Broth) ve Tetrathionat Buyyonda selektif zenginleştirme aşamalarından sonra X.L.D agar ve Brilliant Green Agara (BGA) pasajlarla yapıldı.

Aşı uygulamasından 21 gün sonra kanatlılardan kan alınarak ELISA ile antikor seviyelerine bakıldı. Bir kez aşılanan gruplar ve kontrol grubu, 21 haftalık yaşta AVKE SE1 suşu ile $5x10^8$ cfu/ml dozunda eprüve edildi (Çizelge 2.3).

Eprüvasyondan sonra birer hafta ara ile 3 haftalık gözlemden sonra bütün tavuklar öldürülerek, Salmonella yönünden muayeneleri yapıldı.

Çizelge 2.3. Bir kez aşılanan grupların deneysel dizaynı.

Bir Kez Aşılanan Gruplar					
Grup No	**1** n: 12	**2** n:11	**3** n: 12	**4** n:12	**Kontrol 1** n:12
Aşı Suşu	SÜVF33 (*S.* Pullorum)	SÜVF34 (*S.* Enteritidis)	SÜVF35 (*S.* Enteritidis)	SÜVF88 (*S.* Enteritidis)	///////
Aşılama Yaşı	17 haftalık	17 haftalık	17 haftalık	17 haftalık	///////
Aşılama Yolu	Oral	Oral	Oral	Oral	///////
Eprüvasyon Suşu	AVKE-SE1 (*S.* Enteritidis)	AVKE-SE1 (*S.* Enteritidis)	AVKE-SE1 (*S.* Enteritidis)	AVKE-SE1 (*S.* Enteritidis)	AVKE-SE1 (*S.* Enteritidis)
Eprüvasyon Yaşı	21 haftalık	21 haftalık	21 haftalık	21 haftalık	21 haftalık
Eprüvasyon Yolu	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral

2.13.2. İki Kez Aşılanan Gruplar

SÜVF33, SÜVF35 ve SÜVF88 no'lu suşlarla hazırlanan aşılar, 17 haftalık yaşta 12'şer adet tavuğa 10^8 cfu/0.2 ml kas içi yolla uygulandı. Aşılamadan 1 gün sonra ve takip eden günlerde 3 gün aralıklarla tavuklardan kloakal sıvap alınarak Salmonella yönünden ekimleri yapıldı. Birinci aşı uygulamasından 21 gün sonra kanatlılardan kan alınarak ELISA ile antikor seviyelerine bakıldı. Tavuklar 21 haftalık iken, ikinci kez 10^9 cfu/0.5 ml oral yolla aşı uygulandı. Son aşı uygulamasından 21 gün sonra kanatlılardan kan alınarak ELISA ile antikor seviyelerine bakıldı. İki kez aşılanan gruplar ve kontrol grubu 25 haftalık yaşta AVKE SE1 izolatı ile $5x10^8$ cfu/ml dozunda, oral yolla eprüve edildi (Çizelge 2.4). Eprüvasyondan sonra birer hafta ara ile 3 haftalık gözlemden sonra bütün tavuklar öldürülerek, Salmonella yönünden muayeneleri yapıldı.

Çizelge 2.4. İki kez aşılanan grupların deneysel dizaynı.

İki Kez Aşılanan Gruplar				
Grup No	**5**	**6**	**7**	**Kontrol 2**
	n: 12	n: 12	n:12	n:12
Aşı Suşu	SÜVF33 (*S.* Pullorum)	SÜVF35 (*S.* Enteritidis)	SÜVF88 (*S.* Enteritidis)	///////
1. Aşılama Yaşı	17 haftalık	17 haftalık	17 haftalık	///////
Aşılama Yolu	kas içi	kas içi	kas içi	///////
2. Aşılama Yaşı	21 haftalık	21 haftalık	21 haftalık	///////
Aşılama Yolu	Oral	Oral	Oral	///////
Eprüvasyon Suşu	AVKE-SE1 (*S.* Enteritidis)	AVKE-SE1 (*S.* Enteritidis)	AVKE SE1 (*S.* Enteritidis)	AVKE-SE1 (*S.* Enteritidis)
Eprüvasyon Yaşı	25 haftalık	25 haftalık	25 haftalık	25 haftalık
Eprüvasyon Yolu	Oral	Oral	Oral	Oral

2.14. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD PZR) Analizi

2.14.1. DNA İzolasyonu

High Pure PCR Template Preparation Kiti (Roche Diagnostics GmbH, 11796828001) protokolüne uygun olarak kullanıldı. Kültür peletine 200 µl PBS eklendi. Karışıma 50 µl MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer **(**Roche Diagnostics GmbH, 04591180001) katılıp, 37 ˚C'de 15 dakika ısı bloğunda (Techne DB-2D, Bibby Scientific Limited, UK) bekletildi. Lizatlara 200 µl binding buffer ve 40 µl Proteinaz-K eklenerek, 70˚C'de 10 dakika ısı bloğunda inkübe edildi. Süspansiyona 100 µl isopropanol (Merck KgaA, 1096342500) eklenerek karıştırıldı. Süspansiyon filtreli tüplere konularak 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj (Thermo Scientific, USA, MicroCL21R) edildi ve toplama tüplerindeki sıvı her santrifüj sonrası uzaklaştırıldı. Filtreli tüpler toplama tüpleri içerisine yerleştirilerek 500 µl inhibitör uzaklaştırma tamponu ilave edilip, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. İki kez 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Tekrar 13000 rpm'de 10 saniye santrifüj daha yapıldıktan sonra filtreli tüpler ependorf tüplerin içerisine yerleştirildi. 70 ˚C'de ısıtılmış 100 µl elution buffer eklenerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. İzole edilen DNA'lar absorbans tayinleri yapıldıktan sonra, RAPD PZR yapılıncaya kadar -20 ˚C'de saklandı.

2.14.2. DNA Absorbans Tayini

İzole edilen DNA'ların optik dansite ölçümleri 260 nm'de NanoDrop UV spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA, ACT Gene ASP-3700) kullanılarak gerçekleştirildi. 40-50 ng/µl civarında olan DNA'lar amplifikasyonda kullanıldı. Düşük oranda olanların izolasyonları tekrarlandı.

2.14.3. RAPD PZR ile DNA Amplifikasyonu

Amplifikasyon her bir oligonükleotid primeri için (23L, OPB-17, OPA-4, APB-6, P1254, OPB-15) final volüm 25 µl olacak şekilde PZR karışımı hazırlandı. 2,5 µl 10X tepkime tamponu (HelixAmp™ Taq polimeraz- NanoHelix Co. Ltd., South Korea, TBF500), 1,75 µl (50 mM) $MgCl_2$ (Thermo Scientific Inc., USA, , #F553L) 2 µl (20 µM) primer, 0.25 µl (5U/ µl) *Taq* DNA polymerase (HelixAmp™ Taq polimeraz- NanoHelix Co. Ltd., TBF500), 0,5 µl (10 mM) dNTP karışımı (Roche Diagnostics GmbH, 11578553001) ve 2.5 µl kalıp DNA (40-50 ng/µl) kullanıldı. Bu karışım ısı döngü cihazında (ABI 2720-Applied Biosystems, USA), ön denaturasyon için 95 ºC 5 dakika tutulduktan sonra, 95 ºC 30 saniye, 35 ºC 1 dakika, 72 ºC 2 dakikalık adımlardan oluşan 45 döngülük program ile çoğaltıldı ve son uzama için 72 ºC 5 dakika tutuldu. 8 µl RAPD PZR ürünü, 0.6 mg/ml ethidium bromide (Thermo Scientific, 17898) içeren % 1,5'luk agaroz jelin (Roche Diagnostics GmbH, 11685678001) 16'lık tarak gözlerine 2 µl 6X DNA yükleme tamponu (Thermo Scientific Inc., # R0611) ile karıştırılarak pipetlendi. Marker olarak 100 bp DNA Ladder (Roche Diagnostics GmbH, 11721933001) kullanıldı. Ürünler 90 Voltda 1,5 saat yürütüldü.

2.14.4. Jel Görüntüleme ve Değerlendirme

Elektroforez sonrasında oluşan bantlar jel görüntüleme sistemi Kodak Gel Logic 112 cihazı (Carestream Health Inc., Rochester) kullanılarak gerçekleştirildi. RAPD PZR yöntemi ile oluşan bant sayıları ve ölçüleri karşılaştırılarak sonuçlar değerlendirildi.

2.15. İstatistiksel Analiz

Aşılı ve kontrol gruplarının organlarından eprüvasyon suşunun reizolasyon oranları arasındaki farklılıkların önem derecesi, SPSS (sürüm 11.5 Microsoft) istatistik programında chi square ($\chi 2$) testi ile değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1. Aşı Suşlarının Biyokimyasal Karakterleri

SÜVF33, SÜVF34, SÜVF35 ve SÜVF88 no'lu suşlar, VITEK 2 compact otomatik identifikasyon cihazı biyokimyasal test sonuçlarına göre Salmonella spp. olarak identifiye edildi (çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. SÜVF33, SÜVF34, SÜVF35, SÜVF88 no'lu suşların VITEK2 GN kartı biyokimyasal test sonuçları.

Test No	Biyokimyasal Testler	Aşı suşları			
		SÜVF 33	SÜVF 34	SÜVF 35	SÜVF 88
2	Ala-Phe-Pro-RYLAMIDASE	-	-	-	-
3	ADONITOL	-	-	-	-
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	-	-	-
5	L-ARABITOL	-	-	-	-
7	D-CELLOBIOSE	-	-	-	-
9	BETA-GALACTOSIDASE	-	-	-	-
10	H2S PRODUCTION	-	+	+	+
11	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-	-	-	-
12	Glutamyl Arylamidase pNA	-	-	-	-
13	D-GLUCOSE	+	+	+	+
14	GAMMA-GLUTAMYL- TRANSFERASE	+	-	+	+
15	FERMENTATION/ GLUCOSE OFF	+	+	+	+
17	BETA-GLUCOSIDASE	-	-	-	-
18	D-MALTOSE	+	+	+	+
19	D-MANNITOL	-	+	+	+
20	D-MANNOSE	-	+	+	+
21	BETA-XYLOSIDASE	-	-	-	-
22	BETA-Alanine arylamidase pNA	-	-	-	-
23	L-Proline ARYLAMIDASE	-	-	-	-
26	LIPASE LIP	-	-	-	-
27	PALATINOSE PLE	-	-	-	-
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	-	+	+	+
31	UREASE URE	-	-	-	-
32	D-SORBITOL	-	+	+	+
33	SACCHAROSE/SUCROSE	-	-	-	-
34	D-TAGATOSE	-	-	-	-
35	D-TREHALOSE	+	+	+	+
36	CITRATE (SODIUM)	+	-	+	+
37	MALONATE	-	-	-	-
39	5-KETO-D-GLUCONATE	-	+	-	+
40	L-LACTATE alkalinisation	-	+	+	+

Çizelge 3.1 (Devam). SÜVF33, SÜVF34, SÜVF35, SÜVF88 no'lu suşların VITEK2 GN kartı biyokimyasal test sonuçları.

41	ALPHA-GLUCOSIDASE	-	-	-	-
42	SUCCINATE alkalinisation	-	-	+	+
43	Beta-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-	-	-	-
44	ALPHA-GALACTOSIDASE	-	+	+	+
45	PHOSPHATASE	(+)	+	-	+
46	Glycine ARYLAMIDASE	-	-	-	-
47	ORNITHINE DECARBOXYLASE	+	+	+	+
48	LYSINE DECARBOXYLASE	+	+	+	+
53	L-HISTIDINE assimilation	-	-	-	-
56	COURMARATE	+	+	+	+
57	BETA-GLUCORONIDASE	-	-	-	-
58	O/129 RESISTANCE	+	+	-	+
59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-	-	-	-
61	L-MALATE assimilation	-	-	-	-
62	ELLMAN	-	-	-	-
64	L-LACTATE assimilation	-	-	-	-

3.2. Aşı Suşlarının Serotiplendirilmesi

SÜVF33, SÜVF34, SÜVF35 ve SÜVF88 no'lu suşlar Etlik Veteriner Kontrol ve Merkez Araştırma Enstitüsü (EVKMAE) Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı tarafından serotiplendirildi (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Aşı suşlarının serotipleri.

Suş No	**Serotip**
SÜVF 33	*S*. Pullorum
SÜVF 34	*S*. Enteritidis
SÜVF 35	*S*. Enteritidis
SÜVF 88	*S*. Enteritidis

3.3. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Suşların antibiyotik dirençliliğini görmek, aşı suşu ve eprüvasyon suşunun ayrımlarını yapmak amacıyla değerlendirildiğinde; bütün suşların eritromisine karşı dirençli olduğu, SÜVF34 ve SÜVF88 no'lu suşların eprüvasyon suşundan farklı olarak gentamisin, sulfametoksazol/trimetoprim, streptomisin ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu, fakat SÜVF33 ve SÜVF35 no'lu suşların eprüvasyon suşundan farklı olarak, kullanılan antibiyotiklere karşı bir direnç geliştirmediği görülmüştür (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Salmonella suşlarının antibiyotiklere duyarlılık durumları.

Antibiyotik Diskleri	Aşı Suşları				Eprüvasyon Suşu
	SÜVF33	SÜVF34	SÜVF35	SÜVF88	AVKE SE1
Amoksisilin	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**
Amoksisilin/ Klav. A.	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**
Ampisilin	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**
Kloramfenikol	**S**	**I**	**I**	**S**	**I**
Kolistin sulfat	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**
Eritromisin	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**
Gentamisin	**I**	**R**	**I**	**R**	**I**
Kanamisin	**I**	**I**	**S**	**I**	**S**
Nalidiksik asit	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**
Nitrofurantoin	**I**	**S**	**I**	**S**	**I**
Norfloksasin	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**
Piperasilin	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**
Streptomisin	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**
Sulfametoksa./ Trimet.	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**
Tetrasiklin	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**

S: Duyarlı , **I:** Orta derecede duyarlı, **R:** Dirençli

3.4. Deneme Hayvanlarının Muayenesi

Aşılamalar öncesi, tavukların Salmonella etkenleri yönünden bakteriyolojik muayeneleri menfi bulundu. Kan serumları, Salmonella antikor varlığı yönünden negatif bulundu.

3.5. Aşı Suşlarının Patojenitelerinin Değerlendirilmesi

Aşı suşları verilen 1 ve 8 haftalık civciv/ tavukların 15 günlük gözleminde hiçbir grupta ölüm ve hastalık belirtisi görülmedi.

3.6. Eprüvasyon Suşunun Seçimi

Eprüvasyon suşları ile eprüve edilen 1 haftalık civcivlerin 15 günlük gözlemi sonunda hepsini öldüren suş; AVKE SE1 suşu eprüvasyon suşu olarak seçildi (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Eprüvasyon suşu seçimi için patojenite testi sonuçları (Ölen/Eprüve edilen)

Eprüvasyon suşları	Bakteri Konsantrasyonu cfu/ml		
	$1x10^7$	$1x10^8$	$1x10^9$
AVKE SE1	**1/5**	**3/5**	**5/5**
AVKE SE2	0/5	2/5	3/5
AVKE SE3	1/5	1/5	2/5

3.7. Aşıların İmmünojenitesinin Değerlendirilmesi

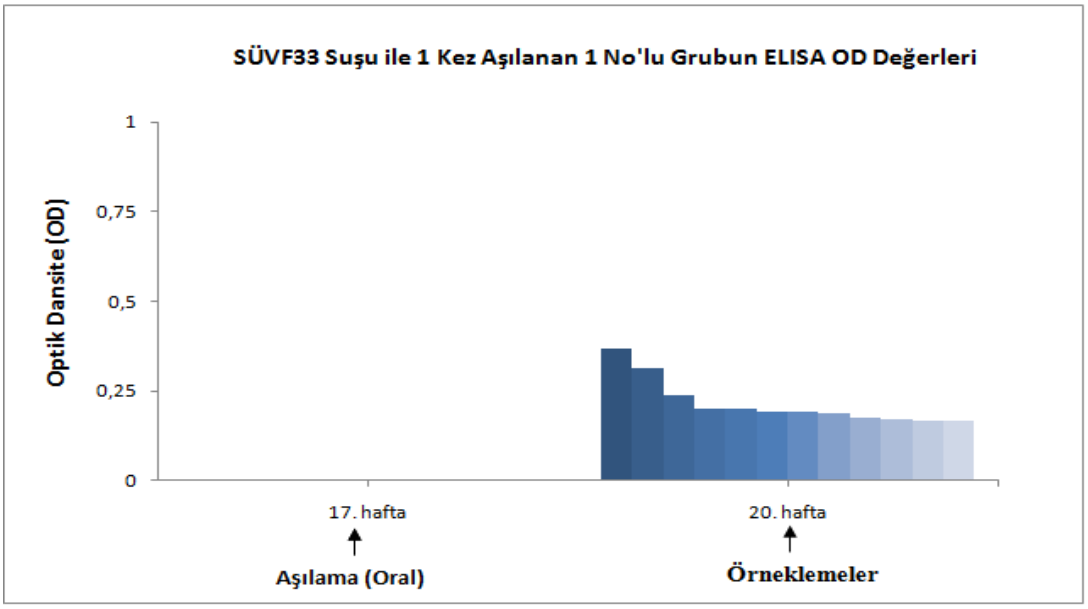
3.7.1. Bir Kez Aşılanan Grupların ELISA Sonuçları

Bir kez aşılanan tavuklardan aşılamadan 21 gün sonra alınan kan örneklerinde bütün grupların antikor titrelerinin oldukça düşük düzeyde ve çoğunlukla negatif olduğu tespit edildi. SÜVF33, SÜVF34 ve SÜVF88 no'lu suşlarla aşılanan 1, 2 ve 4 no'lu gruplarda seropozitiflik tespit edilmezken, SÜVF35 no'lu suş ile aşılanan 3 no'lu grupda sadece 1 adet seropozitiflik belirlendi (Çizelge 3.5).

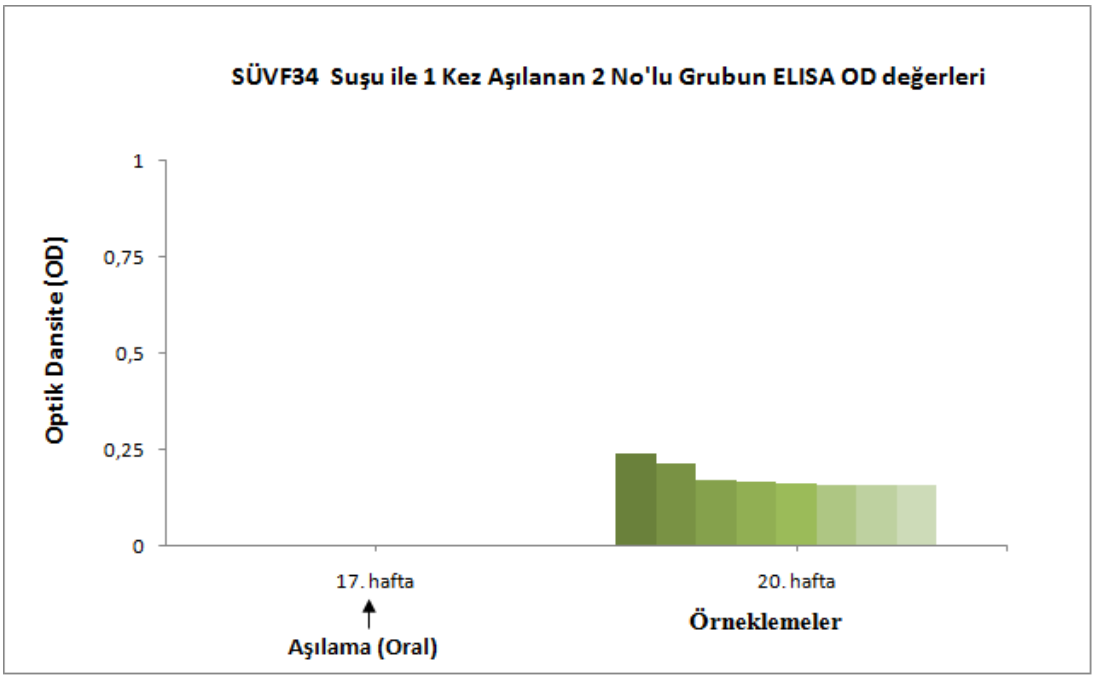
Çizelge 3.5. Bir kez aşılı grupların ELISA testi ile seropozitiflik oranları.

Grup No	1	2	3	4	Kontrol 1
	n: 12	n: 10	n: 10	n: 9	n: 12
Aşı Suşu	SÜVF33	SÜVF34	SÜVF35	SÜVF88	//////////
Seropozitiflik Oranı	0/12	0/10	1/10	0/9	0/12

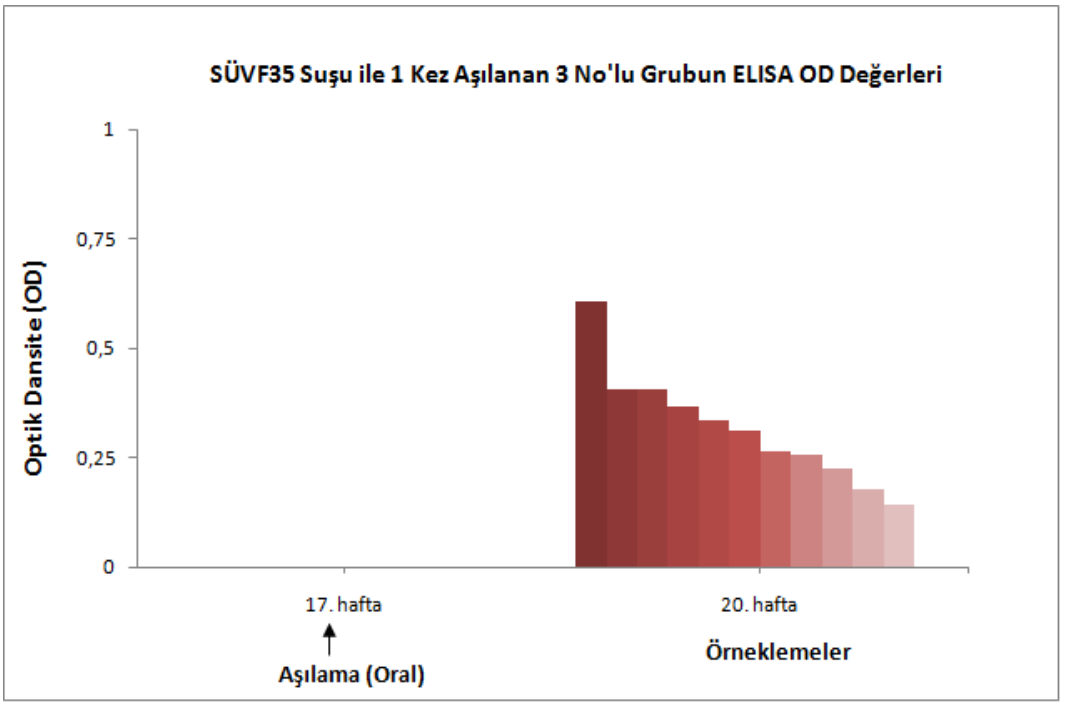
SÜVF33, SÜVF34, SÜVF35 ve SÜVF88 suşları ile bir kez oral yolla aşılanan 1, 2, 3 ve 4 no'lu grupların ELISA optik dansite değerleri sırası ile Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



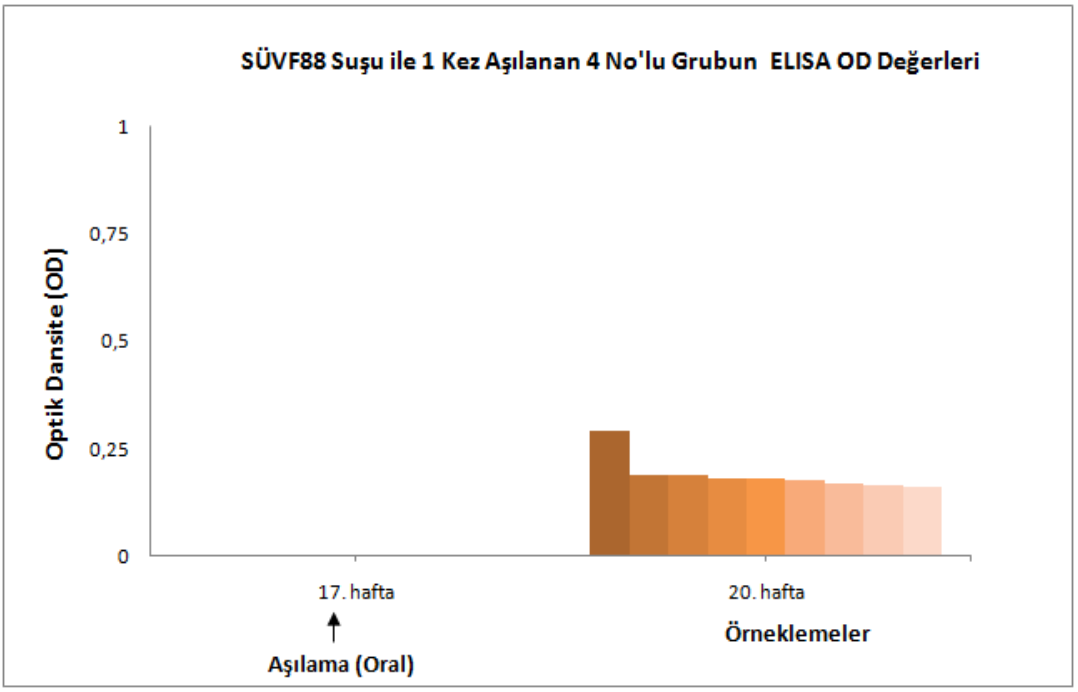
Şekil 3.1. SÜVF33 suşu ile 17. haftada bir kez oral yolla aşılanan 1 no'lu grubun aşılamadan 21 gün sonra ELISA OD değerleri ($OD_{405\ nm}$).



Şekil 3.2. SÜVF34 suşu ile 17. haftada bir kez oral yolla aşılanan 2 no'lu grubun aşılamadan 21 gün sonra ELISA OD değerleri ($OD_{405\ nm}$).



Şekil 3.3. SÜVF35 suşu ile 17. haftada bir kez oral yolla aşılanan 3 no'lu grubun aşılamadan 21 gün sonra ELISA OD değerleri ($OD_{405\ nm}$).



Şekil 3.4. SÜVF88 suşu ile 17. haftada bir kez oral yolla aşılanan 4 no'lu grubun aşılamadan 21 gün sonra ELISA OD değerleri ($OD_{405\ nm}$).

3.7.2. İki Kez Aşılanan Grupların ELISA Sonuçları

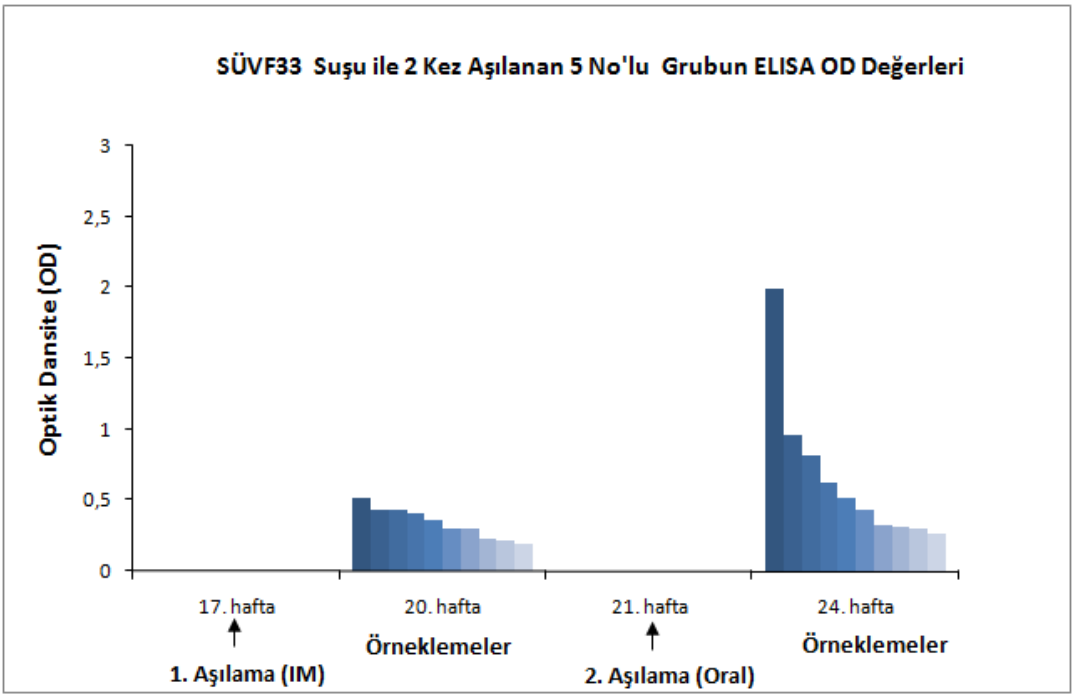
Birinci aşılama sonrasında; SÜVF33 suşu ile aşılanan 5 no'lu grupta, 12 tavukta seropozitiflik tespit edilmedi. SÜVF88 suşlu ile aşılanan 6 no'lu grupta, 12 tavuktan 2'si seropozitif bulundu. SÜVF35 suşu ile aşılanan 7 no'lu grupta, 12 tavuktan 11'i seropozitif bulundu.

İkinci aşılama sonrasında; SÜVF33 suşu ile aşılanan 5 no'lu grupta 12 tavuktan 7' si, SÜVF35 suşu ile aşılanan 6 no'lu grupta 12 adet tavuğun hepsi, SÜVF88 suşu ile aşılanan 7 no'lu grupta ise 12 tavukdan 6'sı seropozitif bulundu (Çizelge 3.6).

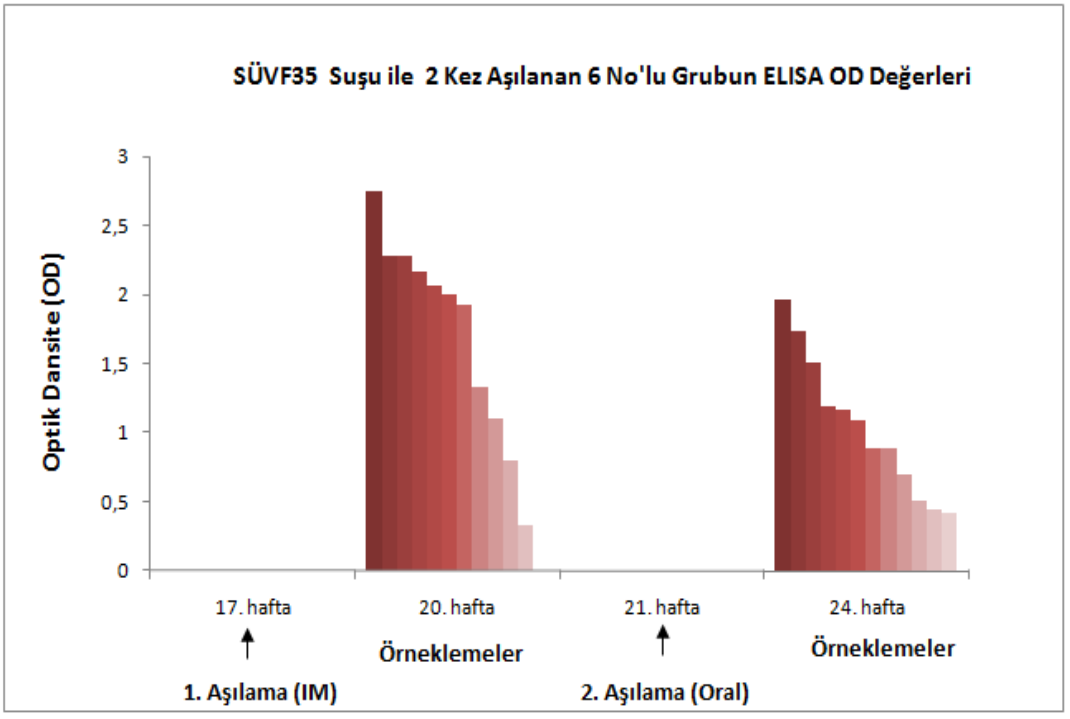
Çizelge 3.6. İki kez aşılı grupların ELISA testi ile seropozitiflik oranları.

Grup No	**5**	**6**	**7**	**Kontrol 2**
	n: 12	**n: 12**	**n: 12**	**n: 12**
Aşı Suşu	SÜVF33	SÜVF35	SÜVF88	//////////////
1. Aşılama Seropozitiflik Oranı	0/12	11/12	2/12	0/12
2. Aşılama seropozitiflik Oranı	7/12	12/12	6/12	0/12

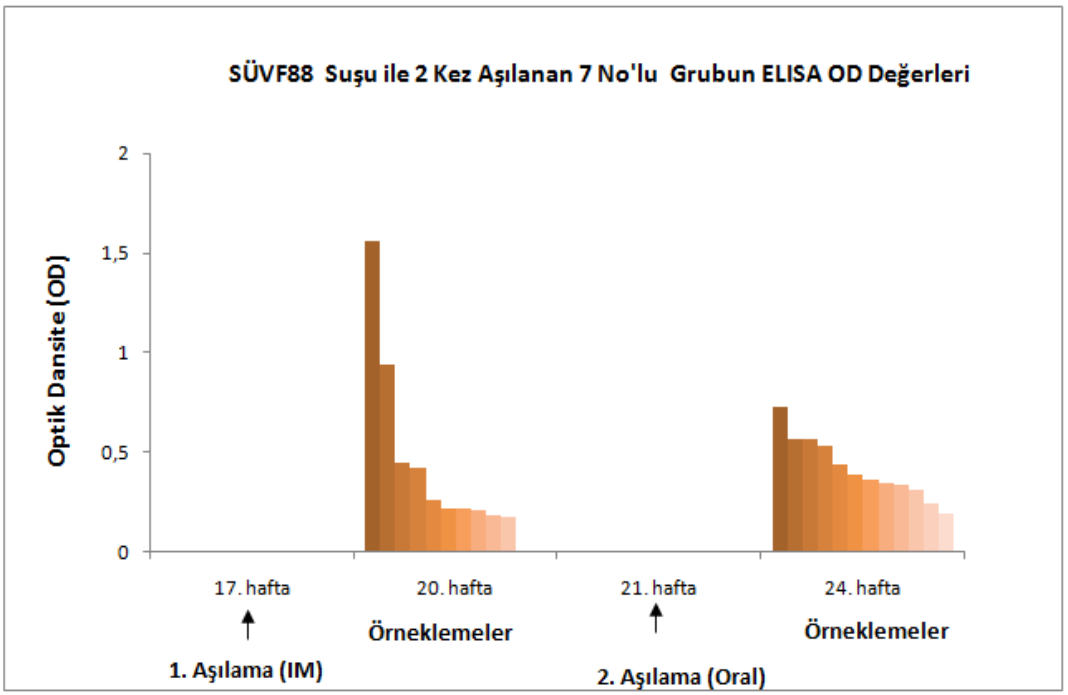
SÜVF33, SÜVF35 ve SÜVF88 aşı suşları ile kas içi ve oral yolla iki kez aşılanan 5, 6 ve 7 no'lu grupların 1. ve 2. ELISA OD değerleri sırası ile Şekil 3.5, Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. SÜVF33 suşu ile17. haftada kas içi ve 21. haftada oral yolla iki kez aşılanan 5 no'lu grubun, 1. ve 2. aşılamalardan 21 gün sonra ELISA OD değerleri ($OD_{405\ nm}$).



Şekil 3.6. SÜVF35 suşu ile17. haftada kas içi ve 21. haftada oral yolla iki kez aşılanan 6 no'lu grubun, 1. ve 2. aşılamalardan 21 gün sonra ELISA OD değerleri ($OD_{405\ nm}$).



Şekil 3.7. SÜVF88 suşu ile17. haftada kas içi ve 21. haftada oral yolla iki kez aşılanan 7 no'lu grubun, 1. ve 2. aşılamalardan 21 gün sonra ELISA OD değerleri ($OD_{405\ nm}$).

3.8. Reizolasyon Sonuçları

3.8.1. Bir kez Aşılanan Grupların Reizolasyon Sonuçları

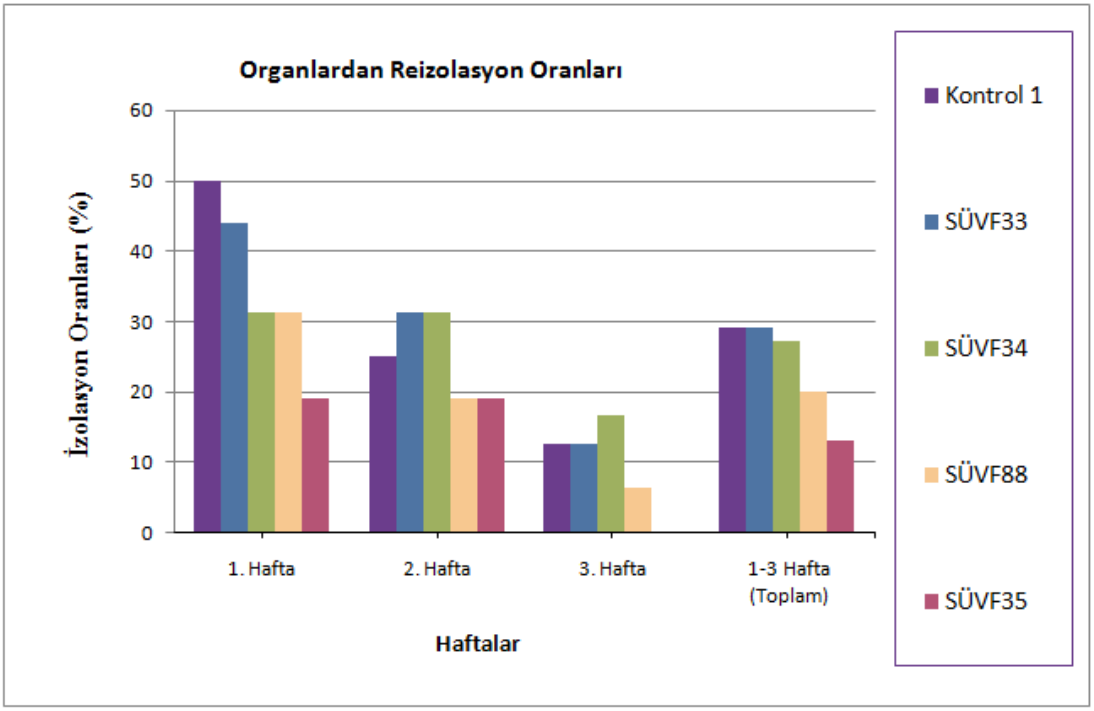
Üç hafta içinde dörderli gruplar halinde reizolasyon çalışmaları yapılan tavukların; Kontrol 1 grubunda 4 tavuğun 16 organından 1. hafta 8 adet, 2. hafta 4 adet, 3. hafta 2 adet *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı. SÜVF33 suşu ile aşılanan 1 no'lu grupta; 1. hafta 4 tavuğun 16 organından 7 adet, 2. hafta 5 adet, 3. hafta 2 adet *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı. SÜVF34 suşu ile aşılanan 2 no'lu grupta; 1. hafta 4 tavuğun 16 organından 5 adet, 2. hafta 5 adet, 3. hafta 2 adet *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı. SÜVF35 suşu ile aşılanan 3 no'lu grupta; 1. hafta 4 tavuğun 16 organından 3 adet, 2. hafta 3 adet, 3. hafta 0 adet *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı . SÜVF88 suş ile aşılanan 4 no'lu grupta; 1. hafta 4 tavuğun 16 organından 5 adet, 2. hafta 3 adet, 3. hafta 1 adet *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı. Haftalara göre organlardan reizolasyon sayıları (Çizelge 3.7) gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Bir Kez aşılı ve kontrol grubu tavukların karaciğer, dalak, ovaryum ve sekumlarından *Salmonella* spp. reizolasyon sonuçları.

Haftalar	Grup No (Aşı suşu)	Örnekleme Yapılan Organlar				
		karaciğer	dalak	ovaryum	sekum	Toplam
1. Hafta Reizolasyon Sonuçları	**KONTROL 1**	3/4	2/4	1/4	2/4	8/16
	1 (SÜVF33)	2/4	1/4	2/4	2/4	7/16
	2 (SÜVF34)	2/4	2/4	0/4	1/4	5/16
	3 (SÜVF35)	1/4	1/4	0/4	1/4	3/16
	4 (SÜVF88)	2/4	1/4	0/4	2/4	5/16
2. Hafta Reizolasyon Sonuçları	**KONTROL 1**	2/4	1/4	0/4	1/4	4/16
	1 (SÜVF33)	2/4	2/4	0/4	1/4	5/16
	2 (SÜVF34)	2/4	1/4	0/4	2/4	5/16
	3 (SÜVF35)	1/4	1/4	0/4	1/4	3/16
	4 (SÜVF88)	1/4	1/4	0/4	1/4	3/16
3. Hafta Reizolasyon Sonuçları	**KONTROL 1**	0/4	1/4	0/4	1/4	2/16
	1 (SÜVF33)	1/4	1/4	0/4	0/4	2/16
	2 (SÜVF34)	0/3	1/3	0/3	1/3	2/12
	3 (SÜVF35)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/16
	4 (SÜVF88)	0/4	1/4	0/4	0/4	1/16
1-3 Hafta Toplam Reizolasyon Sonuçları	**KONTROL 1**	5/12	4/12	1/12	4/12	14/48
	1 (SÜVF33)	5/12	4/12	2/12	3/12	14/48
	2 (SÜVF34)	4/11	4/11	0/11	4/11	12/44
	3 (SÜVF35)	2/12	2/12	0/12	2/12	6/48
	4 (SÜVF88)	3/12	3/12	0/12	3/12	9/48

Eprüvasyondan 1 hafta sonra, dörtlü gruplar halinde gerçekleştirilen reizolasyon çalışmalarında; tüm organlardan **1. hafta** Kontrol 1 grubunda %50, 1 nolu grupta (SÜVF33) %43,75, 2 nolu grupta (SÜVF34) %31,25, 3 nolu grupta (SÜVF35) %18,75, 4 nolu grupta (SÜVF88) %31,25 oranlarında, **2. hafta** Kontrol 1 grubunda %25, 1 nolu grupta %31,25, 2 nolu grupta %31,25, 3 nolu grupta %18,75, 4 nolu grupta %18,75 oranlarında**, 3. hafta** Kontrol 1 grubunda %12,50, 1 nolu grupta %12,50, 2 nolu grupta % 16,66, 3 nolu grupta % 0, 4 nolu grupta % 6,25 oranlarında *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı (Şekil 3.8).

Toplam üç haftalık reizolasyon çalışmalarında; Kontrol 1 grubunda, 12 tavuğun 48 organından 14 adet (%29) *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı. SÜVF33 no'lu suşla aşılanan (1 no'lu grup) 12 tavuğun 48 organından 14 adet (%29) *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı. SÜVF34 no'lu suşla aşılanan (2 no'lu grup) 11 tavuğun 44 organından 12 adet (%27) *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı. SÜVF35 no'lu suşla aşılanan (3 no'lu grup) 12 tavuğun 48 organından 6 adet (%13) *Salmonella* spp izolasyonu yapıldı. SÜVF88 no'lu suşla aşılanan (4 no'lu grup) 12 tavuğun 48 organından yapılan ekimlerde 9 adet (%20) *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Bir kez aşılı gruplarda eprüvasyon sonrası 1., 2., 3. haftalarda ve toplamda organlardan reizolasyon oranları (%).

3.8.2. İki kez Aşılanan Grupların Reizolasyon Sonuçları

Eprüvasyondan 1 hafta sonra, birer hafta ara ile 4' lü gruplar halinde organlardan yapılan reizolasyon çalışmalarında; **Kontrol 2 grubunda** 4 tavuğun 16 organından 1. hafta 10 adet, 2. hafta 4 adet, 3. hafta 3 adet *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı. **SÜVF33 suşu ile aşılanan 1 no'lu grupta**; 1. hafta 4 tavuğun 16 organından 6 adet, 2. hafta 4 adet, 3. hafta 3 adet *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı. **SÜVF35 suşu ile aşılanan 3 no'lu grupta;** 1. hafta 4 tavuğun 16 organından 4 adet, 2. hafta 4 adet, 3. hafta 2 adet *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı. **SÜVF88**

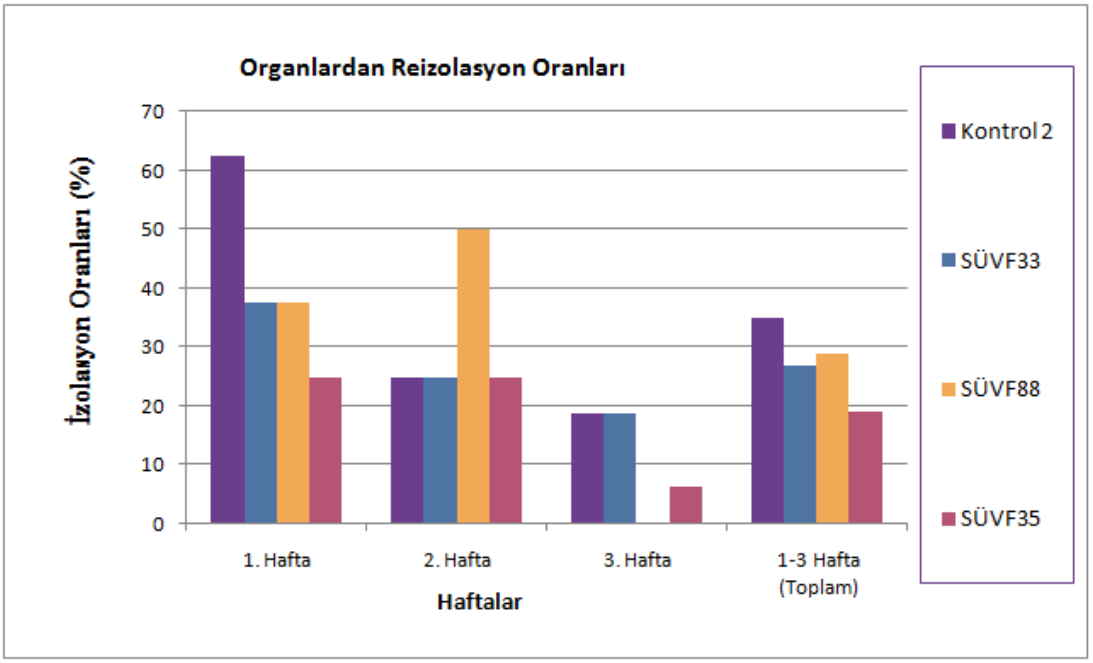
suş ile aşılanan 4 no'lu grupta; 1. hafta 4 tavuğun 16 organından 6 adet, 2. hafta 8 adet, 3. hafta 0 adet *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. İki kez aşılı ve kontrol grubu tavukların karaciğer, dalak, ovaryum ve sekumlarından *Salmonella* spp. reizolasyon sonuçları.

Haftalar	Grup No (Aşı suşu)	Örnekleme Yapılan Organlar				
		karaciğer	dalak	ovaryum	sekum	Toplam
1. Hafta	KONTROL 2	3/4	2/4	2/4	3/4	10/16
	5 (SÜVF33)	2/4	1/4	1/4	2/4	6/16
	6 (SÜVF35)	1/4	1/4	0/4	2/4	4/16
	7 (SÜVF88)	1/4	2/4	1/4	2/4	6/16
2. Hafta	KONTROL 2	1/4	2/4	0/4	1/4	4/16
	5 (SÜVF33)	1/4	2/4	0/4	1/4	4/16
	6 (SÜVF35)	1/4	1/4	0/4	2/4	4/16
	7 (SÜVF88)	3/4	2/4	2/4	1/4	8/16
3. Hafta	KONTROL 2	1/4	1/4	0/4	1/4	3/16
	5 (SÜVF33)	2/4	0/4	0/4	1/4	3/16
	6 (SÜVF35)	0/4	0/4	0/4	1/4	1/16
	7 (SÜVF88)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/16
Toplam (1-3 Hafta)	KONTROL 2	5/12	5/12	2/12	5/12	17/48
	5 (SÜVF33)	5/12	3/12	1/12	4/12	13/48
	6 (SÜVF35)	2/12	2/12	0/12	5/12	9/48
	7 (SÜVF88)	4/12	4/12	3/12	3/12	14/48

Eprüvasyondan 1 hafta sonra, haftalık dörtlü gruplar halinde gerçekleştirilen reizolasyon çalışmalarında; tüm organlardan **1. hafta** Kontrol 2 grubunda % 62,50, 5 nolu grupta (SÜVF33) % 37,50, 6 nolu grupta (SÜVF35) % 25, 4 nolu grupta (SÜVF88) % 37,50 oranlarında, **2. hafta** Kontrol 2 grubunda % 25, 5 nolu grupta % 25, 6 nolu grupta % 25, 7 nolu grupta % 50, **3. hafta** Kontrol 2 grubunda %18,75, 5 nolu grupta %18,75, 6 nolu grupta % 6,25, 7 nolu grupta % 0 oranlarında *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı (Şekil 3.9).

Toplam üç haftalık reizolasyon çalışmalarında; Kontrol 2 grubunda, toplamda 12 tavuğun 48 organından 17 adet (%35) *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı. SÜVF33 no'lu suşla aşılanan (5 no'lu grup) 12 tavuğun 48 organından 13 adet (%27) *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı. SÜVF35 no'lu suşla aşılanan (6 no'lu grup) 12 tavuğun 48 organından 9 adet (%19) *Salmonella* spp izolasyonu yapıldı. SÜVF88 no'lu suşla aşılanan (7 no'lu grup) 12 tavuğun 48 organından yapılan ekimlerde 14 adet (%29) *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı (Şekil 3.9).

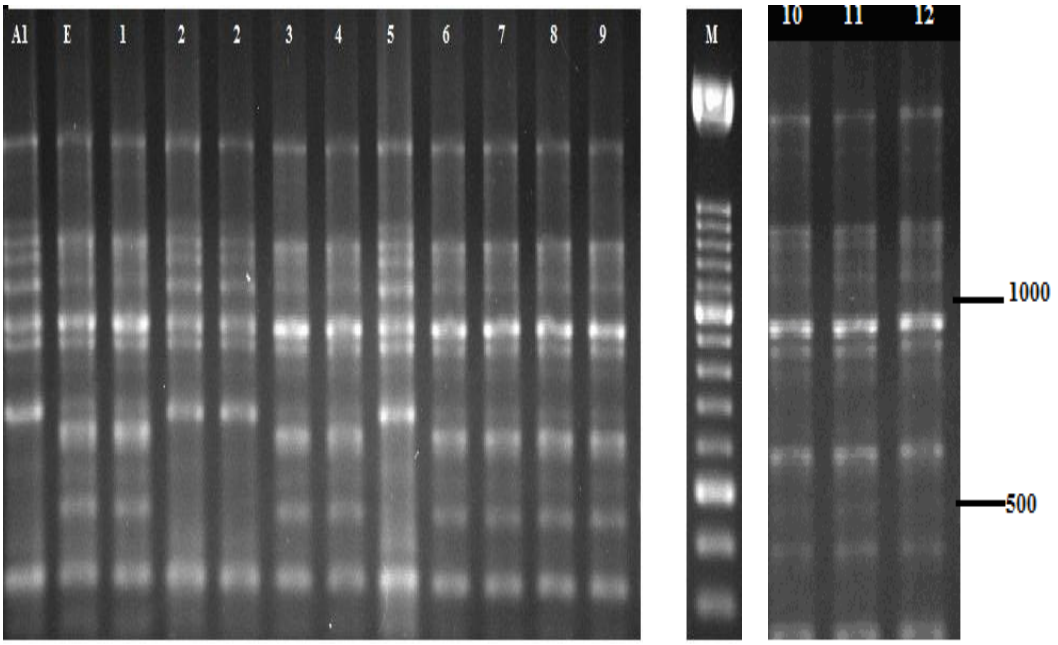


Şekil 3.9. İki kez aşılı grupların eprüvasyon sonrası 1., 2., 3. haftalarda ve toplamda organlardan reizolasyon oranları (%).

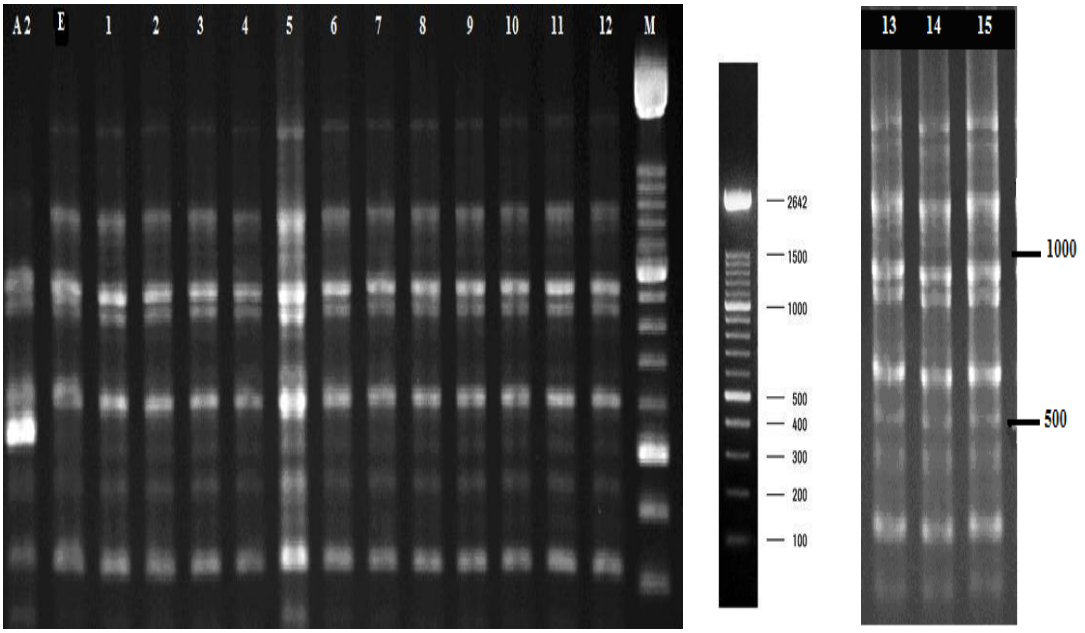
Organ izolatlarının tiplendirilmeleri, SÜVF 33 aşısı uygulananlar hariç, RAPD PZR ile gerçekleştirildi. SÜVF33 aşısı (*S.* Pullorum) uygulanan tavuklardan elde edilen izolatlar VITEK 2 compact cihazında identifiye edildi. Hareket muayenesi sonucunda suşların hareketsiz olduğu tespit edildi. Hiçbirinde *S.* Pullorum izolasyonu gerçekleşmedi. Bu izolatlar RAPD PZR ile doğrulanarak, *S.* Enteritidis olarak tiplendirildi.

3.9. RAPD PZR Sonuçları

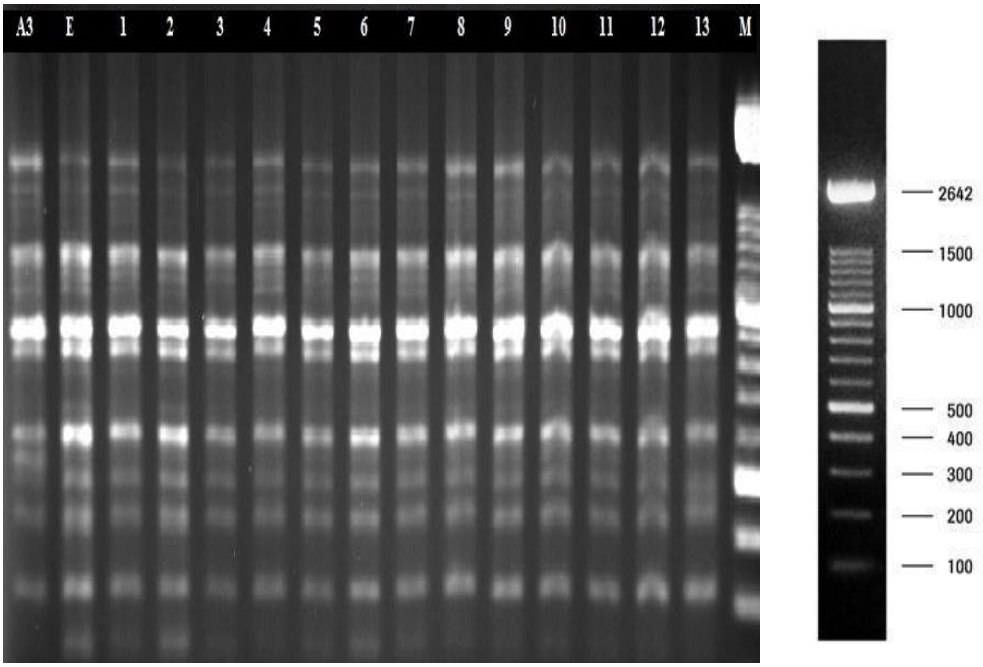
1254 primeri ile yapılan RAPD PZR analizinde; eprüvasyon suşu AVKE SE1 no'lu suş, 350, 450, 500, 650, 500, 850, 950, 1300 bp civarında toplam 6 bant (Şekil 3.10, 3.11, 3.12, 3.13) verdi. Aşı suşları; SÜVF34 no'lu suş, 1300, 1250, 1100, 950, 850, 700, 350 bp civarında 7 bant (3.10), SÜVF35 no'lu suş (Şekil 3.11) ve 88 no'lu suş (Şekil 3.12 ve 3.13) 350 ,450, 550, 650, 850, 950, 1300 bp civarında toplam 6 bant verdi.



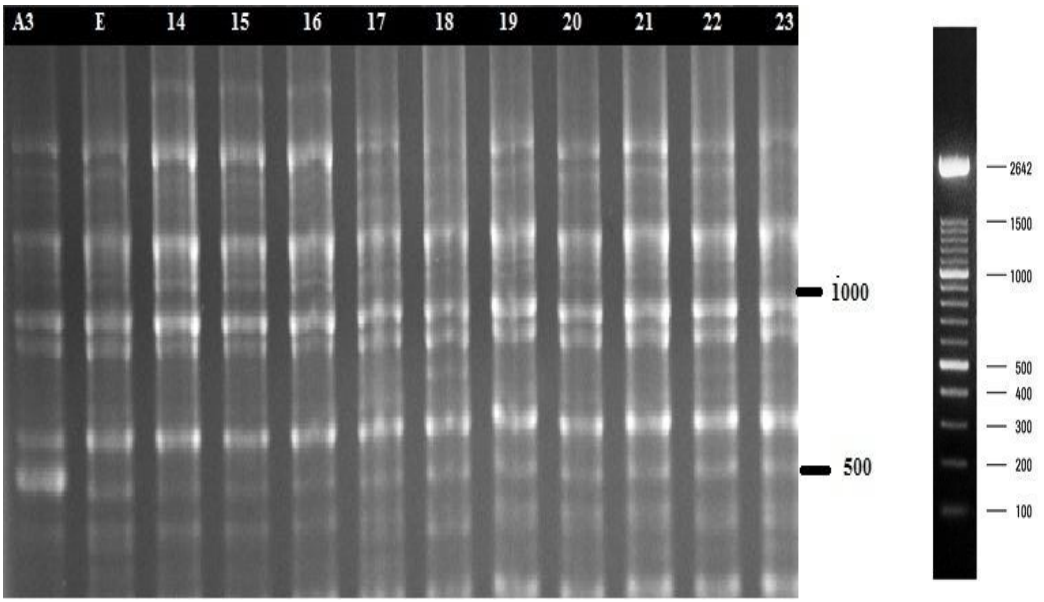
Şekil 3.10. A1: SÜVF34, E: AVKE SE1, M: Marker 100 bp (1500 bp, Roche), 1-12: Bir kez aşılı grubun reizolasyonundan ve İki kez aşılı grubun reizolasyonundan elde edilen izolatların Primer P1254 ile RAPD PZR bant profilleri.



Şekil 3.11. A2: SÜVF35, E: AVKESE1, M: Marker 100 bp (1500 bp, Roche), 1-15: Bir kez aşılı grubun reizolasyonundan ve İki kez aşılı grubun reizolasyonundan elde edilen izolatların Primer 1254 ile RAPD PZR bant profilleri.



Şekil 3.12. A3: 88, E: AVKESE1, M: Marker 100 bp (1500 bp, Roche), 1-13: Bir kez aşılı grubun reizolasyonundan ve İki kez aşılı grubun reizolasyonundan elde edilen izolatların Primer 1254 ile RAPD PZR bant profilleri.



Şekil 3.13. A3: 88, E: AVKESE1, 14-23: Bir kez aşılı grubun reizolasyonundan ve İki kez aşılı grubun reizolasyonundan elde edilen izolatların Primer 1254 ile RAPD PZR bant profilleri.

RAPD PZR çalışmaları sonuçlarına göre; bir kez aşılı gruplardan yalnızca SÜVF34 suşu ile aşılananlarda (2 no'lu grup) 2 izolasyonda aşı suşu tespit edilmiş olup, diğer gruplardan yapılan izolasyonların tümü eprüvasyon suşu olup, aşı suşları izole edilememiştir. İki kez aşılanan gruplarda tüm izolatlar eprüvasyon suşu olarak tespit edilmiş, hiç bir grupta aşı suşu izole edilemedi (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Bir kez aşılanan gruplarda aşı suşlarının reizolasyon sonuçları.

Grup No/Aşı suşu	**Örnekleme yapılan organlar**			
	Karaciğer	**Dalak**	**Ovaryum**	**Sekum**
1/ SÜVF33	0/12	0/12	0/12	0/12
2/ SÜVF34	0/11	0/11	0/11	2/11
3/ SÜVF35	0/12	0/12	0/12	0/12
4/ SÜVF88	0/12	0/12	0/12	0/12

Bir kez aşılı grupların, RAPD PZR bant profillerine göre aşı suşları ile eprüvasyon suşlarının ayrımı sağlandı. Bir kez aşılanan ve kontrol gruplarının

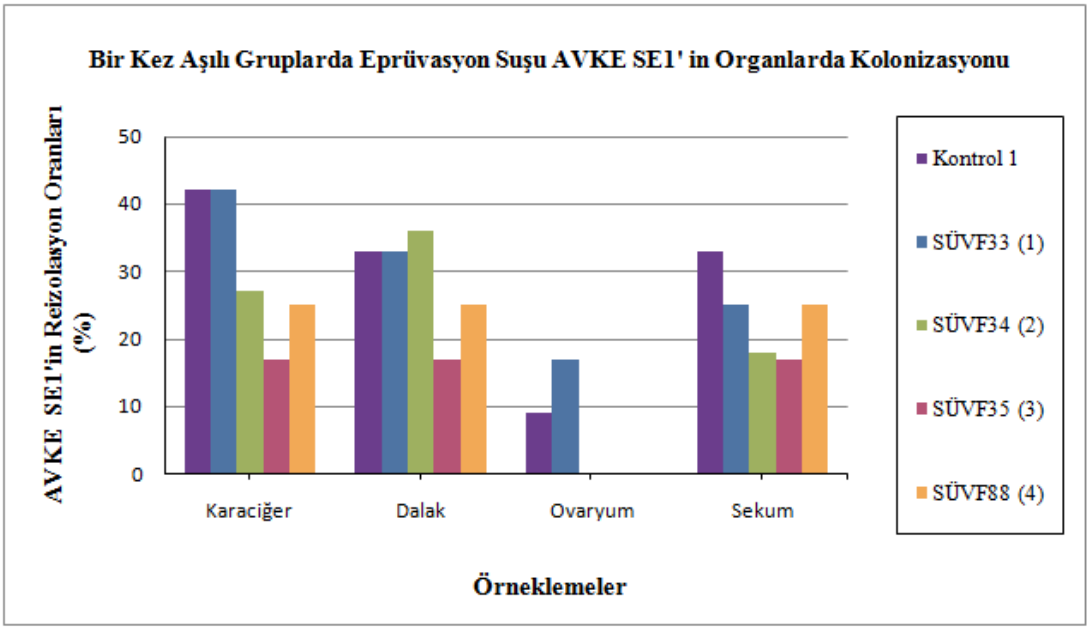
organlarından AVKE SE1 eprüvasyon suşunun izolasyon sonuçları Çizelge 3.10.'da gösterilmiştir

Çizelge 3.10. Bir kez aşılı ve kontrol gruplarından eprüvasyon suşu AVKE SE1'in reizolasyon sonuçları.

Grup No (Aşı suşu)	**Örnekleme yapılan organlar**				
	Karaciğer	**Dalak**	**Ovaryum**	**Sekum**	**Toplam**
KONTROL 1	5/12	4/12	1/12	4/12	14/48
1 (SÜVF33)	5/12	4/12	2/12	3/12	14/48
2 (SÜVF34)	4/11	4/11	0/11	2/11	10/44
3 (SÜVF35)	2/12	2/12	0/12	2/12	6/48
4 (SÜVF88)	3/12	3/12	0/12	3/12	9/12

Bu sonuçlar, $\chi 2$ testi kullanılarak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, önemli bulunmuştur ($P<0,01$). Bir kez aşılı gruplarda; SÜVF 33 ile aşılanan grupta (1 no'lu grup) eprüvasyon suşunun organlardan izolasyon oranları; karaciğer %42, dalak %33, ovaryum %17, sekum %25 olarak belirlenirken, SÜVF34 ile aşılanan grupta (2 no'lu grup) izolasyon oranları; karaciğer %27, dalak %36, ovaryum %0, sekum %18 olarak belirlenirken, SÜVF35 ile aşılanan grupta (3 no'lu grup) izolasyon oranları; karaciğer, dalak ve sekum %17, ovaryum %0 olarak belirlenirken, SÜVF 88 ile aşılanan grupta (4 no'lu grup) izolasyon oranları; karaciğer, dalak ve sekum %25, ovaryum %0 olarak belirlenmiştir. Kontrol 1 grubunda eprüvasyon suşunun organlardan izolasyon oranları; karaciğer %42, dalak ve sekum %33, ovaryum %9, olarak belirlendi.

Bir kez aşılı gruplarda, toplamda tüm organlardan eprüvasyon suşunun izolasyon oranları, kontrol 1 grubunda %29, SÜVF33 no'lu suşla aşılanan 1 no'lu grupta %29, SÜVF34 no'lu suşla aşılanan 2 no'lu grupta %23, SÜVF35 no'lu suşla aşılanan 3 no'lu grupta %12,5, SÜVF88 no'lu suşla aşılanan 4 no'lu grupta %19 olarak tespit edildi (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Bir kez aşılı gruplarda eprüvasyon suşu AVKE SE1'in karaciğer, dalak, ovaryum ve sekumdan izolasyon oranları (%).

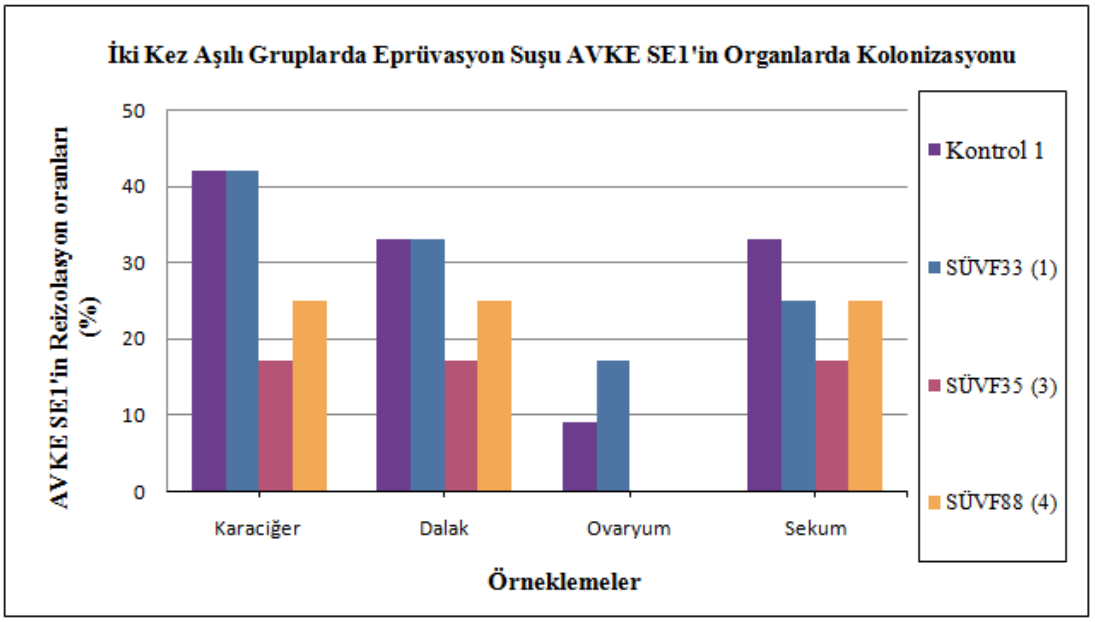
İki kez aşılı ve kontrol 2 gruplarından eprüvasyon suşunun organlardan reizolasyon sonuçları Çizelge 3.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. İki kez aşılı ve kontrol gruplarından eprüvasyon suşu AVKE SE1'in reizolasyon sonuçları.

Grup No (Aşı suşu)	**Örnekleme yapılan organlar**				
	Karaciğer	**Dalak**	**Ovaryum**	**Sekum**	**Toplam**
KONTROL 2	5/12	5/12	2/12	5/12	17/48
5 (SÜVF33)	5/12	3/12	1/12	4/12	13/48
6 (SÜVF35)	2/12	2/12	0/12	5/12	9/48
7 (SÜVF88)	4/12	4/12	3/12	3/12	14/48

Bu sonuçlar $\chi 2$ testi kullanılarak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, önemli bulundu ($P<0,01$). İki kez aşılı gruplarda; SÜVF33 ile aşılanan grupta karaciğer %42, dalak %25, ovaryum %9, sekum %33 oranlarında, SÜVF35 ile aşılanan grupta karaciğer ve dalak %17, ovaryum %0, sekum %42 oranlarında, SÜVF88 ile aşılanan grupta karaciğer ve dalak %33, ovaryum ve sekum %25 oranlarında eprüvasyon suşu izole edilirken, kontrol 2 grubunda karaciğer, dalak ve sekum %42, ovaryum %17

oranlarında eprüvasyon suşu izole edilmiştir (Şekil 3.15). Tüm organlardan toplamda eprüvasyon suşunun izolasyon oranı, kontrol grubunda %35, SÜVF33 grubunda %27, SÜVF35 grubunda %19, SÜVF88 grubunda %29 olarak tespit edildi.



Şekil 3.15. Bir kez aşılı gruplarda eprüvasyon suşu AVKE SE1'in karaciğer, dalak, ovaryum ve sekumdan izolasyon oranları (%).

4. TARTIŞMA

Kanatlı yetiştiriciliğinde, Salmonella enfeksiyonlarının kontrolünde birinci hedef, et veya yumurta gibi gıda zinciri ile bulaşan paratifoid salmonella etkeni serovarların kontrol altına alınmasıdır. Bu kontrolde başarı, çiftliklerden başlamakta ve sıkı sanitasyon önlemlerinin (altlık, yem, su, rodent ve kuşlar) desteklediği, kaliteli yönetim ile sağlanabilmektedir. Aşılamalar uygulanabilecek etkili spesifik kontrol yöntemleri arasındadır (GAST 2003, EFSA 2004, ARDA 2006, OEI 2010).

Halk sağlığıyla en fazla ilişkili bulunan *S.* Enteritidis ve *S.* Typhimurium serovarlarına karşı Salmonella aşı geliştirme çalışmalarına olan ilgi son zamanlarda artış göstermiştir. Pek çok ülkede canlı veya inaktif Salmonella aşıları kullanılmaktadır (GAST 2003, EFSA 2004, BARROW 2007).

Salmonella enfeksiyonlarının kontrolünde aşılamaların iki hedefi vardır; birincisi, kanatlılarda sistemik enfeksiyonu ve reprodüktif organlarda lokalizasyonu önlemek, ikincisi de bakterinin dışkı ile saçılımını azaltarak, bunun sonucunda meydana gelebilecek karkas ve yumurta kontaminasyonunu en aza indirmektir. Bu hedeflerin değerlendirilmesi genellikle, çeşitli iç organların, kloakal sıvapların ve sekal içeriğin kalitatif ve/veya kantitatif olarak mikrobiyolojik muayenesini içeren "aşı potens testi" ile gerçekleştirilir (EFSA 2004).

Canlı *S.* Enteritidis aşılarının koruyuculuğunun araştırıldığı birçok çalışmada (Barrow ve ark 1991, Cerquetti ve ark 2000, Woodward ve ark 2002, Methner ve ark 2004), eprüvasyon suşunun organlardan izolasyon oranlarına, fekal saçılımına, yumurta kontaminasyonuna bakılarak etkinlik değerlendirilmesi yapılmıştır.

Bu çalışmada; Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kültür Kolleksiyonu'ndan temin edilen, 20 yıldır sürekli pasajlanan, 1 adet *S.* Pullorum ve 3 adet *S.* Enteritidis saha suşundan hazırlanan canlı aşıların humoral bağışıklığı uyarmadaki etkinlikleri ve *S.* Enteritidis eprüvasyon suşuna karşı koruyuculukları araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan bütün suşların antibiyotik duyarlılıkları saptanmış ve aşı suşları ile eprüvasyon suşunun ayrımı RAPD PZR analiziyle gerçekleştirilmiştir.

Ülkemizde yapılan, kanatlı Salmonella izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirildiği çalışmalarda; Kalender ve Muz (1999), en çok gentamisin, enrofloksasin, streptomisin ve neomisin antibiyotiklerine karşı duyarlılık tespit ettiklerini, Kılınç ve Aydın (2006), Salmonella izolatlarını, %20 ampsilin'e, %23 neomisin'e, %95 eritromisin'e ve %100 penisilin'e dirençli ve en fazla norfloksasin, danofloksasin, gentamisin, trimetoprim/sülfametoksazol ve amoksisilin'e duyarlılık saptadıklarını bildirmişlerdir. Türkyılmaz ve ark (2007), Salmonella izolatlarının; %100 penisilin G ve eritromisin'e, %63 gentamisine, %47 ampisiline dirençli, %68 danofloksasin ve trimetoprim-sulfametoksazol'e, %63 tetrasiklin'e, % 42 kanamisin'e duyarlı olarak bulmuşlardır. Oral ve ark (2008), Salmonella izolatlarının; % 97 enrofloksasin'e, % 89 kolistin sülfat'a, %93 oksitetrasikline, %76 gentamisin'e, %72 amoksisiline, %63 doksisiline, %40 linkomisin ve spektinomisin'e, %38 neomisine ve %10 trimetoprim-sulfametoksazol duyarlı olarak tespit etmişlerdir. Temelli ve ark (2012) Salmonella izolatlarının; eritromisin, spiramisin, penisilin G, doksisiklin hidroklorür ve tetrasiklin'e %100 dirençli olduğunu bulurken, izolatların %55'nin 10, 12, 15 ve 17 antimikrobiyale çoklu ilaç direnci gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, suşların antibiyotik dirençliliğini görmek ve aşı suşu ile eprüvasyon suşunun ayrımlarını yapmak amacıyla değerlendirildiğinde; Kılınç ve Aydın (2006), Türkyılmaz ve ark (2007), Temelli ve ark'nın (2012) çalışmalarıyla uyumlu olarak bütün suşların eritromisine karşı dirençli olduğu, Temelli ve ark (2012) çalışmaları ile uyumlu olarak SÜVF34 ve SÜVF88 no'lu suşların gentamisin, sulfametoksazol/ trimetoprim, streptomisin ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı çoklu dirençli olduğu, fakat SÜVF33 ve SÜVF35 no'lu suşların eprüvasyon suşundan farklı olarak, kullanılan antibiyotiklere karşı bir direnç geliştirmediği görülmüştür. Eprüvasyon suşu AVKE SE1 suşunun ayrımı sağlayacak şekilde diğer suşlardan farklı antibiyotik dirençliliği tespit edilemediğinden, suşların ayrımı amacıyla kullanılmamıştır.

Araştırmada kullanılan; SÜVF34, SÜVF35, SÜVF88 *S.* Enteritidis aşı suşların ve eprüvasyon suşu (*S.* Enteritidis) AVKE SE1'in 23L, OPA-4, OPB-06, OPB-15 primerleri ile yapılan RAPD PZR analizinde, suşlar arasında polimorfizmin

belirlenmesinde yeterli olmadıkları görülmüş, P1254 primeri en iyi ayrımı sağladığından, RAPD PZR çalışmalarında bu primer kullanılmıştır.

P1254 primeri ile yapılan *S.* Enteritidis suşlarının RAPD PZR analizlerinde; Lin ve ark (1996), suşların (n=13) 3 farklı bant profili oluşturduğu bildirirken, Betancor ve ark (2004), suşların (n=20) 4 farklı bant profili oluşturduğunu, Morshed ve Peighambari (2010), suşların (n=49) 6 farklı bant profili oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, RAPD PZR analizinde; SÜVF35, SÜVF88 ve AVKE SE1 no'lu suşlar 6 bant oluştururken, SÜVF34 no'lu suş 7 bant oluşturmuştur. SÜVF35 ve 88 no'lu suşların bant profilleri aynı bulunurken, eprüvasyon suşu AVKE SE1 ve SÜVF34 suşlarının bant profilleri diğerlerinden farklı bulunmuştur. SÜVF35 ve SÜVF88 no'lu suşların bant profilleri Lin ve ark (1996) çalışmalarında bildirdikleri bant profillerinden biri ile uyumlu bulunurken, AVKESE1 no'lu suşun bant profili Betancor ve ark (2004) ile Morshed ve Peighambari'nin (2010), SÜVF34 no'lu suşun bant profili ise Morshed ve Peighambari'nin (2010) çalışmalarında bildirdikleri bant profilleri ile uyumlu bulunmuştur. Araştırmacıların çalışmalarında, en baskın bant profilinin AVKE SE1 suşunun oluşturduğu profil olduğu görülmüştür. RAPD PZR analizinin tekrarlanabilirliği ile ilgili olumsuz görüşler olmakla birlikte (Erdem ve ark 2007, Durmaz 2001), uygun primerler kullanıldığında, DNA izolasyonu ve amplifikasyon basamaklarının her zaman aynı koşullar altında yapıldığında hızlı, tekrarlanabilir ve ayrım gücü yüksek bir yöntem olduğu düşünülebilir.

Barrow ve ark (1991), iki farklı Salmonella suşunun *S.* Enteritidis suşu ile eprüvasyona karşı koruyuculuğunu araştırdıkları çalışmalarında; 24 haftalık yaşta 2 farklı yumurtacı tavuk grubunu (n=20), 2 hafta aralıklarla iki kez, bir grubu *S.* Gallinarum 9R suşu ile 10^8 cfu dozda kas içi yolla ve diğer grubu Rough *aro*A *S.* Enteritidis PT4 suşu ile $3x10^8$ cfu dozda oral yolla aşılamışlardır. İkinci aşılamalardan 2 hafta sonra tavukları, patojen *S.* Enteritidis PT4 suşuyla eprüve etmişlerdir. 9R suşu ile aşılanan grupta; tüm organlardan toplamda %25 oranında eprüvasyon suşunun izolasyonu gerçekleşirken, değişik organlardan eprüvasyon suşunun izolasyon oranları, karaciğer %20, dalak %20, ovaryum %0, sekum %80 olarak tespit edilmiş, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 9R aşı suşunun eprüvasyon suşunun organlardan izolasyon oranlarında belirgin azalma sağladığı görülmüştür.

Aksine, Rough *aro*A *S.* Enteritidis PT4 ile aşılanan grupta; tüm organlardan toplamda %38 oranında eprüvasyon suşunun izolasyonu gerçekleşirken, değişik organlardan eprüvasyon suşunun izolasyon oranları, karaciğer %45, dalak ve sekum %60, ovaryum %35 olarak tespit edilmiş, kontrol grubunun izolasyon oranları ile karşılaştırıldığında çok az farklılık olduğunu bildirmişlerdir. Kontrol grubunda, tüm organlardan toplamda %46 oranında eprüvasyon suşunun izolasyonu gerçekleşirken, değişik organlardan eprüvasyon suşunun izolasyon oranları; dalak %85, karaciğer %63, sekum %55, ovaryum %40 olarak gerçekleşmiştir. Her iki aşının da yumurtadan Salmonella izolasyon oranında azalma sağladığını bildirmişlerdir. Ayrıca, 9R aşı suşu deneme süresince ovaryumlardan izole edilmiştir. Eprüvasyondan 2 hafta sonra, 3 haftalık sürede gerçekleştirilen izolasyon çalışmalarında, 9R aşı suşu tüm organlardan toplamda %47 oranında izole edilirken, Rough *aro*A *S.* Enteritidis PT4 aşı suşu, 1 izolasyon (dalak) dışında hiçbir organdan izole edilememiştir. Araştırmacılar, 9R suşunun, ovaryumlarda dahil organların bir çoğundan, eprüvasyon suşunun izolasyon oranında belirgin düzeyde azalma sağladığını tespit ederken, Rough *aro*A *S.* Enteritidis PT4 suşunun, ovaryum ve iç organlardan eprüvasyon suşunun izolasyon oranında önemsiz düzeyde azalma sağladığını bildirmişlerdir. Organlardan izolasyon çalışmalarının bir bölümünü kalitatif kültür yöntemiyle yaparken, bazılarında hem kalitatif hem de kantitatif kültür yöntemini kullanmışlardır. Kloakadan aldıkları örneklerden yapılan direkt ekimlerde (kantitatif), ön zenginleştirme yapılan ekimlere (kalitatif) göre izolasyon oranının % 30-50 civarında olduğu görülmüştür.

Hassan ve ark (1997), avirulent canlı Δcya Δcrp *S.* Typhimurium χ3985 mutant suş ile yaptıkları aşı çalışmalarında; 2 haftalık ve 4 haftalık yaşta oral yolla iki kez aşıladıkları tavukları, *S.* Enteritidis ve *S.* Typhimurium saha suşları ile 12, 24, 36 ve 48 haftalık yaşlarda eprüve etmişler ve eprüvasyondan 2 hafta sonra bakteriyolojik muayenelerini yapmışlardır. *S.* Typhimurium saha suşu ile eprüve edilen kontrol gruplarında eprüvasyon suşunun izolasyon oranları; 12 haftalık yaşta eprüve edilen tavuklarda (n=5), karaciğer %40, dalak ve sekum %60, ovaryum %20, 24 haftalık yaşta eprüve edilen tavuklarda; dalak %60, karaciğer, sekum ve ovaryum %20, 36 haftalık yaşta eprüve edilen tavuklarda; karaciğer ve ovaryum %60, dalak ve sekum %40, 48 haftalık yaşta eprüve edilen tavuklarda, karaciğer, dalak ve ovaryum %100, sekum %40 olarak gerçekleşirken, aşılanmış gruplarda hiçbir organdan

eprüvasyon suşu izole edilememiştir. *S.* Enteritidis saha suşu ile eprüve edilen kontrol gruplarında eprüvasyon suşunun izolasyon oranları; 12 haftalık yaşta eprüve edilen tavuklarda (n=5), sekum %100, karaciğer ve dalak %60, ovaryum %40, 24 haftalık yaşta eprüve edilen tavuklarda; karaciğer, dalak, ovaryum ve sekum %20, 36 haftalık yaşta eprüve edilen tavuklarda; dalak %60, karaciğer, ovaryum ve sekum %40, 48 haftalık yaşta eprüve edilen tavuklarda, karaciğer, dalak ve ovaryum %100, sekum %20 oranlarında gerçekleştirilirken, aşılanmış gruplarda hiçbir organdan eprüvasyon suşu izole edilememiştir. Araştırmacılar, aşının, *S.* Enteritidis ve *S.* Typhimurium saha suşlarının intestinal, viseral, reprodüktif organlarda ve yumurtalarda kolonizasyon, invazyon ve/veya kontaminasyonuna karşı mükemmel koruma sağladığını bildirmişlerdir.

Woodward ve ark (2002), *S.* Enteritidis (Salenvac) bakterin aşıyı kullanarak, 1 günlük ve 4 haftalık yaşta yumurtacı tavukları (n=20) kas içi yolla aşılayıp, 8 haftalık, 17 haftalık, 23 haftalık ve 30 haftalık yaşlarda *S.* Enteritidis PT4 suşu ile IV yolla eprüve etmişlerdir. Eprüvasyondan 21 gün sonra yaptıkları bakteriyolojik muayenede; aşılı grubun organ kültüründe, % 12,5 kültür pozitiflik tespit ederken, aşısız grubun %28 kültür pozitiflik tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Gantois ve ark (2006), TAD Salmonella vac E (*S.* Enteritidis) ve TAD Salmonella vac T (*S.* Typhimurium) metobolik drift mutantlardan elde edilen ticari 2 canlı aşının yumurtacı tavuklarda etkinliğini araştırmışlardır. Kimyasal mutagenezle elde edilen bu aşı suşları streptomisin ve rifampisin-nalidiksik asit ve rifampisine dirençlidir. 2 ayrı grubu (n=30), 6 ve 16 haftalık yaşlarda 10^8 cfu/0,5 ml dozunda oral yolla iki kez, bir grubu TAD Salmonella vac E ile aşılarken, diğer grubu TAD Salmonella vac T ile aşılamışlardır. Son aşılamadan 2 hafta sonra, 18 haftalık yaşta her 2 gruptan kan alarak, kan serumlarından LPS ELISA ile antikor titrelerine bakmışlardır. 2 grubu da, 24 haftalık yaşta $5x10^7$ cfu *S.* Enteritidis suşu ile İV yolla eprüve etmişlerdir. Serolojik analizlerde; Salmonella vac E ile aşılanan grupta düşük düzeyde antikor titresi tespit ettiklerini, %33'nün antikor negatif olduğunu, Salmonella vac T ile aşılanan grubun %50'nin antikor negatif olduğunu ve antikor titrelerinin hetorojen bir dağılım gösterdiğini bildirmişlerdir. Eprüvasyondan 1-3 hafta sonra organlardan reizolasyon çalışmalarında; Salmonella vac E ile aşılanan grupta eprüvasyon suşunun izolasyon oranları; karaciğer %4, dalak %42, ovaryum

%57 olarak tespit ederken, Salmonella vac T ile aşılanan grupta izolasyon oranlarını, karaciğer %20, dalak %50, ovaryum %57 olarak tespit ederken, kontrol grubu da dahil 3 grupta da sekumdan Salmonella izole edilmediğini bildirmişlerdir. Kontrol grubunda eprüvasyon suşunun izolasyon oranları; karaciğer %7, dalak ve ovaryum %80 olarak tespit etmişlerdir. Organların kantitatif bakteriyolojik muayenelerinde, organlarda bakteri sayısını (cfu) tespit etmek amacı ile direkt ekim yapmışlar, direkt ekimde negatif bulduklarını ön zenginleştirme ekimleri ile tekrar muayene etmişlerdir. Organlardan direkt ekim çalışmalarında, dalak ve karaciğerden hiç izolasyon yapılamazken, ovaryumlardan ön zenginleştirme sonrası yapılan izolasyonun yarısı kadar izolasyon gerçekleştirebilmişlerdir. Bu aşılama programı ile, gelişen antikor cevapla eprüvasyon suşunun organlardan reizolasyon oranlarının paralellik göstermediğini, eprüvasyon suşunun organlardan temizlenmesinde humoral cevaptan çok hücresel cevabın önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Cooper ve ark (1992), 1 günlük yaşta civcivleri, 2 farklı *S.* Enteritidis Aro mutantı ile, oral yolla 10^9 cfu tek doz veya 10^5 cfu 21 güne kadar haftalık (1, 7, 14, 21 günlük yaşlarda) tekrarlanan dozlarda aşılamışlar ve 8 haftalık yaşta oral yolla 10^9 cfu *S.* Enteritidis suşu ile eprüve etmişlerdir. Eprüvasyon öncesi ve sonrasında alınan serumları LPS ELISA ile test etmişlerdir. Kontrol grubunun eprüvasyon sonrası, 9 ve 11. haftalarda IgG titresinin belirgin oranda yükseldiğini, 13. haftada tekrar düştüğünü bidirmişlerdir. Aşılanmış gruplarda da eprüvasyon öncesi antikor titresinin düşük olduğunu, 10^9 cfu dozunda aşılananların bazılarında antikor tespit edilebilirken, 10^5 cfu dozunda 4 kez aşılananlarda ise eprüvasyon öncesi IgG düzeyinin aşılanmamış kontrol grubu ile aynı olduğunu, antikor tespit edilemediğini veya çok az bulunduğunu bildirmişlerdir. Oral eprüvasyonun, kontrol grubundaki çoğu tavukta, hızlı gelişen antikor cevaba yol açtığını ve 3-5 hafta persiste olduğunu; aksine, aşılı gruplarda, özellikle çoklu doz uygulananlarda antikor cevabın çok düşük bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu durumu; enfeksiyon sonrası yüksek düzeyde sirküle antikor üretimi için, etkenin bağırsak yüzeyinden ziyade organlarda yayılması ve kayda değer sayıda çoğalması gerektiğini, kullandıkları aşı suşlarının saha suşları kadar yüksek düzeyde organlarda çoğalamayacağı şeklinde açıklamışlardır. Aşılanmış gruplarda eprüvasyon sonrası antikor düzeyinin düşük kalmasını; aroA mutant suşların, eprüvasyon suşunun invazyonunu ve yüksek

düzeyde organlarda çoğalmasını engellemesi nedeni ile olabileceğini ve bu durumun aşılamalarda arzu edilen bir sonuç olduğunu bildirmişlerdir.

Cooper ve ark (1992), AroA mutantlarla aşılamayı takiben serokonversiyon (antikor oluşması) oranının düşük düzeyde olmasının, Salmonella enfeksiyonu için antikor tespitinin sürülerde tarama yöntemi olarak kullanıldığı düşünüldüğünde, büyük bir avantaj olabileceğini bildirmişlerdir. Aşılama sonrası gelişen antikor düzeyinin, aşı suşu R (rough) karakterde değil, tamamen S (smooth) karakterde olsa bile ve saha suşunda bulunan bütün antijenlere de sahip olsa da, saha suşu ile enfeksiyon sonrası gelişen antikor düzeyinden daima düşük olacağını, Barrow ve arkadaşlarının (1991), R (rough) suş olan *S*. Enteritidis aroA mutantının yetişkin tavuklarda bağırsaklarda iyi koruma sağlamadığını gösterdikleri çalışmalarından da anlaşılacağı gibi; LPS O spesifik antijeninin, kolonizasyonda esansiyel ve Salmonella enfeksiyonları için bağışıklıkta önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Babu ve ark (2004), *S*. Enteritidis'in organlardan temizlenmesinde ölü ve canlı aşıların etkinliğini karşılaştırdıkları çalışmalarında; 2 haftalık ve 4 haftalık yaşta iki kez aşıladıkları tavukları, 6 haftalık yaşta *S*. Enteritidis suşu ile eprüve edip, eprüvasyondan 1 hafta sonra immünolojik analiz ve bakteriyolojik muayene yapmışlardır. Canlı aşının ölü aşıya göre çok büyük oranda fekal saçılımı azalttığını ve sağladığı hücresel cevabın etkisi ile eprüvasyon suşunun temizlenmesinde ölü aşıya göre çok daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ölü aşı ile aşılılarda, flagella ve hücre zarı antikor ELISA ile yüksek düzeyde antikor titresi tespit ederken, canlı aşı ile aşılananlarda kontrol grubuna yakın antikor titresi tespit ettiklerini, *S*. Enteritidis enfeksiyonlarına karşı antikor cevabın bir koruyuculuk sağlamadığını, gelişen hücresel cevabın etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Betancor ve ark (2005), Uruguay'da, baskın genetik tip olarak tespit ettikleri lokal *S*. Enteritidis suşundan, derive ettikleri aroC mutantının aşı olarak etkinliğini değerlendirmişlerdir. "Fare modeli" ile attenüasyon ve immünojenitesini tespit ettikleri suşla, ticari yumurtacıları 2 grup halinde oral yolla 1 günlük yaşta bir kez veya 1-15 günlük yaşta iki kez aşılamışlardır. Ayrı bir grupta aşı suşunun hem oral hemde İV yolla uygulamalarında, organlarda aynı düzeyde persiste olduklarını ve 16. günden sonra organlardan, zenginleştirme besiyerlerinde izolasyon çalışmalarında bile izole edemediklerini bildirmişlerdir. Tavukları 30 günlük yaşta *S*. Enteritidis

suşu ile 10^9 cfu oral yolla eprüve etmişlerdir. Eprüvasyondan 10 gün sonra tek doz aşılananların reizolasyon çalışmalarında; karaciğer ve dalaktan %25 oranında eprüvasyon suşu izole edilirken, 2 doz aşılı hiç bir tavuğun karaciğer ve dalağından izolasyon yapılmamıştır. Kontrol grubundaki bütün tavukların karaciğer ve dalaklarından eprüvasyon suşu izole edilmiştir. Fekal saçılım yönünden yapılan değerlendirmede; 2 doz aşılamanın tek doz aşılamaya göre fekal saçılımı daha yüksek oranda azalttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada aşıların fekal saçılımı üzerine etkisi izlenmediği için karşılaştırılma yapılamamıştır.

Bu çalışmada 7 aşı grubu kullanılmış; 4 grup 4 farklı aşı suşu (SÜVF33, SÜVF34, SÜVF35, SÜVF88) ile oral yolla yalnızca bir kez, 3 grup ise 3 farklı aşı suşu (SÜVF33, SÜVF35, SÜVF88) ile kas içi- oral yolla iki kez aşılandı. 2 grup (kontrol 1, kontrol 2) kontrol grubu olarak aşılama yapılmaksızın, AVKESE1 suşu ile eprüve edildi.

Organların mikrobiyolojik muayeneleri, ön zenginleştirme kültür çalışmaları ile kalitatif olarak gerçekleştirilmiştir. Aşıların etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda, mikrobiyolojik muayeneler (çeşitli iç organlardan, kloakal sıvaplardan, sekal içerikden) çoğunlukla kantitatif olarak yapılırken (Cooper ve ark 1992, Hassan ve ark 1994, Cerquetti ve ark 2000, Betancor ve ark 2005), bazı çalışmalarda da kalitatif yöntem (Barrow ve ark 1991, Hassan ve ark 1997, Gantois ve ark 2006) kullanılmıştır. Salmonella aşı etkinliği değerlendirme çalışmalarında kalitatif ve kantitatif kültür yöntemlerinin birlikte yapılmasının daha iyi bir değerlendirme sağlayacağı kanaatine varılmıştır.

Son aşılamadan 3 hafta, eprüvasyondan 1 hafta sonra, 3 hafta boyunca iç organların kültüründe SÜVF 34 dışında, aşı suşları organlardan izole edilememiştir. Aşı suşlarının uzun süre organlarda persiste olmadığı görülmüştür. Cooper ve ark (1992), aşı suşlarının 20 güne kadar organlarda persiste olduğunu tespit ederken, Betancor ve ark (2005) bu sürenin aşı suşları için 16 gün olduğunu tespit etmişler ve bu durumun kullandıkları aşı suşlarının etkinliğine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. 9R suşu ile yapılan Salmonella aşı çalışmaları dışında, hiç bir çalışmada aşı suşlarının eprüvasyon sonrası izole edildiğiyle ilgili bir bildirim olmamıştır (Barrow ve ark 1991, Cooper ve ark 1992, Cerquetti ve ark 2000, Babu ve ark 2004, Betancor ve ark 2005, Gantois ve ark 2006)

Bir (1) kez aşılı gruplarda; SÜVF33 no'lu suş ile aşılanan grupta; karaciğer %42, dalak %33, ovaryum %17, sekum %25 oranlarında, SÜVF34 no'lu suş ile aşılanan grupta; karaciğer %27, dalak %36, ovaryum %0, sekum %18, SÜVF35 no'lu suş ile aşılanan grupta; karaciğer, dalak ve sekum %17, ovaryum %0, SÜVF 88 no'lu suş ile aşılanan grupta; karaciğer, dalak ve sekum %25 ovaryum %0 oranlarında eprüvasyon suşu izole edilirken, kontrol grubunda; karaciğer %42, dalak ve sekum %33, ovaryum %9 oranlarında eprüvasyon suşu izole edilmiştir. Tüm organlardan toplamda eprüvasyon suşunun izolasyon oranı, kontrol grubunda %29, SÜVF33 grubunda %29, SÜVF34 grubunda %20, SÜVF35 grubunda %12,5, SÜVF88 grubunda %19 olarak tespit edilmiştir. SÜVF35 no'lu suş önemli oranda eprüvasyon suşunun invazyonuna karşı koruma sağlamıştır.

İki (2) kez aşılı gruplarda; SÜVF33 no'lu suş ile aşılanan grupta; karaciğer % 42, dalak %25, ovaryum %9, sekum %33 oranlarında, SÜVF35 no'lu suş ile aşılanan grupta karaciğer ve dalak %17, ovaryum %0, sekum %42, SÜVF88 no'lu suş ile aşılanan grupta karaciğer ve dalak %33, ovaryum ve sekum %25 oranlarında eprüvasyon suşu izole edilirken, kontrol grubunda karaciğer, dalak ve sekum %42, yumurtalık %17 oranlarında eprüvasyon suşu izole edilmiştir. Tüm organlardan toplamda eprüvasyon suşunun izolasyon oranı, kontrol grubunda %35, SÜVF33 grubunda %27, SÜVF35 grubunda %19, SÜVF88 grubunda %29 olarak tespit edilmiştir. Her iki aşılama programında da; SÜVF35 no'lu suş eprüvasyon suşunun invazyonuna karşı önemli oranda koruma sağlarken, SÜVF33, SÜVF34, SÜVF88 no'lu aşı suşlarının aynı derecede başarı göstermediği, eprüvasyon suşunun izolasyon oranlarında çok önemli oranda azalma sağlamadıkları görülmüştür. Bu farklılık, aşı suşlarının immun cevabı uyaracak kadar yeterli miktarda organlarda çoğalmamasından kaynaklanabilir.

Barrow ve ark (1991), Gantois ve ark (2006), Woodward ve ark (2006) yaptığı çalışmalarla karşılaştırıldığında; organlardan eprüvasyon suşunun izolasyon oranları açısından, SÜVF35 no'lu suş benzer oranlarda izolasyonlarda azalmayı sağlarken, Hasan ve ark (1997) çalışmalarına göre koruma oranı oldukça düşük bulunmuştur. Bunun nedenleri, SÜVF35 no'lu suşun aşı suşu olarak etkinliği, aşılama yaşlarının farklılığı, eprüvasyon suşlarının farklılığı olabilir. Yalnızca

kalitatif kültür yöntemi ile bakteriyolojik muayeneler yapıldığından, kantitatif kültür yöntemleri uygulanan çalışmalarla karşılaştırma yapılamamıştır.

17 haftalık yaşta bir kez SÜVF33, SÜVF34, SÜVF35 ve SÜVF88 no'lu suşlarla oral yolla aşılanan gruplarda anti-LPS antikor titrelerinin oldukça düşük ve çoğunlukla negatif olduğu görüldü. SÜVF33, SÜVF34 ve SÜVF88 no'lu suşlarla aşılanan gruplarda seropozitiflik tespit edilmezken, SÜVF35 no'lu suş ile aşılanan grupda sadece 1 adet seropozitiflik tespit edilmiştir.

17 haftalık ve 21 haftalık yaşta kas içi ve oral yolla, iki kez aşılanan gruplarda; kas içi olarak uygulanan 1. aşılama sonucunda 3. haftada; SÜVF33 no'lu suşla aşılanan grupda 12 tavukda seropozitiflik görülmezken, SÜVF88 no'lu suşla aşılanan grupda, 12 tavukdan 2'si seropozitif, SÜVF35 no'lu suşla aşılanan grupda 12 tavukdan 11'i seropozitif bulunmuştur. Oral yolla uygulanan 2. aşılama sonucunda antikor titrelerinde artış gözlenmiştir. SÜVF33 no'lu suş ile aşılılarda 12 tavukdan 7'sinde seropozitiflik tespit edilirken, SÜVF35 no'lu suş ile aşılılarda 12 adet tavuğun hepsi seropozitif bulundu. SÜVF88 no'lu suş aşılamasında 12 tavukdan 6'sında önceki 2 gruba göre daha düşük düzeyde antikor titresi belirlendi. Cooper ve ark (1992)'nın AroA mutantlarla aşılamayı takiben serokonversiyon (antikor oluşması) oranının düşük düzeyde buldukları çalışmaları ile uyumlu bulunmuştur. Canlı *Salmonella* Enteritidis aşılarının etkinliğinin değerlendirildiği birçok çalışmada; eprüvasyon suşunun organlarda kolonizasyonu ve fekal saçılımı üzerine aşıların koruyuculuğu araştırılırken, serolojik yönden değerlendirme yapılmamıştır (Barrow ve ark 1991, Cerquetti ve ark 2000a, 2000b, Woodward ve ark 2002, Methner ve ark 2004). Bazı araştırmacılar Salmonella enfeksiyonlarına karşı korumada humoral cevabın bir kriter olmadığını esas korumayı hücresel cevabın sağladığını savunurken (Cooper ve ark 1992, Babu ve ark 2004, Gantois ve ark 2006) bazı araştırmacılarda her iki cevabında önemli kriterler olduğunu bildirmişlerdir (Kaiser ve ark 2002, Betancor ve ark 2005).

Cooper ve ark (1994), *aro*A *S.* Enteritidis CVL30 suşu ile kuluçkadan yeni çıkmış civcivleri (n=21) 2 grup halinde 10^9 cfu oral yolla aşılanmışlardır. Bir gruba 16 haftalık yaşta 10^9 cfu kas içi yolla 2. aşılama yapılırken, diğer grup 2. kez aşılanmamıştır. Grupların ikiside 10^7 cfu Nal^R *S.* Enteritidis suşu ile 23. haftada İV yolla eprüve edilmiştir. Eprüvasyondan 7 gün sonra kantitatif kültür yöntemiyle

yapılan reizolasyon çalışmalarında, 1 ve 2 kez aşılamanın dalak, karaciğer ve sekumda kolonizasyonu benzer oranlarda ve önemli düzeyde azalttığını, 2 doz aşılı gruplarda kas içi uygulanan 2. aşılamanın ovaryumlarda korumayı bir kez aşılılara göre daha da arttırmış olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, bir ve iki kez aşılı gruplar arasında karaciğer ve dalak reizolasyon oranlarında büyük farklılıklar olmazken, iki kez aşılılarda sekum ve ovaryum reizolasyon oranlarında artış olduğu görülmüştür. İki kez aşılılarda antikor titrelerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çoğu araştırmacı 2 kez, oral-oral veya oral-kas içi aşılamayı önermektedir (Babu ve ark 2004, Betancor ve ark 2005, Gantois ve ark 2006). Deneme hayvanı sayısının az olması, bir tavuğun bile reizolasyon sonucunun yüzdeyi büyük oranda etkilemesi, iki kez aşılılarda sekum ve ovaryum reizolasyon oranlarını yükseltmiş olabilir.

S. Enteritidis SÜVF35 aşı suşu diğer aşı suşlarına göre daha yüksek düzeyde, fakat homojen olmayan antikor cevabın gelişmesini sağlamış ve organlarda bakteri invazyonunu en çok engelleyen suş olarak belirlenmiştir. İki doz aşılamanın antikor titresini yükselttiği, Kaiser ve ark (2002), Betancor ve ark (2005)'nın çalışmalarında olduğu gibi, bu çalışmada da antikor cevapla aşının koruyuculuğu arasında korelasyon olduğu kanısına varılmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile; kanatlılarda enfeksiyonlara, dolayısı ile ekonomik kayıplara yol açan, zoonoz salmonellozis etkenlerine karşı, 4 farklı Salmonella izolatının (1 adet S. Pullorum ve 3 adet S. Enteritidis) aşı suşu olarak etkinlikleri değerlendirildi.

1. Canlı aşı suşu olarak etkinlikleri incelenen 4 farklı Salmonella suşu arasında, SÜVF35 no'lu aşı suşunun, *Salmonella* Enteritidis etkeninin doku invazyonunu önemli oranda azalttığı tespit edildi. Ayrıca, SÜVF35 no'lu aşı suşunun diğer aşı suşlarına göre antikor cevabı daha iyi uyardığı tespit edildi. Canlı Salmonella aşılarının koruyuculuğunda, humoral cevabın öneminin olmadığı asıl olanın hücresel cevap olduğu yönünde görüşler olmakla birlikte, bu çalışmada antikor cevabı uyaran suşun aynı zamanda doku invazyonunu en fazla azaltan suş olduğu görüldü. Hem hücresel hemde humoral cevabı uyarabilen suşların aşı suşu olarak kullanılması ve canlı Salmonella aşı koruyuculuğunun değerlendirildiği çalışmalarda bakteriyolojik muayeneler yanında serolojik muayenelerinde yapılması önerilmektedir.

2. Canlı Salmonella etkinliğinin araştırıldığı çalışmaların çoğunda en az 2 doz aşılama uygulanmıştır. 2 doz aşılamalarda genellikle oral-oral yolla aşılama yapılırken, oral-kas içi, oral-periton içi, periton içi-oral aşılama yöntemleri de kullanılmıştır. 1 kez oral yolla aşılı gruplar ile 2 kez kas içi- oral yolla aşılı gruplarda doku invazyonunun azalma oranlarında çok az farklılık görülürken, 2 kez aşılılarda antikor cevapta artış olduğu görüldü. Aşılamalar sonrası alınan kan örneklerinde, serum antikor titrelerinin heterojen bir dağılım gösterdiği görüldü. Canlı aşı çalışmalarında en az 2 doz aşılama önerilmekte ve farklı aşılama yöntemleri ile aşı suşunun koruyuculuğu araştırılmalıdır.

3. Canlı Salmonella aşılarının eprüvasyonlara karşı koruyuculuğunu tespit etmek amacıyla yapılan bakteriyolojik muayenelerde hem kalitatif hem de kantitatif kültür yöntemlerinin birlikte kullanılması, daha iyi bir değerlendirme sağlayacağından, çalışmaların bu şekilde gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

4. RAPD PZR yöntemi; uygun primerler uygun konsantrasyonlarda kullanıldığında, DNA miktarı sabitlendiğinde, amplifikasyon ve saptama basamakları

her zaman aynı koşullar altında yapıldığında hızlı, tekrarlanabilir ve ayrım gücü yüksek bir yöntem olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak; canlı aşı suşu olarak en etkin suş olarak değerlendirilen SÜVF35 no'lu suşun farklı serotiplere özellikle *S*. Gallinarum eprüvasyonlarına karşı koruyuculuğu, eprüvasyon sonrası fekal saçılıma etkisi, yumurta kontaminasyonları üzerine etkisi, farklı yaş gruplarında (daha küçük yaşlarda) etkinliği, farklı eprüvasyon yöntemlerine karşı etkinliği, aşılama ve eprüvasyon aralıklarının daha uzun tutulduğu ve denemenin uzun tutulduğu, deneme hayvanı sayısının mümkün olduğunca arttırıldığı ve canlı aşı olarak etkinliği kadar canlı aşı suşu olarak güvenliğinin değerlendirildiği daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tavuklar İçin Canlı Salmonellozis Aşısı Geliştirilmesi Üzerine Çalışmalar

Suzan Reyhan KARAKOÇ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2014

Bu çalışmada, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonundan alınan, 20 yıldır sürekli pasajlanmış, 1 adet *S.* Pullorum SÜVF33, ve 3 adet *S.* Enteritidis SÜVF34, SÜVF35, SÜVF88 saha suşlarının, canlı aşı olarak immunojenik etkinlikleri ve *S.* Enteritidis AVKESE1 saha suşu ile eprüvasyona karşı koruyuculuları değerlendirildi. Bu çalışmada kullanılan tüm suşların antibiyotik duyarlılıkları tespit edildi.

Kahverengi yumurtacı tavuklar her grupta12 tavuk olacak şekilde 9 gruba ayrıldı. Dört grup bir kez, üç grup iki kez aşılandı. İki grup kontrol grubu olarak tutuldu. Dört grup; SÜVF33, SÜVF34, SÜVF35 ve SÜVF88 suşları ile oral yolla 17 haftalık yaşta bir kez aşılandı. Bu gruplar ve kontrol grubu, oral yolla 21 haftalık yaşta eprüve edildi. Üç grup; SÜVF33, SÜVF35, SÜVF88 suşları ile kas içi ve oral yolla 17 ve 21 haftalık yaşlarda iki kez aşılandı. Bu gruplar ve kontrol grubu oral yolla 25 haftalık yaşta eprüve edildi. Her aşılamadan 21 gün sonra kan alınarak, ELISA ile antikor seviyelerine bakıldı. Eprüvasyonlardan sonra 3 hafta içinde, organlardan ekimler yapıldı. Organ ekimlerinden elde edilen ve VITEK 2 compact cihazıyla identifiye edilen *Salmonella* spp. izolatlarının RAPD PZR ile ayrımı sağlandı.

SÜVF34 ve SÜVF88 suşları gentamisin, sulfametoksazol/trimetoprim, streptomisin, tetrasiklin ve eritromisin'e, SÜVF33, SÜVF35 aşı suşları ve AVKESE1 eprüvasyon suşu yalnızca eritromisine dirençli bulundu.

Bir kez aşılanan gruplarda antikor titrelerinin oldukça düşük düzeyde olduğu görüldü. İki kez aşılanan gruplarda; ikinci aşılamadan sonra titrelerde yükselme gözlendi.

Bir kez aşılı gruplarda; tüm organlardan eprüvasyon suşunun izolasyon oranı, kontrol grubunda % 29, SÜVF33 grubunda %29, SÜVF34 grubunda %20, SÜVF35 grubunda %12,5, SÜVF88 grubunda %19 olarak tespit edildi. İki kez aşılı gruplarda; tüm organlardan eprüvasyon suşunun izolasyon oranı, kontrol grubunda % 35, SÜVF33 grubunda % 27, SÜVF35 grubunda %19, SÜVF88 grubunda %29 olarak tespit edildi.

Bir ve iki kez aşılanan gruplarda; SÜVF35 suşu önemli oranda eprüvasyon suşunun invazyonuna karşı koruma sağlarken, diğer aşı suşlarının ise aynı derecede başarı göstermediği ve koruma oranlarının düşük olduğu görüldü.

Anahtar Sözcükler: Canlı aşı; *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Pullorum; yumurtacı tavuk

7. SUMMARY

Studies on Live Vaccine Development Aganist Chicken Salmonellosis

This study investigated one *S.* Pullorum SUVF33 and three *S.* Enteritidis SUVF34, SUVF35, SUVF88 field strains continuously passaged for 20 years, which were obtained from Selcuk University Faculty of Veterinary Medicine Department of Microbiology Culture Collection in terms of immunological effectiveness as live vaccines, and protectiveness against challenge with *S.*Enteritidis AVKESE1 field strain. Antibiotic susceptibility of all strains used in this study has been analyzed.

The brown layer chickens were divided 9 groups and each group consisted of 12 chickens. Four groups were vaccinated one time and three groups were vaccinated two times. The rest were kept as controls. In the single vaccinated four groups SUVF33, SUVF34, SUVF35 and SUVF88 strains were orally administered to chickens aged 17 weeks. This four groups and the control group were challenged at the age of 21 weeks. In the twice vaccinated three groups SUVF33, SUVF35 and SUVF88 strains were given both intramuscularly and orally when the chickens were 17 and 21 weeks old. The twice vaccinated groups and the control group were challenged at the age of 25 weeks. A blood sample was taken 21 days after each vaccination and antibody levels were studied with ELISA. Organs were examined bacteriologically for 3 weeks after challenge. *Salmonella* spp isolates that were obtained from organ inoculations and identified with VITEK 2 compact device were separated with RAPD PCR.

SUVF34 and SUVF88 strains were resistant to gentamicin, sulfamethoxazole/trimethoprim, streptomycin, tetracycline and eryhtromycin. We also determined that vaccine strains of SUVF33, SUVF35 and challenge strain of AVKESE1 were resistant to only erythromycin**.**

It was observed that the antibody titers were quite low in the single vaccinated groups. Among the twice vaccinated groups; the number of seropositivity increased and the titers rose in all groups after second vaccination.

In the single vaccinated group the isolation rate of the challenge strain from all organs was 29% in the control group, 29% in the SUVF33 group, 20% in the SUVF34, 12,5% in the SUVF35 group, and 19% in the SUVF88 group, respectively. In the twice vaccinated group the isolation rate of the challenge strain from all organs was 35% in the control group, 27% in the SUVF33 group, 19% in the SUVF35 group, and 29% in the SUVF88 group.

In the single and the twice vaccinated groups SUVF35 strain provided significant protection against invasion by the challenge strain; however other vaccine strains did not provide a protection of similar magnitude and little reduction was observed in isolation rates of the challenge strain.

Key words: Layer chicken; live vaccine; *Salmonella.* Enteritidis, *Salmonella* Pullorum.

8. KAYNAKLAR

1. Altay G. Tavuklarda *Salmonella enteritidis* antikorlarının serum ve yumurta sarısında ELISA ile saptanması. Turk J Vet Anim Sci. 2001; 25: 983-8.

2. Aras Z. Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri. Turk Hij Den Biyol Derg. 2011; 68 (2): 97 -104.

3. Arda M, Akyol İ, Kahraman M. *Salmonella gallinarum* enfeksiyonlarına karşı döllü tavuk yumurtalarında aktif ve inaktif aşı hazırlanması üzerine çalışmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1969; 17: 200-13.

4. Arda M, Akay Ö, İzgür M, Aydın N. Tavuk tifosuna karşı etkin bir aşı hazırlanması üzerine çalışmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1983; 30(3): 420-9.

5.Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M. Bakteriyel hastalıklar. In: Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, editörs. Kanatlı Hayvan Hastalıkları. 1.baskı. Ankara: Medisan Yayınları; 1990. p. 73-80.

6. Arda M. Salmonella Enfeksiyonları. Hindi Hastalıkları. 1. baskı, Ankara, BESD-BİR. 2006; 110-8.

7. Arda M. Vaksinoloji. Temel mikrobiyoloji. 4. Baskı. Ankara, Medisan Yayınevi. 2011a; 459-89.

8. Arda M. Biyoteknoloji. Temel mikrobiyoloji. 4. Baskı. Ankara, Medisan Yayınevi. 2011b; 491-529.

9. Babu U, Dalloul RA, Okamura M, Lillehoj HS, Xie H, Raybourne RB, Gaines D, Heckert RA. *Salmonella enteritidis* clearance and immune responses in chickens following Salmonella vaccination and challenge. Vet Immunol Immunopathol. 2004;101(3-4): 251-7.

10. Barrow PA, Lowell M, Berchieri A. Immunization of laying hens against *Salmonella enteritidis* with live attenüated vaccines. Vet Rec. 1990; 126: 241-2.

11. Barrow PA, Lowell M, Berchieri A. The use of two live attenuated vaccines to immünize egg-laying hens against *Salmonella enteritidis* phage type 4. Avian Pathology. 1991; 20: 681-2.

12. Barrow PA. ELISAs and Serological analysis of *Salmonella* infections in poultry. Epidemiol Infect. 1992; 109: 361-9.

13. Barrow PA. Serological diagnosis of Salmonella by ELISA and other tests. In: Wray C, Wray A, editors. Salmonella in domestic animals. 1st ed. New York: CABI; 2000. p. 407-28.

14. Barrow PA. Salmonella infections and vaccines. Veteriner Tavukculuk Derneği 2005; [cited 01.01.2012]. Available from URL: http://veterinertavukculuk.org/uploadimg/dosyalar/ 2005_istanbul/keynotes/barrow.pdf

15. Barrow PA. Salmonella infections immune and non-immune protection with vaccines. Avian Pathology. 2007; 36(1): 1-13.

16. Barrow PA, Freitas NOC. Pullorum disease and fowl typhoid new thoughts on old diseases. Avian Pathology. 2011; 40(1): 1-13.

17. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966; 45(4): 493-6.

18. Bekar M, Ayaz Y, Akman A, Yazıcıoğlu N, Uysal Y, Tekin C, Korkut N, Mirioğlu M, Aslan A, Ergun A, İldeş Z. Tavuk mezbahalarının Salmonella yönünden taranması. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi. 1993; 7(4): 1-23.

19. Bekar M. *Enterobacteriaceae* Familyası Mikroorganizmalarının Genel Karakterleri ve Tanı Yöntemleri. 2. baskı. Ankara, Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları, 2003; 50-140.

20. Betancor L, Schelotto F, Martinez A, Pereira A, Algorta G, Rodríguez GM, Vignoli R, Chabalgoity JA. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis Of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis ısolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. J Clin Microbiol. 2004; 107: 1155–62.

21. Betancor L, Schelotto F, Fernandez M, Pereira M, Rial A, Chabalgoity JA. An attenuated Salmonella Enteritidis strain derivative of the main genotype circulating in Uruguay is an effective vaccine for chickens. Veterinary Microbiology. 2005; 107: 81–9

22. Bouzoubaa K, Nagaraja KV, Newman JA, Pomeroy BS. Use of membrane proteins from *Salmonella gallinarum* for prevention of fowl typhoid infection in chickens. Avian Dis. 1987; 31: 699-704.

23. Bouzouba K, Nagaraja KV, Kabbaj FZ, Newman JA, Pomeroy BS. Feasibility of using proteins from *Salmonella gallinarum* 9R live vaccine for the prevention of fowl typhoid in chickens. Avian Dis. 1989; 33: 385-91.

24. Brenner DJ. Family I. *Enterobacteriaceae* Rahn 1937, Nom. fam. cons. Opin. 15, Jud. Comm. 1958, 73; Ewing, Farmer, and Brenner 1980, 674; Judicial Commission 1981, 104. In: KRIEG NR, HOLT JG, editors. Bergey's manual of systematic bacteriology, 1st ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co; 1984. p. 408-20.

25. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. Salmonella nomenclature. J Clin Microbiol. 2000; 38: 2465-7.

26. Cerquetti MC, Gherardi MM. Orally administered attenuated *Salmonella enteritidis* reduces chicken cecal carriage of virulent *Salmonella* challenge organisms. Vet Microbiol. 2000; 76(2): 185–92.

27. Cerquetti MC, Gherardi MM. Vaccination of chickens with a temperature-sensitive mutant of *Salmonella enteritidis*. Vaccine. 2000; 18(11-12): 1140-5.

28. Charles SD, Nagarja KV, Sivanandan V. Alipid congugated immunostimulating complex subunit vaccine against *Salmonella* infection in turkeys. Avian Dis. 1993; 37: 477-84.

29. Chart H, Baskervılle A, Humphrey TJ, Rowe B. Serological responses of chickens experimentally infected with Salmonella enteritidis PT4 by different routes Epidemiol. Infect. 1992; 109: 297-302

30. CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty- second Informational Supplement. Wayne, 2012; M100S22 Vol 32 No 13.

31. Clifton-Hadley F.A, Breslin M, Venables LM, Sprigings KA, Cooles SW, Houghton S, Woodward MJ. A laboratory study of an inactivated bivalent iron restricted *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium dual vaccine against Typhimurium challenge in chickens. Vet Microbiol. 2002; 89: 167-79.

32. Collins FM. Vaccines and cell-mediated immunity. Bacteriological Reviews. 1974; 38: 371-4.

33. Cooper GL, Nicholas RA, Cullen GA, Hormaeche CE. Vaccination of chickens with a *Salmonella enteritidis* aroA live oral *Salmonella* vaccine. Microb Pathog. 1990; 9: 255–65.

34. Cooper GL, Venables LM, Nicholas RA, Cullen GA, Hormaeche CE. Vaccination of chickens with chicken-derived *Salmonella enteritidis* phage type 4 aroA live oral *Salmonella* vaccines. Vaccine. 1992; 10: 247-54.

35. Cooper GL, Venables LM, Woodward MJ, Hormaeche CE. Vaccination of chickens with strain CVL30, a genetically defined *Salmonella enteritidis* aroA live oral vaccine candidate. Infect Immun. 1994; 62: 4747-54.

36. Curtis III R, Kelly SM, Hassan O. Live oral avirülent *Salmonella* vaccines. Vet Microbiol. 1993; 37; 397-405.

37. Çarlı KT. Bursa bölgesinde yumurta ve broyler tipi tavuklardan izole edilen *Salmonella* türleri üzerinde bakteriyolojik ve serolojik çalışmalar. Doğa-Tr J Vet Anim. Sci. 1990; 14: 428-38.

38. Davies R, Breslin M. Effects of vaccination and other preventive methods for *Salmonella enteritidis* on commercial laying chicken farms. Vet Rec. 2003; 153: 673-7.

39. Davison S, Benson CE, Henzler DJ, Eckroade RJ. Field observations with *Salmonella enteritidis* bacterins. Avian Dis. 1999; 43: 664 -9.

40. Diker KS. İmmunoloji. 2. Baskı, Ankara, Medisan Yayın Serisi, 2005; 20- 122.

41. Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Kurs Kitapçığı. İstanbul, Roche Diag. Print Center. 2001; 139-149.

42. EFSA (European Food Safety Authority) Journal. The use of vaccines fort the control of Salmonella in poultry. 2004; [cited 1.1.2012] Available from URL: http://www.efsa.eu.int.

43. Eisenstein TK. Evidence for O antigens as the antigenic determinants in ribosomal vaccines prepared from Salmonella. Infect Immun. 1975; 12 (2): 364-7.

44. Erdem B, Tekeli A, Şahin F, Koyuncu E, Bayramova M, Karasartova D. Türkiye' de İzole edilen *Salmonella enterica* serotip typhimurium suşlarının plazmit profilleri ve RAPD analizi. İnfeksiyon Dergisi. 2007; 21 (3): 105-15.

45. Erganiş O, İstanbulluoğlu E. İmmunoloji. 2. Baskı, Konya, SÜ Vet. Fak. Yayın Ünitesi, 2002; 15-67.

46. Gantois I, Ducatelle R, Timbermont L, Boyen F, Bohez L, Haesebrouck F, Pasmans F, Immerseel FV. Oral immunisation of laying hens with the live vaccine strains of TAD *Salmonella* vac® E and TAD *Salmonella* vac® T reduces internal egg contamination with *Salmonella enteritidis*. Vaccine. 2006; 24: 6250-5.

47. Gast RK, Beard CW. Isolation of *Salmonella enteritidis* from internal organs of experimentally infected hens. Avian Dis. 1990; 34: 991-3.

48. Gast RK, Stone HD, Holt PS, Beard CW. Evaluation of the efficacy of an oil-emulsion bacterin for protecting chickens against *Salmonella enteritidis*. Avian Dis. 1992; 36: 992-9.

49. Gast RK. Salmonella infections: paratyphoid infections In: Saif YM, editors. Diseases of poultry, 11th ed. Ames: Iowa State University Press; 2003. p. 583-613.

50. Gast RK. Serotype-Specific and Serotype-Independent Strategies for Preharvest Control of Food-Borne Salmonella in Poultry. Avian Dis. 2007; 51:817-28.

51. GKGM (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü). "Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği Uygulama Talimatı". 30.11.2007/43.

52. Grimont PAD, Grimont F, Bouvet P. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: Wray C, Wray A, editors. Salmonella in domestic animals. 1st ed. New York: CABI; 2000. p. 1-18.

53. Gorham SL, Kadavil K, Lampert H, Vaughan E, PERT B, ABEL J. Persistence of *Salmonella enteritidis* in young chickens. Avian Pathology. 1991; 20: 433-7.

54. Gökçen S, Erganiş O. İzmir Mezbahalarında Kesilen Hayvanlardan *Salmonella* izolasyonu ve Serotiplendirilmesi. Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi. 1996; 21 (35): 91-111.

55. Gülyaz V, Taştan R. Erzurum ve Erzincan illerinde kanatlı mezbahalarının *Salmonella* yönünden taranması. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi. 1996; 27(1): 33-41.

56. Filho RAC, De Paiva JB, Arguello YMS, Da Silva MD, Gardin Y, Resende F, Junior AB, Sesti L. Efficacy of several vaccination programmes in commercial layer and broiler breeder hens against experimental challenge with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Avian Pathology. 2009; 38(5): 367-75.

57. Hahn I. A contribution to consumer protection: TAD Salmonella vac E - a new live vaccine for chickens against Salmonella Enteritidis. Lohmann Information. 2000; 23: 29-32.

58. Hansen DS, Jensen AG, Nørskov-Lauritsen N, Skov R, Bruun B. Clinical direct identification and susceptibility testing of enteric bacilli from positive blood cultures using VITEK (GNI+/GNS-GA). Microbiology and Infection. 2002; 8(1): 38-44.

59. Hassan JO, Barrow PA, Mockett APA, McLeod S. Antibody response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA. Vet Rec. 1990; 126: 519-22.

60. Hassan JO, Mockett APA, Catty D, Barrow PA. Infection and reinfection of chickens with *Salmonella typhimurium*: bacteriology and immune responses. Avian Dis. 1991; 35; 809-19.

61. Hassan JO, Curtiss III R. Development and Evaluation Program Using a Live Avirulent *Salmonella typhimurium* to Protect Vaccinated Chickens Against Challenge with Homologous and Heterologous *Salmonella* Serotypes. Infection and Immunity. 1994; 62 (12): 5519-27.

62. Hassan JO, Curtiss III R. Efficacy of a Live Avirulent Salmonella typhimurium Vaccine in preventing Colonization and Invasion of Laying Hens by Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis. Avian Dis. 1997; 41(4):783-91.

63. Harbourne JF. The control of fowl typhoid in the field by the use of live vaccines. Vet Rec. 1957; 69: 1102-7.

64. Holt PS, Porter RE. Microbiological and histopathological effects of an induced-molt fasting procedure on a *Salmonella enteritidis* infection in chickens. Avian Dis.1992; 36:610-8.

65. Holt PS. Host susceptibility, resistance and ımmunity to *Salmonella* in animals. In: Wray C, Wray A, editors. Salmonella in domestic animals. 1st ed. New York: CABI; 2000. p. 73-88.

66. Hoope RK, Pospischil A. Bacteriological, serological, histological and immunohistochemical findings in laying hens with naturally acquired *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection. Vet Rec. 1993; 133: 391-3.

67. Horacio RT. Model of Salmonella live vaccine safety. İnternational seminar on avian salmonellosis Brasil. 2011; [cited 1.2.2013]. Avaliable from http:// www. abef.com.br /download/seminario/16 PDF.

68. İzgür M. Enterobakteri İnfeksiyonları (*Enterobacteriaceae*) In: Aydın N, Paracıkoglu J, editors. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). 1th ed. Ankara: İlke Emek Yayınları; 2006. p.109-27

69. Jin WY, Jang SJ, Lee MJ, Park G, Kim MJ, Kook J, Kim DM, Moon DS. Evaluation of VITEK 2, MicroScan, and Phoenix for identification of clinical isolates and reference strains. Diagn Micr Infec Dis. 2011; 70 (4): 442-7.

70. Kaiser MG, Lakshmanan N, Wing, T, Lamont SJ. Salmonella enterica serovar Enteritidis burden in broiler breeder chicks genetically associated with vaccine antibody response. Avian Dis. 2002; 46: 25-31.

71. Kalender H, Muz A. Elazığ bölgesindeki tavuklardan izole edilen *Salmonella* türlerinin tiplendirilmesi. Tr J Vet Anim Sci. 1999; 23: 297-303.

72. Khan MI, Fadl AA, Venkitanarayanan KS. Reducing colonization of *Salmonella enteritidis* in chicken by targeting outer membrane proteins. J Appl Microbiol. 2003; 95: 142-5.

73. Kılınç Ü, Aydın F. Kayseri yöresindeki tavukçuluk isletmelerinden toplanan tavuklardan izole edilen *Salmonella* türlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları. Erciyes Üniv Saglık Bil Derg. 2006; 15: 35-40.

74. Kim CJ, Nagaraja KV, Pomeroy BS. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Salmonella enteritidis* in chickens. Am. J. Vet. Res. 1991; 52: 1069-74.

75. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Sommers HM. The Enterobacteriaceae. In: Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Sommers HM editors. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 1st ed. Philadelphia-Toronto: J. B. Lippincott Company; 1979. p. 55-95.

76. Le Minor L. Genus III *Salmonella*. In: Krieg NR, Holt JG, editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.Vol 1. Baltimore: Williams and Wilkins; 1984. p. 427-58.

77. Lin A, Usera MA, Barrett TJ, Goldsby RA. Application of Random Amplified Polymorphic DNA Analysis To Differentiate Strains of *Salmonella enteritidis*. J Clin Microbiol. 1996; 34(4): 870-6.

78. Liu W, Yang Y, Chung N, Kwang J. Induction of humoral immune response and protective immunity in chickens against *Salmonella enteritidis* after a single dose of killed bacterium-loaded microspheres. Avian Dis. 2001; 45: 797-806.

79. Maskell DJ, Hormaeche CE, Harrington KA, Joysey HS, Liew FY. The initial suppression of bacterial growth in a *Salmonella* infection is mediated by a localized rather than a systemic response. Microb Pathog. 1987; 2: 295-305.

80. Mastroeni P, Chabalgoıty JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G. *Salmonella* immune responses and vaccines The Vet Journal. 2000; 161: 132-64.

81. Meenakshi M, Bakshi CS, Butchaiah G, Bansal MP, Siddiqui MZ, Singh VP. Adjuvanted outer membrane protein vaccine protects poultry against infection with *Salmonella enteritidis*. Vet Res Commun. 1999; 23: 81-90.

82. Methner U, Barrow PA, Gregorova D, Rychlik I. Intestinal colonisation-inhibition and virulence of *Salmonella phoP*, *rpoS* and *ompC* deletion mutants in chickens. Vet Microbiol. 2004; 98(1): 37–43.

83. Methner U, Berndt A, Steinbach G. Combination of competitive exclusion and immunization using an attenuated live *Salmonella* vaccine strain in chickens. Avian Dis. 2001; 45 (3): 631-8.

84. Miller RG, Tate CR, Mallinson ET, Scherrer JA. Xylose-lysinetergitol 4: an improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*. Poult Sci. 1991; 70: 2429–32.

85. Miyamoto T, Kitaoka D, Withanage GSK, Fukata T, Sasai K, Baba E. Evaluation of the efficacy of *Salmonella enteritidis* oil-emulsion bacterin in an intravaginal challenge model in hens. Avian Dis. 1999; 43: 487-505.

86. Morshed R, Peighambari SM. Drug Resistance, Plasmid Profile And Random Amplified Polymorphic Dna Analysis Of Iranian İsolates Of *Salmonella enteritidis.* New Microbiol. 2010; 33: 47-56.

87. Nakamura M, Nagamine N, Takahashi T, Suzuki S, Sato S. Evaluation of the efficacy of a bacterin against *Salmonella enteritidis* infection and the effect of stress after vaccination. Avian Dis. 1994; 38: 717-24.

88. Nassar TJ, Al-Nakhli HM, Al-Ogaily ZH. Use of live and inactivated *Salmonella enteritidis* phage type 4 vaccines to immunise laying hens against experimental infection. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 1994; 13 (3): 855-67.

89. Nicholas RAJ, Cullen GA. Development and application of an ELISA for detecting antibodies to *Salmonella enteritidis* in chicken flocks. Vet Rec. 1991; 128: 74-6.

90. O'hara CM, Tenover FC, Miller JM. Parallel Comparison of Accuracy of API 20E, Vitek GNI, MicroScan Walk/Away Rapid ID, and Becton Dickinson Cobas Micro ID-E/NF for Identification of Members of the Family Enterobacteriaceae and Common Gram-Negative, Non-Glucose-Fermenting Bacilli. J Clin Microbiol. 1993; 31(12): 3165-9.

91. O'Hara CM, Westbrook GL, Miller JM. Evaluation of Vitek GNI+ and Becton Dickinson Microbiology Systems Crystal E/NF identification systems for identification of members of the family *Enterobacteriaceae* and other gram-negative, glucose-fermenting and non-glucose-fermenting bacilli. J Clin Microbiol. 1997; 35(12): 3269-73.

92. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Salmonellosıs Chapter 2.9.9. May 2010 Available from URL: http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/.

93. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Fowl Typhoid and Pullorum Disease. Chapter 2.3.11. May 2012. Available from URL: http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/.

94. Oral Aİ, Türkyılmaz S. Broyler İç Organlarından *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis* 'in İzolasyonu ve İzole Edilen Suşların Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg. 2008; 5(1): 27-33.

95. Orhan G, Güler L. Tavuk İç Organlar, Fekal Flora, Yumurta ve Yemde *Salmonella* Türlerinin Bakteriyolojik ve Serolojik Olarak Tespiti. Veterinarium. 1993; 4(2): 15-20.

96. Poppe C. Salmonella infections in the domestic fowl. In: Wray C, Wray A editors. Salmonella in domestic animals. 1st ed. New York: CABI; 2000. p. 107-30

97. Rycroft AN. Structure, function and synthesis of surface polysaccharides in Salmonella. In: Wray C, Wray A, editors. Salmonella in domestic animals. 1st ed. New York: CABI; 2000. p. 19-33

98. Scanlan CM. Genus Salmonella. Introduction to Veterinary Bacteriology. First edition, Iowa State Pr. 1988; 92-6.

99. Shetty N, Hill G, Ridgway GL. The Vitek analyser for routine bacterial identification and susceptibility testing: protocols, problems, and pitfalls. J Clin Pathol. 1998; 51: 316–23.

100. Shivaprasad HL. *Salmonella* Infections: Pullorum Disease and Fowl Typhoid, In: Saif YM eds. Diseases of poultry 11th ed. Iowa State University Press: Ames, IA, 2003; 568-82

101. Singh BR. *Salmonella* Vaccines for Animals and Birds and Their Future Perspective The Open Vaccine Journal, 2009; 2: 100-12

102. Solmaz H. Tavuk tifosu üzerine aşı geliştirme çalışmaları. SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi. 1998.

103. Smith AL, Beal R. The avian enteric immune system in health and disease. In: Davison F, Kaspers B, Schat KA, editors. Avian Immunology. 1st ed. UK: Elsevier Ltd; 2008. p. 243-72.

104. Springer S, Lehmann J, Lindner T, Thielebein J, Alber G, Selbitz HJ. A new live *Salmonella enteritidis* vaccine for chicken–experimental evidence of its safety and efficacy. Berl Münch Tierärztl Wschr. 2000; 113: 246-52.

105.Tavukçuoğlu F. Bursa bölgesinde tavuklardan *Salmonella gallinarum* izolasyon ve identifikasyonu ile suşların antibiyotiklere duyarlılığı üzerinde çalışmalar. Veterinarium. 1993; 4(1): 4-6.

106. Temelli S, Kahya S, Eyıgor A, Çarlı KA. Antibiotic resistance phenotypes of *Salmonella* isolates of broiler meat and chicken origin, Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2012; 59: 107-14.

107. Thorns C, Bell M, Sojka M, Nicholas R. Development and Application of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Specific Detection of *Salmonella enteritidis* Infections in Chickens Based on Antibodies to SEF14 Fimbrial Antigen. J Clin Microbiol. 1996; 34(4): 792-7.

108. Timoney JF, Sikora N, Shivaprasad HL, Opitz M. Detection of antibody to *Salmonella enteritidis* by a gm flagellin-based ELISA. Vet Rec. 1990; 27: 168-9.

109. Türkyılmaz S, Savasan S, Kırkan S, Kaya O. Tavuklarda *Salmonella enteritidis* infeksiyonlarının bakteriyolojik ve serolojik yöntemlerle teşhisi. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2007; 33: 23-34.

110.Van Zijderveld FG, Van Zijderveld AM, Anakotta J. Comparison of four different enzyme-linked immunosorbent assays for the serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* infections in chickens. J Clin Microbiol. 1992; 30: 2560-6.

111.Van Immerseel F, Methner U, Rychlik I, Nagy B, Velge P, Martin G, Foster N, Ducatelle R, Barrow PA. Vaccination And Early Protection Against Non-Host-Specific *Salmonella* Serotypes İn Poultry: Exploitation of İnnate İmmunity and Microbial Activity. Epidemiol Infect. 2005; 133: 959–78.

112. Williams SH. The use of live vaccines in experimental *S.gallinarum* infection in chickens with observation on their interference effect. Journal of Hygiene. 1956; 54: 419-32.

113. Wilson JE. fowl typhoid – The effect of vaccination on the natural and experimental disease. Vet Rec. 1956; 68: 664-7.

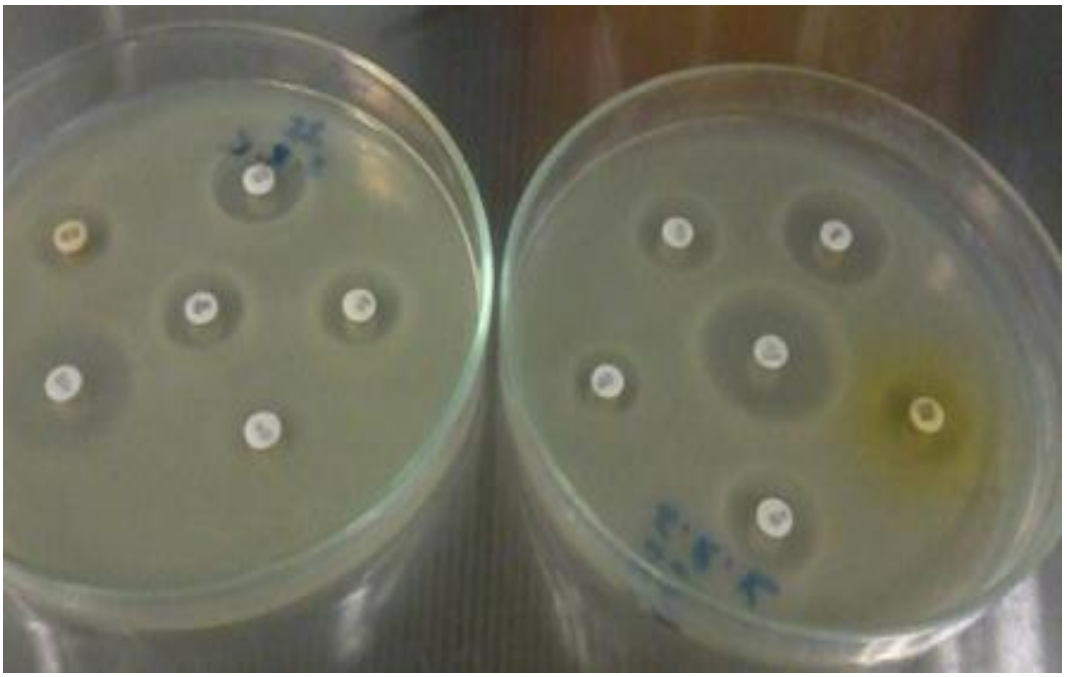
114. Woodward MJ, Gettinby G, Breslin MF, Corkish JD, Houghton S. The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica subsp*. Enterica serotype Enteritidis ironrestricted bacterin vaccine, in laying chickens. Avian Pathology. 2002; 31: 383-92.

115. Xu HR, Hsu HS, Moncure CW, King RA. Correlation of antibody titres induced by vaccination with protection in mouse typhoid. Vaccine. 1993; 11: 725-9.

116. Yazıcıoğlu N, Kaya K, Ayaz Y, Şen S, Özkök S, Aksoy M, Yavuz MK, Kaplan YZ, Vural Ş, Evgin N, Karakoç SR, Mirioğlu M, Turut N. Kanatlı kesimhanelerinin parçalama ünitelerinden alınan boyun ve kanat örneklerinden *Salmonella* izolasyonu, serotiplendirilmesi ve antibiyotik dirençliliği. Etlik Veteriner Mikrobioloji Dergisi. 2005; 16(1-2): 23-36.

117. Zhang-Barber L, Turner AK, Barrow PA. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. Vaccine. 1999; 17: 2538-45.

EK. B: Şekiller



Şekil 9.1 Mueller Hinton agarda antibiyotik duyarlılık testi.



Şekil 9.2. Salmonella kolonilerinin X.L.D. agarda görünümü.



Şekil 9.3. VITEK 2 compact cihazı



Şekil 9.4. VITEK 2 compact GN kartları



Şekil 9.5. Organlardan reizolasyon çalışmaları.



Şekil 9.6. Jel görüntüleme cihazı

10. ÖZGEÇMİŞ

Kahramanmaraş'ta 1970 yılında doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kahramanmaraş, lise öğrenimini ise Ordu'da tamamladı. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde 1986 yılında eğitimine başladı ve 1991 yılında mezun oldu. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na bağlı Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde 2002 yılında Veteriner Hekim olarak göreve başladı. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde 2004-2006 yılları arasında "Tavuk Hastalıkları ve Yetiştiriciliği" üzerine Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilimdalı'nda 2009 yılında Doktora eğitimine başladı. Halen Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuarı'nda çalışmaktadır.